



**SEP**

SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

“2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

**TRABAJO PROFESIONAL**

“ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL  
MEDIANTE CULTIVO POR LOTES Y CONTINUO”.

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

PRESENTA:

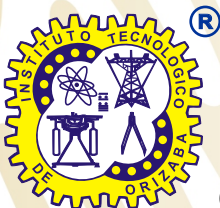
*Ing. José Luis Morales Martínez*

DIRECTOR DE TESIS:

*Dra. Leticia López Zamora*

CODIRECTOR DE TESIS:

*Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga*



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

MAYO 2019



**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

FECHA: 28/05/2019  
DEPENDENCIA: POSGRADO  
ASUNTO: Autorización de Impresión  
OPCIÓN: I

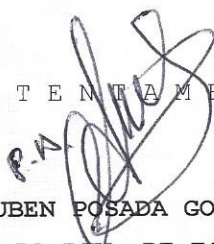
**C. JOSE LUIS MORALES MARTINEZ**  
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:  
**CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA**

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:

**"ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL MEDIANTE CULTIVO POR LOTES Y CONTINUO".**

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

*P.N.*  
  
DR. RUBEN POSADA GOMEZ  
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**C.A. TITULACIÓN**



SECRETARIA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO  
TECNOLÓGICO  
DE ORIZABA



Avenida Oriente 9 Núm. 852, Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, Veracruz, México

Tel. 01 (272) 7 24 40 96, Fax. 01 (272) 7 25 17 28 e-mail: orizaba@itorizaba.edu.mx

www.orizaba.tecnm.mx





**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

FECHA : 17/05/2019

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

**C. DR. RUBEN POSADA GOMEZ**  
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. :

**JOSE LUIS MORALES MARTINEZ**

la cual lleva el título de:

**"ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL MEDIANTE CULTIVO POR LOTES Y CONTINUO".**

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. GALO RAFAEL URREA GARCIA

VOCAL SUP. : DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

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

OPCION: **I** **Tesis**



Avenida Oriente 9 Núm. 852, Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, Veracruz, México

Tel. 01 (272) 7 24 40 96, Fax. 01 (272) 7 25 17 28 e-mail: orizaba@itorizaba.edu.mx

www.orizaba.tecnm.mx



## RECONOCIMIENTOS

### PRESENTACIONES EN CONGRESOS

2018	Expositor	Optimization of the acid hydrolysis process in lignocellulosic materials to obtain xylose and second-generation bioethanol. 2nd Biotechnology World Symposium y 11° Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. 16 al 21 de octubre del 2018. Red de Biotecnología del Instituto Politecnico Nacional. San Jose del Cabo, Baja California Sur, México.
2018	Expositor	Optimización del proceso de remoción de lignina en materiales lignocelulósicos para la obtención de azúcares fermentables. Coloquio de Investigación Multidisciplinaria 2018. Journal CIM. 22 al 23 de noviembre del 2018. Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Orizaba. Orizaba, Veracruz, México.
2018	Expositor	Estimación de parámetros biocinéticos empleando un diseño simplex centroide para la producción de etanol. Academia de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ. 1 al 4 de mayo del 2018. Red de Biotecnología del Instituto Politecnico Nacional. San Jose del Cabo, Baja California Sur, México.

## RESUMEN

### Estudio de la producción de etanol mediante cultivo por lotes y continuo

**Elaborado por:** Ing. José Luis Morales Martínez  
**Dirigido por:** Dra. Leticia López Zamora  
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

El etanol es una alternativa energética como sustituto de combustibles fósiles, el cual puede aliviar la crisis energética mundial y medioambiental. El aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica se basa en la abundancia de residuos agrícolas con una alta composición de cadenas carbonatas susceptibles a la ruptura, compuesta por lignina, hemicelulosa, celulosa y peptina entre otros componentes. El objetivo de este trabajo fue estudiar y evaluar de la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica y jugo de sorgo dulce mediante cultivo por lotes y continuo. La optimización del pretratamiento ácido de las fibras lignocelulósicas residuales se realizó a partir de un diseño experimental de tipo CDC, evaluando para la cascarilla de café (CC): tiempo (35,45,55 min) y concentración de ácido (3,4,5 %v/v), mientras que la mezcla de bagazo de madera (RMR) se evaluó: RSL (1:2.5,1:3.5,1:1:4.5 g:mL) y concentración de ácido (2,3,4 %v/v), seguido de la optimización del pretratamiento alcalino en base dos tratamientos de hidrólisis; acid-alcalina y alcalina directa, ocupando para ambos tratamientos diseños de tipos CDC, evaluando la influencia de los factores según el tipo de tratamiento en un rango de tiempo de 30 a 50 h, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 5 a 25 %v/v, y RSL de 1:8 a 1:20 g:mL. El proceso de sacarificación mediante el uso de la enzima Cellic CTec3, considerando una carga enzimática de 6 y 5 % p/p para CC y RMR respectivamente con RSL de CH<sub>3</sub>COONa de 1:6 y 1:5 g:mL, finalizando con la evaluación de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica en función del efecto de fuentes de K, N y Mg como nutrientes inorgánicos. Para el jugo de sorgo dulce se le realizó un estudio cinético de la influencia de sales inorgánicas sobre la fuente de carbono a partir de un diseño de mezclas Simplex centroide generando un modelo cúbico especial, seguido de la optimización de la suplementación inorgánica del medio de cultivo, en donde se evaluó la producción de etanol, a partir de un diseño Box Behnken, con concentraciones de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,5,7 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,3,5 g/L) y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5,1,1.5 g/L), paralelamente se estudió el consumo de sustrato y el máximo crecimiento celular, para finalmente evaluar la cinética y producción de etanol mediante cultivo continuo a partir de tres tasas de dilución (D, h<sup>-1</sup>); 0.15, 0.20 y 0.25. La optimización de hidrólisis ácida redujo el contenido hemicelulósico en 52.28% para el CC y 37.5% para la RMR, generando concentraciones de xilosa de 18.19 y 25.24 g/L respectivamente. El proceso de deslignificación óptima de los tratamientos ácido-alcalino y alcalino directo, arrojaron para el café remociones de 58.30 y 52.95 % respectivamente y para la madera de 42.40 y 46.42%. Para la generación de glucosa sobre la celulosa generada a partir del café y la madera previamente tratada, permitió obtener concentraciones de 115.59 y 63.32 g/L respectivamente, que se sometieron a fermentación, alcanzando concentraciones de etanol de segunda generación de 48.19 g/L para café y 22.56 g/L para madera, siendo el café un residuo lignocelulósico con un alto potencial a ser empleado para producir etanol. Finalmente, se empleó la MSR para la optimización del cultivo por lotes de jugo de sorgo dulce como fuente de carbono, donde la máxima metabolización de la *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 generó concentraciones de etanol de 62.84 g/L, a partir de una carga orgánica de 2 g/L de extracto de levadura, seguido de la composición inorgánica del cultivo con una concentración de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (g/L): 2.92, 4.73 y 0.75 obteniendo una productividad de Q=3.99 g/Lh con un consumo total de sustrato, generando una concentración de etanol de 79.70 g/L y una  $\mu_{max} = 0.43 \text{ h}^{-1}$ . La caracterización del cultivo por lotes permitió estudiar la producción de etanol a partir de un cultivo continuo considerando dos tiempos de residencia, generando una concentración de etanol promedio de 16.29 g/L y obteniendo una productividad en el proceso continuo de 4.07 g/Lh a una dilución óptima (Dop) de 0.25 h<sup>-1</sup>.

## ABSTRACT

### Study of ethanol production by batch and continuous cultivation

**By:** Ing. José Luis Morales Martínez  
**Advisor(s):** Dra. Leticia López Zamora  
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Ethanol is an alternative energy as a substitute for fossil fuels, which can alleviate the global and environmental energy crisis. The use of lignocellulosic biomass is based on the abundance of agricultural residues with a high composition of carbonate chains susceptible to rupture. The objective of this work was to study and evaluate the production of ethanol from lignocellulosic biomass and sweet sorghum juice by batch and continuous cultivation. The optimization of the acid pretreatment of residual lignocellulosic fibers was carried out from an experimental DCC type design. Evaluating coffee husk (CC): time (35,45,55 min) and acid concentration (3,4,5 %v/v), while the mixture of wood bagasse (RMR) was evaluated. - SLR (1:2.5,1:3.5,1:1:4.5 g:mL) and acid concentration (2,3,4 %v/v), followed by the optimization of alkaline pretreatment based on two hydrolysis treatments: alkaline acid and direct alkaline, using CDC type designs for both treatments, evaluating the influence of the factors according to the type of treatment in a time range of 30 to 50 h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration of 5 a 25 %v/v and SLR of 1:8 a 1:20 g:mL. The saccharification process by using the Cellic CTec3 enzyme, considering an enzymatic load of 6 and 5 % w/w, for CC and RMR respectively, with SLR of CH<sub>3</sub>COONa of 1:6 y 1:5 g:mL, finalizing with the evaluation of ethanol production from lignocellulosic biomass based on the effect of K, N and Mg sources as inorganic nutrients. For the sweet sorghum juice, a kinetic study of the influence of inorganic salts on the carbon source was made from a simplex centroid mix design generating a cubic spice model, followed by the optimization of the inorganic supplementation of the culture medium, where the ethanol production was evaluated, from a Box Behnken design, with concentrations of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,5,7 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,3,5 g/L) y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5,1,1.5 g/L), In parallel we studied substrate consumption and maximum cell growth, to finally evaluate the kinetics and production of ethanol by continuous culture from three dilution rates (D, h<sup>-1</sup>); 0.15, 0.20 y 0.25. The optimization of acid hydrolysis reduced the hemicellulosic content in 52.28% for coffee and 37.5% for wood, generating xylose concentrations of 18.19 and 25.24 g/L respectively. The process of optimal delignification of the acid-alkaline and direct alkaline treatments, resulted in coffee removals of 58.30 and 52.95% respectively and for wood of 42.40 and 46.42%. For the generation of glucose on cellulose generated from coffee and previously treated wood, it allowed obtaining concentrations of 115.59 and 63.32 g/L respectively, which were subjected to fermentation, reaching concentrations of second generation ethanol of 48.19 g/L for coffee and 22.56 g/L for wood, being coffee a lignocellulosic residue with a high potential to be used to produce ethanol. Finally, the MSR was used to optimize the batch culture of sweet sorghum juice as a carbon source, where the maximum metabolization of *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 generated ethanol concentrations of 62.84 g/L, from an organic load of 2 g/L of yeast extract, followed by the inorganic composition of the culture with a concentration of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (g/L): 2.92, 4.73 y 0.75, obtaining a productivity of Q = 3.99 g/Lh with a total consumption of substrate, generating an ethanol concentration of 79.70 g/L and a  $\mu_{max}$  = 0.43 h<sup>-1</sup>. The characterization of the crop by lots allowed to study the production of ethanol from a continuous crop considering two residence times, generating an average ethanol concentration of 16.29 g/L and obtaining a productivity in the continuous process of 4.07 g/Lh at an optimal dilution (Dop) of 0.25 h<sup>-1</sup>.

# ÍNDICE

	Pag	
Resumen		
Abstract		
Lista de Figuras	VII	
Lista de tablas	XI	
Nomenclatura	XIII	
Introducción	1	
<b>CAPITULO 1. FUNDAMENTOS TEORICOS</b>		
1.1	Producción de etanol	4
1.2	Procesos biotecnológicos	4
	1.2.1 Procesos de producción de etanol de diferentes generaciones	5
1.3	Cultivos energéticos y etanol lignocelulósico	6
	1.3.1 Sorgo dulce	7
	1.3.1.1 Ventajas del sorgo dulce	7
	1.3.1.2 Componentes del sorgo dulce	8
	1.3.2 Café	9
	1.3.3 Madera	11
1.4	Materiales lignocelulósicos	12
	1.4.1 Celulosa	14
	1.4.2 Hemicelulosa	14
	1.4.3 Lignina	15
1.5	Pretratamientos lignocelulósicos	16
	1.5.1 Tratamientos químicos	17
	1.5.1.1 Hidrólisis ácida	17
	1.5.1.2 Hidrólisis alcalina	18
1.6	Hidrólisis enzimática	18
	1.6.1 Tipos de celulasa	19
	1.6.2 Mecanismo de hidrólisis enzimática	19
1.7	Residuos lignocelulósicos	20
1.8	Fermentación	20
	1.8.1 Levaduras autóctonas	21
	1.8.2 Nutrientes para medio de cultivo	21
1.9	Procesos de fermentación	24
1.10	Balances de materia en cultivo por lotes	27
1.11	Balances de materia en cultivo continuo	28
1.12	Antecedentes	30
<b>CAPITULO 2. MÉTODOS Y MATERIALES</b>		
2.1	Metodología general	36
	2.1.1 Caracterización del material lignocelulósico	36
2.2	Hidrólisis ácida	37
	2.2.1 Estudio preliminar de hidrólisis ácida	37
	2.2.2 Optimización de hidrólisis ácida	38
	2.2.3 Validación y reproducción a escala de tratamiento ácido	39
2.3	Hidrólisis alcalina	39

	Pag
2.3.1 Optimización de hidrólisis alcalina	40
2.3.2 Validación y reproducción a escala de tratamiento alcalino	41
2.4 Cinéticas de hidrólisis enzimáticas de residuos lignocelulósicos	42
2.5 Evaluación y caracterización del enriquecimiento de la fuente de carbono a partir de nutrientes inorgánicos	42
2.6 Medios de cultivo	43
2.6.1 Medio de conservación	43
2.6.2 Medio de fermentación	43
2.6.3 Pre cultivo y pre inculo	44
2.7 Cultivo por lotes	44
2.7.1 Fermentación por lotes de hidrolizados lignocelulósicos	44
2.7.2 Fermentación por lotes de jugo de sorgo dulce	45
2.7.3 Cinéticas patrón de jugo de sorgo dulce	46
2.8 Optimización de la suplementación inorganica del jugo de sorgo dulce	47
2.8.1 Metodología de superficie de respuesta (MSR) generada a partir del diseño Box Behnken, sobre JSD como fuente de carbono	47
2.8.2 Optimización global de la suplementación inorgánica sobre el proceso fermentativo en cultivo por lotes	48
2.8.3 Validación y caracterización de cinética óptima	49
2.8.4 Aplicación de ecuaciones en cultivo por lotes	49
2.9 Estudio de cinética de crecimiento y producción de etanol mediante cultivo continuo, generado a partir de la suplementación óptima de nutrientes inorgánicos	50
2.10 Métodos analíticos	52
2.10.1 Determinación de biomasa	52
2.10.2 Conteo celular	53
2.10.3 Determinación de azúcares reductores totales	53
2.10.4 Determinación de etanol y sustrato	54
2.10.5 Preparación de muestras analizadas por HPLC	54
2.11 Metodología de superficie de respuesta	55
 <b>CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
3.1 Caracterización de sustratos lignocelulosicos residuales	57
3.2 Resultados de hidrólisis ácida de CC y RMR	59
3.2.1 Optimización del proceso de hidrólisis ácida de CC	62
3.2.2 Optimización del proceso de hidrólisis ácida de RMR	65
3.2.3 Validación de optimización del proceso de remoción del contenido de hemicelulosa para CC y RMR	67
3.3 Hidrólisis alcalina	68
3.3.1 Hidrólisi ácida-alcalina (HAcAl) de CC	68
3.3.2 Hidrólisis alcalina-cruda de (HAICr) de CC	70
3.3.3 Hidrólisis ácida-alcalina de RMR	72
3.3.4 Hidrólisis alcalina-cruda de RMR	75
3.3.5 Validación de optimización del proceso de remoción del contenido de lignina para procesos de CC y RMR; ácida alcalina y alcalina cruda	77
3.3.6 Prueba de aplicación de condiciones óptimas del proceso de hidrólisis alcalina en madera dura.	79
3.4 Hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de CC y RMR	79



	Pag	
3.5	Resumen y balance del proceso de generación de azúcares fermentables mediante residuos lignocelulósicos	82
3.6	Producción de etanol de segunda generación	87
	3.6.1 Cultivos de hidrolizados lignocelulósicos de CC para producción de etanol de segunda generación	87
	3.6.2 Cultivos de hidrolizados lignocelulósicos de RMR para producción de etanol de segunda generación	89
3.7	Cultivo de exploración y efecto de sales nutrientes en JSD	92
	3.7.1 Evaluación de la MSR-simplex para el cultivo de exploración y efecto de sales nutrientes en JSD	97
3.8	Optimización de enriquecimiento de minerales inorgánicos sobre la fuente de carbono	101
	3.8.1 Maximización de la concentración de etanol mediante suplementación inorgánica en cultivos de JSD	101
	3.8.2 Optimización global de cultivos a base de JSD para generación de etanol	105
3.9	Estudio del cultivo continuo a partir de JSD para la producción de etanol	111
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	116
	ANEXOS	120
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	134

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Pag
1.1	Proceso de obtención de bioetanol de primera y segunda generación	5
1.2	Proceso de tratamiento de materiales lignocelulósicos	6
1.3	Plantío de sorgo dulce	7
1.4	a) Plantío y fruto de café (cereza de café); b) composición y estructura de la cereza del café	10
1.5	Alternativas y aplicaciones de la celulosa obtenida de materiales lignocelulosicos	13
1.6	Alternativas y aplicaciones de la hemicelulosa obtenida de materiales lignocelulosicos	13
1.7	Estructura de cadenas contiguas de celulosa	14
1.8	Estructuras de componentes de cadenas de hemicelulosa	15
1.9	Estructura de la molecula de lignina	16
1.10	Métodos de pretratamiento de masa lignocelulósica	17
1.11	Categorías y clasificación de fermentación continua	25
1.12	Representación de un sistema de cultivo continuo	28
1.13	Efecto de $K_s$ en la concentración celular ( $X$ ) y en la productividad de un cultivo continuo. Parametros: $Y_s=0.5$ , $S_0=1.0$ g/L, $\mu_{max}=1$ , los valores de $K_s$ se representan como; 1 (0.1 g/L), 2 (0.01 g/L) y 3(0.001 g/L)	30
2.1	Estructura general del proceso de estudio de generacion de etanol de 1ra y 2a generación	36
2.2	Matriz y estructura de diseño hibrido de optimización	38
2.3	Matriz y estructura de CDC equirradial, $\alpha=\sqrt{2}$	39
2.4	Caracterización y rutas de suplementación a diferentes fuentes de carbono.	43
2.5	Matriz y estructura de diseño simplex centroide	46
2.6	Sistema de cultivo continuo de una sola etapa para producción de etanol operada por unidad de control	51
2.7	Biorreactor applikon 3L con unidad de control <i>My-control</i>	52
3.1	Comparación de contenidos lignocelulosico de CC	58
3.2	Comparacion de contenidos lignocelulosico de RMR; [1] madera dura, [2] madera suave, [3] <i>P. Arizonica (madera suave)</i> , [4] <i>P. Cooperi (madera suave)</i> , [5] <i>durangensis (madera suave)</i>	58
3.3	GSR del proceso de HA del DHO, de CC: a) tiempo (min) vs $[H_2SO_4]$ (% v/v), b) RSL (g:mL) vs $[H_2SO_4]$ (% v/v) y c) RSL (g:mL) vs tiempo (min)	60
3.4	GSR del proceso de HA del DHO RMR, a) tiempo (min) vs $[H_2SO_4]$ (% v/v), b) RSL (g:mL) vs tiempo (min) y c) $[H_2SO_4]$ vs RSL (g:mL)	61
3.5	(a) GSR de la minimización de hemicelulosa óptima, (b) Gráfico de contornos de la zona óptima de minimización de hemicelulosa del proceso de HA de CC	63
3.6	(a) GSR de máxima producción de xilosa, (b) Gráfico de contornos de la producción de xilosa; efecto de la concentración de ácido respecto al tiempo sobre rupturas de pentosas en CC	64
3.7	(a) GSR de la minimización de hemicelulosa óptima, (b) Gráfico de contornos de la zona óptima de minimización de hemicelulosa del proceso de HA de RMR	66
3.8	(a) GSR de máxima producción de xilosa, (b) Gráfico de contornos de la producción de xilosa; efecto de la concentración de ácido respecto al tiempo sobre rupturas de pentosas en RMR	67
3.9	(a) GSR del proceso de minimización de lignina, (b) Gráfico de contornos de zona óptima del proceso de minimización óptima de lignina en cascarilla de CC	70
3.10	(a) GSR del proceso de minimización de lignina, (b) Gráfico de contornos de zona óptima del proceso de minimización de lignina en cascarilla de CC	72

Figura		Pag
3.11	GSR del proceso de minimización óptima del contenido de lignina sobre RMR ácida alcalina; a) $[H_2O_2]$ (%v/v) vs tiempo (h), b) tiempo (h) vs RSL (g:mL) y c) RSL (g:mL) vs $[H_2O_2]$ (%v/v)	74
3.12	Contornos de zona óptima del proceso de minimización de lignina en RMR ácida-alcalina: a) tiempo (h) vs $[H_2O_2]$ (%v/v), b) tiempo (h) vs RSL (g:mL) y c) $[H_2O_2]$ (%v/v) vs RSL (g:mL)	75
3.13	(a) GSR del proceso de minimización de lignina, (b) Gráfica de contornos de zona óptima del proceso de minimización de lignina en bagazo de RMR cruda	77
3.14	Composición estructural de madera dura; cedro, después de cada proceso de pretratamiento de hidrólisis	79
3.15	Cinéticas enzimáticas del proceso de sacarificación a partir de sustratos lignocelulósicos para generación de glucosa nivel matraz, (g/L); a) CC y b) RMR	80
3.16	Cinética enzimática del proceso de sacarificación a partir de sustratos lignocelulósicos ácido-alcalino para generación de glucosa nivel reactor	81
3.17	Línea de proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de CC mediante; hidrólisis ácida-alcalina-enzimática y efecto de tratamientos sobre fibras lignocelulósicas	83
3.18	Línea de proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de RMR mediante; hidrólisis ácida-alcalina-enzimática y efecto de tratamientos sobre fibras lignocelulósicas	84
3.19	Línea de proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de CC mediante; hidrólisis alcalina-enzimática y efecto de tratamientos sobre fibras lignocelulósicas	85
3.20	Línea de proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de RMR mediante; hidrólisis alcalina-enzimática y efecto de tratamientos sobre fibras lignocelulósicas	86
3.21	Cinética de fermentación del sustrato generado a partir de material lignocelulósico de CC: a) ácido alcalino fortificado y b) no fortificado	87
3.22	Comportamiento de biomasa durante cinética de fermentación del sustrato generado a partir de material lignocelulósico de CC ácido alcalino fortificado y no fortificado	88
3.23	Cinética de fermentación del sustrato generado a partir de material lignocelulósico de madera ácido alcalino fortificado; a) consumo de sustrato, b) producción de etanol del CM1 y c) producción de etanol del CM2	90
3.24	Cinética de fermentación del sustrato generado a partir de material lignocelulósico de RMR ácido alcalino no fortificado; a) crecimiento de biomasa y b) presencia de glicerol en CM2	90
3.25	Cinética de exploración cultivos patrón A y B suplementado por $KH_2PO_4$ , $(NH_4)_2SO_4$ y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .	93
3.26	Cinética de exploración cultivos CsxA 1 y CsxB 1, suplementado por $KH_2PO_4$	93
3.27	Cinética de exploración cultivos CsxA 2 y CsxB 2 suplementado por $(NH_4)_2SO_4$	93
3.28	Cinética de exploración cultivos CsxA 3 y CsxB 3, suplementado por $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	94
3.29	Cinética de exploración cultivos CsxA 4 y CsxB 4 suplementado por $KH_2PO_4$ y $(NH_4)_2SO_4$	94
3.30	Cinética de exploración cultivos CsxA 5 y CsxB 5, suplementado por $KH_2PO_4$ y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	94
3.31	Cinética de exploración cultivos CsxA 6 y CsxB 6 suplementado por $(NH_4)_2SO_4$ y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	94
3.32	Cinética de exploración cultivos CsxA 7 y CsxB 7, suplementado por $KH_2PO_4$ , $(NH_4)_2SO_4$ y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	94

Figura		Pag
3.33	Productividades obtenidas a partir de los CsxA y CsxB, considerando diferentes composiciones nutrimentales	95
3.34	Rendimientos obtenidos a partir de los CsxA y CsxB, considerando diferentes composiciones nutrimentales	97
3.35	Correlación de resultados experimentales vs datos predichos por el modelo cúbico especial de mezcla simplex centroide; a) CsxA y b) CsxB	98
3.36	Efecto de minimización de suplementación inorgánica a 1 g/L de extracto de levadura; a) gráfico de superficie de respuesta, b) gráfico de contornos a bajas concentraciones de producto	99
3.37	Efecto de maximización de suplementación inorgánica a 2 g/L de extracto de levadura; a) gráfico de superficie de respuesta, b) gráfico de contornos a altas concentraciones de producto	100
3.38	Efecto combinado de la producción de etanol del CsxB en función del efecto de la composición y suplementación del medio de cultivo. Donde A; $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , B; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y C; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100
3.39	GSR del proceso de maximización de la producción de etanol a partir de JSD mediante un diseño Box Behnken; a) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vs $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , b) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ vs $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vs $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	102
3.40	Gráfico de efectos combinados del proceso de maximización óptima de la producción de etanol a partir de JSD mediante un diseño Box Behnken.	103
3.41	Proceso de maximización óptima de la producción de etanol a partir de la suplementación inorgánica mediante un CDC; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L) vs $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L); (a) Gráfica de superficie de respuesta, (b) Gráfica de contornos	106
3.42	Efecto de la composición de sales nutrientes sobre la producción de etanol; (a) tiempo (h) vs cultivo central CDC [O], cultivo patrón A [□] y cultivo patrón B [Δ]; (b) tiempo (h) vs cultivo central CDC, cultivo alto CDC [□] y cultivo bajo CDC [Δ]; (c) tiempo (h) vs cultivo central CDC [O], cultivo Box Behnken [Δ]	107
3.43	Efecto de la composición de sales nutrientes sobre el consumo de sustrato; (a) tiempo (h) vs cultivo central CDC [O], cultivo patrón A [□] y cultivo patrón B [Δ]; (b) tiempo (h) vs cultivo central CDC [O], cultivo alto CDC [□] y cultivo bajo CDC [Δ]; (c) tiempo (h) vs cultivo central CDC [O], cultivo Box Behnken [Δ]	108
3.44	Efecto de la composición de sales nutrientes sobre el consumo de sustrato; (a) tiempo (h) vs Glucosa [O] y xilosa [Δ]; (b) tiempo (h) vs glicerol [o] y células [Δ]; (c) $\mu_{\text{max}}$ del cultivo CDC central	108
3.45	Productividades obtenidas a partir del CDC óptimo para producción de etanol a mediante suplementación inorgánica	109
3.46	Rendimientos ( $Y_{P/S}$ ) obtenidos a partir del CDC óptimo para producción de etanol a mediante suplementación inorgánica	110
3.47	Rendimientos ( $Y_{P/S}$ ) obtenidos a partir del CDC óptimo para producción de etanol a mediante suplementación inorgánica	111
3.48	Montaje del sistema de producción de etanol mediante cultivo continuo	112
3.49	Cinéticas de continuidad de la producción de etanol, consumo de sustrato y estado de biomasa a partir del cultivo continuo de JSD. Tasas de dilución; a) $0.15 \text{ h}^{-1}$ , b) $0.20 \text{ h}^{-1}$ , c) $0.25 \text{ h}^{-1}$	113
3.50	Tasa de dilución óptima ( $D_{\text{OP}}$ ) en la fermentación continua del jugo de sorgo dulce	114
A1	Gráfica de probabilidad normal representativa de los modelos de regresión experimental de diseños DHO: a) CC y b) RMR	122
B1	Gráfica de probabilidad normal representativa de los modelos de regresión experimental de diseños CDC de optimización de HA: a) CC y b) RMR	125

Pag

Figura		Pag
C1	Gráfica de probabilidad normal representativa de los modelos de regresión experimental de los CDC de optimización de los procesos de hidrólisis alcalina sobre CC; a) HAcAl y b)HAICr	127
D1	Gráfica de probabilidad normal representativa de los modelos de regresión experimental de los CDC de optimización de los procesos de hidrólisis alcalina sobre RMR; a) HAcAl y b)HAICr	129
E1	Gráfica de probabilidad normal representativa del modelo de regresión experimental del diseño Box Behnken para maximización del proceso de generación de etanol	132
F1	Gráfica de probabilidad normal representativa del modelo de regresión experimental del CDC para optimización del proceso de generación de etanol	133

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Pag
1.1	Residuos generados a partir del proceso de beneficio e industrialización sobre un 1 Kg de café	10
1.2	Composición fisicoquímica del fruto de café de tipo arábico y robusto	11
1.3	Composición estructural de diferentes materiales lignocelulósicos	20
1.4	Ecuaciones de balance de materia en cultivo por lotes	27
2.1	Niveles de operación del proceso de hidrólisis ácida mediante DHO sobre estructura lignocelulósica de CC y RMR	37
2.2	Factores y niveles de operación de CDC para la optimización de la HA, sobre residuos lignocelulosicos	38
2.3	Factores y niveles de operación de CDC para la optimización de hidrólisis ácida-alcalina, sobre CC. Factor fijo; $[H_2O_2] = 8\%$ v/v	40
2.4	Factores y niveles de operación de CDC para la optimización de hidrólisis alcalina cruda, sobre CC. Factor fijo; tiempo = 35 h	41
2.5	Factores y niveles de operación de diseño Box Behnken para la optimización de hidrólisis ácida-alcalina, sobre RMR	41
2.6	Factores y niveles de operación de CDC para la optimización de hidrólisis alcalina cruda, sobre RMR. Factor fijo; RSL = 1:15	41
2.7	Composición del medio de conservación para la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITV-01	43
2.8	Composición de medio de activación para la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITV-01	44
2.9	Composición de medio de preadaptación para cultivos utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITV-01.	44
2.10	Composición nutrimental de cinéticas del cultivo por lotes de hidrolizados lignocelulósicos	45
2.11	Factores y niveles de operación del diseño simplex centroide para evaluación cinética del cultivo por lotes de JSD. Diseño 1 (CsxA); Carga de 1 g de extracto de levadura, Diseño 2 (CsxB); Carga de 2 g de extracto de levadura	46
2.12	Factores y niveles de operación de diseño Box Behnken para la optimización de suplementación inorgánica del JSD	48
2.13	Factores y niveles de operación de CDC para la optimización de la suplementación inorgánica del JSD. Factor fijo; $MgSO_4 \cdot 7H_2O = 0.75$ g/L con carga a 2 g/L de extracto de levadura	49
3.1	Caracterización de materiales lignocelulosicos	57
3.2	Estructura y resultados de diseño híbrido para CC y RMR	59
3.3	Optimización de HA mediante CDC; minimización del contenido de hemicelulosa y concentración de xilosa en CC	62
3.4	Optimización de HA mediante CDC; minimización del contenido de hemicelulosa y concentración de xilosa en RMR	65
3.5	Reporte de datos obtenidos sobre validación de HA en prueba semi-piloto de 1 Kg	68
3.6	Optimización de HACAI de CC mediante CDC; minimización del contenido de lignina Factor fijo; $[H_2O_2] = 8\%$ v/v	69
3.7	Optimización de HAICr de CC mediante CDC; minimización del contenido de lignina. Factor fijo; tiempo = 35 h	71
3.8	Optimización de HACAI de RMR mediante Box Behnken; minimización del contenido de lignina	73

Tabla		Pag
3.9	Optimización de HAcAI de RMR mediante CDC; minimización del contenido de lignina. Factor fijo; RSL = 1:15	76
3.10	Validación de condiciones óptimas del proceso de hidrólisis para CC y RMR mediante hidrólisis ácida alcalina y alcalina cruda	74
3.11	Rendimientos y bioparámetros de las cinéticas del cultivo lignocelulósico de CC	89
3.12	Comparación de concentraciones y rendimientos de cultivos lignocelulósicos	92
3.13	Parámetros y rendimientos de cultivos patrón	92
3.14	Concentraciones de etanol generadas a partir de diseño Box Behnken	101
3.15	Concentraciones de etanol generadas a partir de diseño CDC equiradial de fermentación	105
3.16	Evaluación y comparación de productividades generadas a partir de diferentes suplementaciones de cultivo vs productividad del cultivo óptimo	110
3.17	Evaluación de rendimientos generados a partir de diferentes suplementaciones de cultivo	110
3.18	Parametros cinéticos evaluados durante la evaluación del cultivo continuo	113
3.19	Comparación de productividades reportado en este trabajo y otros autores	115
A1	ANOVA de diseño híbrido de hidrólisis ácida de CC y producción de xilosa	123
A2	ANOVA de diseño híbrido de HA de RMR y producción de xilosa	124
B1	ANOVA de CDC para optimización de minimización de hemicelulosa en HA de CC	125
B2	ANOVA de CDC para optimización de minimización de hemicelulosa en HA de RMR	126
C1	ANOVA de CDC para optimización de minimización de lignina en HAcAI de CC	128
C2	ANOVA de CDC para optimización de minimización de lignina en HAICr de CC	129
D1	ANOVA de diseño Box Behnken para optimización de minimización de lignina en HAcAI de RMR	130
D2	ANOVA de CDC para optimización de minimización de lignina en HAICr de RMR	131
E1	ANOVA de diseño Box Behnken para maximización de la concentración de etanol	133
F1	ANOVA de CDC para la optimización del proceso de generación de etanol	134

## NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	
5-HMF	5-Hidroximetil furfural	g/L
ANOVA	Análisis de varianza	
bh/bs	Base húmeda/base seca	%
X	Biomasa	g/L
Cell	Células	Cell/mL
$S_0$	Concentración inicial de sustrato	g/L
$K_S$	Constante de velocidad de crecimiento	g/L
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia	
CC	Cascarilla de café	
CC1/CC2	Cultivo de café 1/ Cultivo de café 2	
CM1/CM2	Cultivo de madera 1/ Cultivo de madera 2	
CsxA/CsxB	Cultivo simplex A/ Cultivo simplex B	
$D$	Tasa Dilución	$h^{-1}$
$D_{crítica}$	Tasa Dilución crítica	$h^{-1}$
$D_{op}$	Tasa Dilución óptima	$h^{-1}$
DCC	Diseño central compuesto	
DHO	Diseño híbrido de optimización	
$\eta_f$	Eficiencia de fermentación	%
AFEX	Explosión de fibras de amoníaco	
AFEX	Explosión de fibras de amoníaco	
F	Flujo	L/h
°Brix	Grados Brix	°Brix
GSR	Gráfico de superficie de respuesta	
HA	Hidrólisis ácida	
HAL	Hidrólisis alcalina	
HAcAl	Hidrólisis ácida alcalina	
HAICr	Hidrólisis alcalina cruda	
JSD	Jugo de sorgo dulce	
mp	Materia prima	
OFAT	Método experimental de un factor a la vez	
MSR/RSM	Metodología de superficie de respuesta	
MSR-simplex	Metodología de superficie de respuesta de tipo simplex	
nm	Nanómetros	nm
$Q$	Productividad volumétrica	g/Lh
$Q_E$	Productividad volumétrica en cultivo continuo	g/Lh
RSL	Relación sólido-líquido	g:mL



$Y_{x/s}$	Rendimiento biomasa/sustrato	g/g
$Y_{p/s}$	Rendimiento producto/sustrato	g/g
$S$	Sustrato	g/g
$\tau$	Tiempo de residencia	h
$P$	Productividad de biomasa en cultivo continuo	g/Lh
Ufc	Unidades formadoras de colonias	
RMR	Residuos de madera	
$r_s$	Velocidad de consumo de sustrato	g/h
$r_x$	Velocidad de producción de biomasa	gL/h
$r_p$	Velocidad de producción de producto	gL/h
$v_s$	Velocidad específica de consumo de sustrato	gg/h
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento	gg/h
$vp$	Velocidad específica de generación de producto	gg/h
$\mu_{max}$	Velocidad máxima de crecimiento	$h^{-1}$
$V$	Volumen	$m^3$

## INTRODUCCIÓN

Actualmente la temática energética y ambiental ha adquirido prioridad por la emergente necesidad de abordar y dar solución a la problemática medioambiental, en donde el energético de mayor interés por su producción a partir de fuentes renovables como; cultivos agrícolas, residuos de cosechas, desechos industriales y municipales, es el etanol, especialmente aquel que es producido por materias primas que no compitan con la cadena alimenticia, estableciéndose como una alternativa viable que sustituya o se emplee como aditamento a los combustibles de origen fósil, cuyo estatus a nivel global se encuentra en incertidumbre, debido a la disponibilidad de yacimientos de petróleo, capacidad de extracción, tecnología extractiva y de transformación, así como políticas internacionales que llevan a una constante fluctuación socioeconómica mundial.

Hoy en día la producción de etanol se clasifica en función de la procedencia de la fuente de carbono donde los biocombustibles de primera generación se caracterizan principalmente por utilizar jugos ricos en azúcares como es el caso del jugo de sorgo dulce, considerado como un cultivo energético, el cual a diferencia de la caña de azúcar, ofrece una mayor tolerancia a diferentes climas, tipos de suelo y rápida maduración, mientras que la biomasa lignocelulósica es la fuente de carbono para la producción de etanol segunda generación, sin embargo, este sustrato debe ser pretratado para eliminar la lignina presente en la estructura lignocelulósica lo cual permite llevar a cabo el proceso de sacarificación de la celulosa a glucosa mediante las reacciones enzimáticas.

En base a la emergente necesidad de biocombustibles a nivel global y a la gran variedad de fuentes de carbono disponibles para la producción de energías limpias, se deben emprender estudios para la producción de etanol de primera y segunda generación a partir de vías fermentativas en función de la operación; cultivo por lote o continuo.

Por lo anterior este trabajo tiene como objetivo evaluar la producción de etanol mediante el cultivo por lote y continuo, a partir de jugos ricos en azúcares y biomasa lignocelulósica.

El estudio inicia con la minimización del contenido de lignina y hemicelulosa en residuos lignocelulosicos tal como la cascarilla de café y fibras de madera para la obtención de celulosa y conversión a glucosa mediante la acción de la enzima Cellic CTec3 seguido de la evaluación de la capacidad fermentativa de los sustratos de origen lignocelulósico en cultivos por lote, mientras que el estudio al jugo de sorgo dulce se centra en evaluar el efecto y composición del medio de cultivo en una operación discontinua evaluando la mayor producción de etanol permitiendo caracterizar el crecimiento celular de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*-ITV01 durante el proceso de fermentación. La adquisición de los parametros cineticos del cultivo por lote permite el montaje de un quimiostato de Monod para la evaluación de la producción de etanol en cultivo continuo.

# **CAPÍTULO 1**

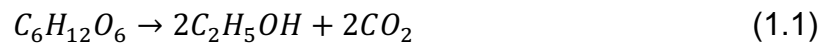
## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

## CAPITULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 1.1 Producción de etanol

El etanol es una alternativa energética como sustituto de combustibles fósiles, el cual puede aliviar la crisis energética mundial y medioambiental debido a que contiene 35% O<sub>2</sub>, lo cual reduce emisiones de hidrocarburos, monóxido de carbono y oxinitruro. Actualmente a nivel mundial se realizan investigaciones biotecnológicas dirigidas a la generación de energías renovables, se estima que a partir del 2008 al 2020 la producción global de etanol crezca a 9,000,000 de litros/día en países con implementaciones bioenergéticas dirigidas al etanol (Tan *et al.*, 2015; Thani *et al.*, 2017).

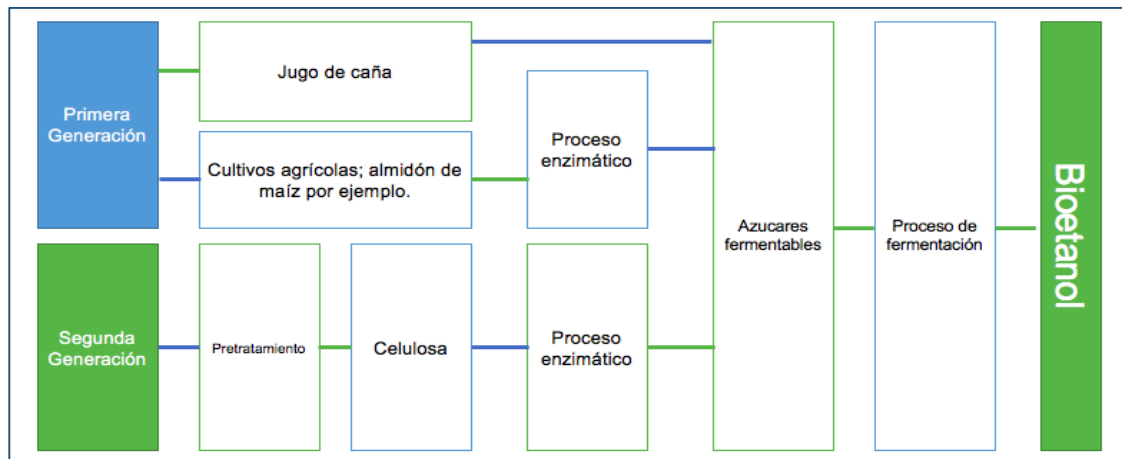
Una de las vías de producción de etanol es a partir de la interacción biocatalítica de microorganismos con una fuente de carbono, degradándose a etanol y CO<sub>2</sub> como se muestra en la Ec. 1.1



El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO<sub>2</sub> por un gramo de glucosa (Vázquez y Dacosta, 2007).

### 1.2 Procesos biotecnológicos

La producción biológica de etanol depende considerablemente del material a utilizar como potencial fuente de carbono debido a que los costos, comercialización y número de etapas del proceso (Figura 1.1) depende primordialmente en la materia prima. Hoy en día, existen dos tipos de tecnología de proceso llamadas de primera y segunda generación (Bajpai, 2013; Tan *et al.*, 2015).



**Figura 1.1** Proceso de obtención de bioetanol de primera y segunda generación

### 1.2.1 Procesos de producción de etanol de diferentes generaciones

En los procesos tecnológicos de primera generación los insumos provienen directamente del sector agrícola como cultivos alimenticios ricos en azúcares, aceites y almidones, tales como cultivo de maíz, cebada, centeno, papa, jugo de caña, jugo de remolacha y una variedad de diferentes semillas. Los azúcares se pueden convertir directo en etanol, pero los almidones primero deben hidrolizarse a azúcares fermentables, donde la tecnología a ocupar tiene costos operativos altos (Bajpai, 2013; Salinas y Gasca, 2009).

La característica principal de los procesos biotecnológicos de segunda generación se basa principalmente en diferentes procesos tecnológicos y materias primas no alimentarias, tales como cultivos no agrícolas o ganaderos. Otra fuente de biomasa de segunda generación parte de estructuras lignocelulósicas, tales como residuos agrícolas y forestales ricos en celulosa, por ejemplo: paja de trigo, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar, aserrín, hojas secas de árboles, etc., estos procesos tienen un nivel de complejidad más alta, caracterizada por los procesos de hidrólisis y sacarificación (Álvarez, 2009; Salinas y Gasca, 2009).

La tercera generación de biocombustibles procede de vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina “cultivos energéticos”, especialmente diseñados y adaptados por medio de técnicas de biología molecular, para mejorar la conversión de biomasa a combustibles, mientras que la cuarta generación se basa en la biocatálisis a partir de bacterias genéticamente modificadas (Álvarez, 2009).

### 1.3 Cultivos energéticos y etanol lignocelulósico

La producción de etanol de segunda generación puede utilizar diferentes materias primas, las cuales se clasifican en dos tipos; i) materia prima rica en altas concentraciones de sacarosa y glucosa, como el jugo de sorgo, ii) materiales lignocelulósicos como madera, pajas y forrajes. Este último grupo se presenta como una alternativa de producción por ser abundante. El principal impedimento tecnológico para la utilización de este tipo de biomasa es la ausencia de una tecnología y procesos de bajo costo dirigida a la remoción de la fracción lignocelulósica, debido a que los residuos lignocelulósicos después de recolectados deben ser procesados adecuadamente como se muestra en la Figura 1.2 (Balat *et al.*, 2008; Viñals *et al.*, 2012).

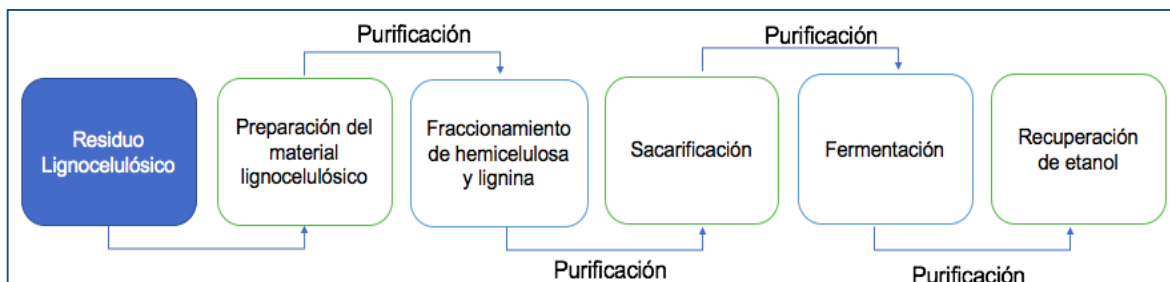


Figura 1.2 Proceso de tratamiento de materiales lignocelulósicos

### 1.3.1 Sorgo dulce

El sorgo dulce (Figura 1.3) se ha convertido en uno de los cultivos más prometedores para la producción de etanol-combustible, debido a una alta tasa de crecimiento que varía de 120 a 180 días, con un contenido energético que oscila entre 12-18 °Brix y a su resistencia a la sequía y al calor en regiones áridas; este es un plantío del género *Sorghum bicolor* (L.) Moench, perteneciente al cultivo de las gramíneas. En México se cultivan tres variedades de sorgo dulce, con la clasificación orientada a su utilización i) sorgo escobero, ii) sorgo forrajero y iii) sorgo grano (Montes *et al.*, 2010).



Figura 1.3 Plantío de sorgo dulce

#### 1.3.1.1 Ventajas del sorgo dulce

- El sorgo dulce además de su rápido crecimiento, alta eficiencia en uso de agua y bajos requerimientos de fertilizantes, presenta ventajas en relación a otros cultivos utilizados como materia prima de biocombustibles
- Ciclo vegetativo alrededor de cuatro meses con un requerimiento de agua de 4000 m<sup>3</sup> por ciclo de cultivo, mientras que la caña de azúcar tiene un ciclo vegetativo de 12 a 16 meses con un requerimiento de agua de alrededor de 36000 m<sup>3</sup> por ciclo



- Costo de producción del sorgo dulce es tres veces menor que la producción de caña de azúcar
- Se propaga por semilla
- Las etapas de producción de etanol a partir de jugo de sorgo dulce, coinciden con las de su obtención a partir de la caña de azúcar, por lo que se puede usar la misma maquinaria para ambas materias primas
- Es un cultivo altamente adaptativo regiones áridas
- El tallo y hojas contienen un alto contenido lignocelulósico
- La calidad de quemado de etanol es superior a la de la gasolina, debido a que contiene menos azufre
- El etanol generado a partir de este plantío tiene un octanaje superior a 100 octanos

Estas características sugieren que el sorgo dulce posee un alto potencial para la producción de etanol a gran escala y uso integral relacionado, y esta planta ha sido considerada como una de las materias primas prometedoras con alternativas para la producción de bioetanol en todo el mundo (Montes *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2014).

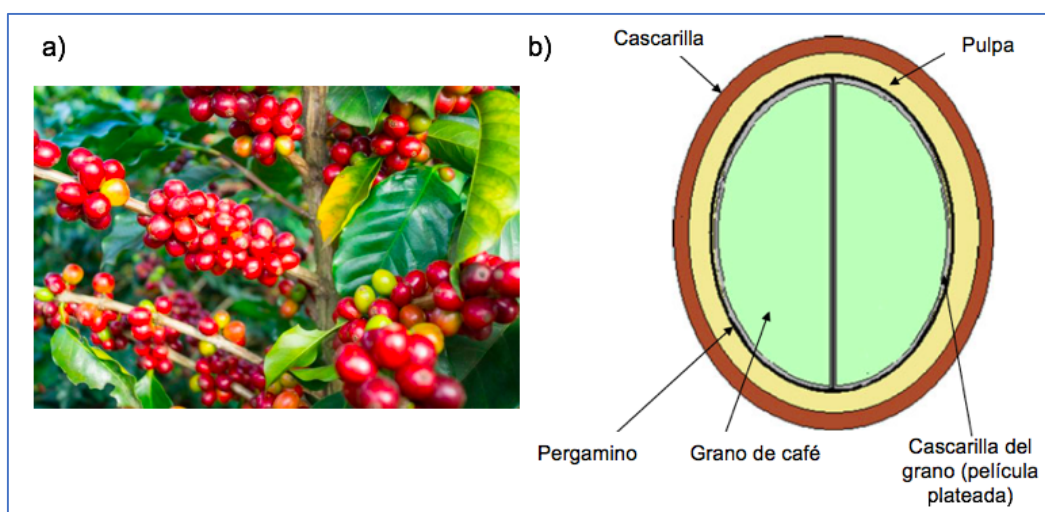
### **1.3.1.2 Componentes del sorgo dulce**

Los tallos maduros contienen alrededor de 73% de humedad y los sólidos presentes están divididos en sólidos estructurales y no estructurales. El jugo se obtiene de los tallos, y está compuesta por sacarosa, glucosa y fructuosa en porciones que dependen de la variedad, temporada de cosecha, etapa de madurez, lugar de cultivo entre otros factores. Al comparar la composición química del jugo de sorgo dulce (JSD), con el jugo de caña de azúcar, el porcentaje de sacarosa en relación con la glucosa y fructuosa es generalmente más alta en una proporción de 90%, 4% y 6% respectivamente (Chuck, 2011), después de la extracción del jugo rico en azúcares, los rangos de celulosa, hemicelulosa y lignina varían en rangos de 34-44%, 25-27% y 18-20% respectivamente (Salcedo *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Café

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo y el segundo producto con mayor comercialización global después del aceite. Debido a la demanda de este producto en la industria del café se generan grandes cantidades de residuos, se estima que menos del 5% de la biomasa generada se aprovecha en la elaboración de la bebida, el resto queda en forma residual como hojas y ramas durante la renovación de cafetales y durante el acondicionamiento del fruto se retiran los diferentes componentes del fruto o cereza del café, los cuales son materiales característicos por su estructura lignocelulósica (Rodríguez y Zambrano, 2010; Pérez-Sariñana y Saldaña-Trinidad, 2014).

El arbusto de café pertenece a la familia de *Rubiaceae*, los granos de café se producen a partir de la planta *Coffea L.*, de las cuales existen 70 especies, de donde solo dos especies son comercialmente utilizadas; *Coffea arabica* (Arábica) representando el 75% de la producción mundial y el *Coffea Canephora* (Robusta), considerado con mayor acidez, pero más resistente a las plagas y representa el 25% de la producción mundial (Mussatto *et al.*, 2011). La cereza del café es la fruta cruda de la planta, que se compone de dos granos cubierto por un fino pergamino como casco y rodeado por la pulpa como se muestra en la Figura 1.4, donde un el ripio o borra corresponde a un 27% de la composición del fruto fresco y la pulpa o exocarpio representa el 44%, la pulpa como tal tiene un contenido de azúcares reductores del 17% en base seca mientras que a lo largo del proceso se genera un mucilago rico en azúcares cercano al 64% por los diferentes procesos térmicos que directa o indirectamente reciben los residuos del café. En la Tabla 1.1 se observa los residuos generados sobre 1 Kg de café, mostrándose que de la cantidad inicial de fruto el material lignocelulósico aprovechable está representado por el 92.4% del peso inicial, convirtiéndose en materia prima lignocelulósica aprovechable, para generación de combustibles de origen biológico (Rodríguez y Zambrano, 2010; Mussatto *et al.*, 2011)



**Figura 1.4** a) Plantío y fruto de café (cereza de café); b) composición y estructura de la cereza del café

**Tabla 1.1** Residuos generados a partir del proceso de beneficio e industrialización de sobre un 1 Kg de café

Proceso	Residuo obtenido	Pérdida (g)
Despulpado	Pulpa fresca	436
Desmucilaginado	Mucílago	149
Secado	Agua	171
Trilla	Pergamino y película plateada	42
Torrefacción	Volátiles	22
Preparación de bebida	borra	104
<b>Pérdida total</b>		<b>924</b>

Además de la composición estructural del fruto de café, se cuenta con los componentes fisicoquímicos, por ejemplo, la cafeína es el componente más conocido de los granos de café, donde el café arábico tiene un contenido de cafeína de 0.8% y 1.4% (p/p), mientras que para el café tipo robusto oscila entre 1.7% y 4.0% (p/p); sin embargo, el café está constituido por varios otros componentes como se observa en la Tabla 1.2 (Mussatto *et al.*, 2011).

**Tabla 1.2** Composición fisicoquímica del fruto de café de tipo arábico y robusto

Componente	Arábica (%)	Robusta (%)	Componente	Arábica (%)	Robusta (%)
Carbohidratos solubles	9-12.5	6-11.5	Lípidos	15-18	8-12
Monosacáridos		0.2-0.5	ceras		0.2-0.3
Oligosacáridos	6-9	3-7	Aceites		7.7-17.7
Polisacáridos			Otros componentes		11-15
Polisacáridos insolubles	46-53	34-44	Aminoácidos libres		0.2-0.8
Hemicelulosa			Proteínas		8.5-12
Celulosa	41-43	32-40	Cafeína	0.8-1.4	1.74.0
Ácidos volátiles		0.1	Trigonelina	0.6-1.2	0.3-09
Ácidos no volátiles alifáticos	2-2.9	1.3-2.2	Minerales		3-5.4
Ácido clorogénico	6.7-9.2	7.1-12.1	Lignina		

### 1.3.3 Madera

La madera es un material que se encuentra en la clasificación de biomasa forestal, este es un material ortótropo, con distinta elasticidad según la dirección de deformación. Los árboles se caracterizan por tener troncos que crecen año con año, formando anillos concéntricos que están compuestos por fibras de polisacáridos entrelazados con cadenas de polímeros cristalinos. Químicamente se constituye por 50% C, 42% O<sub>2</sub>, 6% H<sub>2</sub> y 2% de N<sub>2</sub> y otros componentes menores, caracterizados principalmente por un contenido de celulosa alrededor de 50%, de lignina encargada de dar la dureza y protección de los troncos con un estimado alrededor del 25% y de hemicelulosa con una composición cercana del 25%, de forma generalizada, debido a que la principal clasificación de la madera, se basa en su estructura elástica y crecimiento en función del grado de madures: (Raven y Everl., 1992; De Lucas *et al.*, 2012)

*Maderas duras*, son aquellas que proceden de árboles de un crecimiento lento (los de hoja caduca), por lo que pesan más y soportan mejor las inclemencias del tiempo que las blandas. Estas maderas proceden de árboles que tardan décadas, e incluso siglos, en alcanzar el grado de madurez suficiente para ser cortadas y poder ser empleadas en la elaboración de muebles o vigas de los caseríos o viviendas unifamiliares. Son mucho más caras que las blandas, debido a que su lento crecimiento provoca su escasez, pero son de mucha mayor calidad. También son muy empleadas para realizar tallas de madera

*Maderas blandas*, las cuales tienen un periodo de crecimiento mucho más corto, que provoca que su precio sea mucho menor. Este tipo de madera no tiene una vida tan larga como las duras. Dar forma a las maderas blandas es mucho más sencillo, aunque tiene la desventaja de producir mayor cantidad de astillas, por lo que el acabado es mucho peor. Además, la carencia de veteado de esta madera le resta atractivo, por lo que casi siempre es necesario pintarla, barnizarla o teñirla.

De acuerdo a esta clasificación; las fuentes bibliográficas y diversos autores consideran el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, como se muestra en la Tabla 1.3 de la sección 1.7(Cuervo *et al.*, 2009).

#### **1.4 Materiales lignocelulósicos**

Los materiales lignocelulósicos consisten principalmente en tres polímeros: celulosa hemicelulosa y lignina, estos polímeros se encuentran en una matriz heterogénea, la cual varía en proporciones de acuerdo al tipo de biomasa (Agbor *et al.*, 2011), este tipo de materiales son baratos, pero se debe ocupar proceso tecnológico más avanzado para obtener azúcares fermentables (Bajpai, 20013), en las Figuras 1.5 y 1.6 se muestran las aplicaciones biotecnológicas potenciales de los productos de mayor valor (celulosa y hemicelulosa). De hecho, hay una serie de usos posibles para los materiales lignocelulósicos, pero hasta ahora, estos residuos siguen siendo pocos explorados como materia prima para en la producción de metabolitos de valor

agregado, así como fuente nutricional para alimentos o diversos productos. Esta es un área de investigación con un gran potencial para expandirse en el futuro por razones económicas y puntos de vista ambientales (Mussatto *et al.*, 2011).

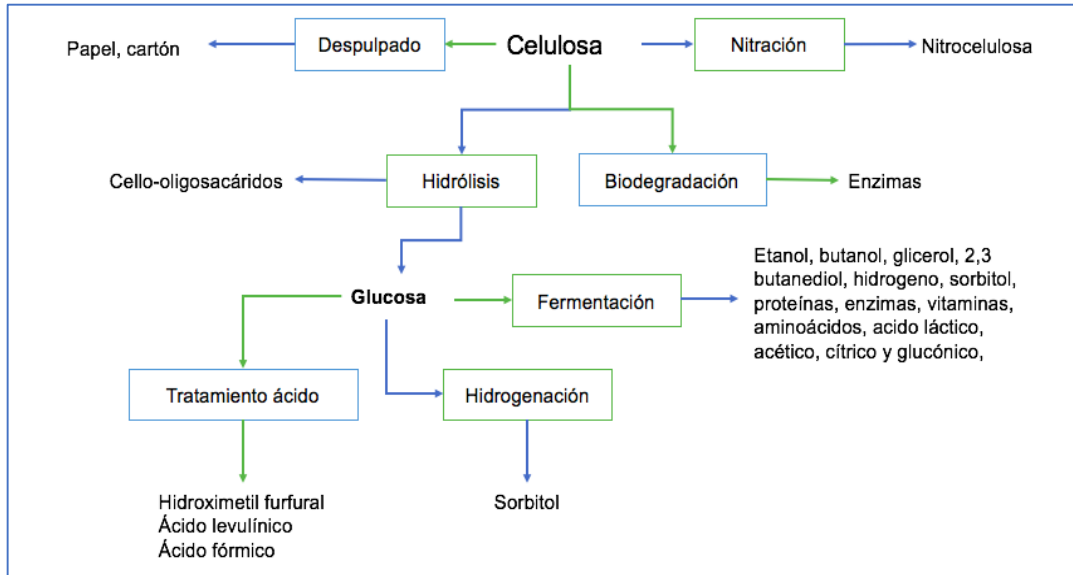


Figura 1.5 Alternativas y aplicaciones de la celulosa obtenida de materiales lignocelulósicos

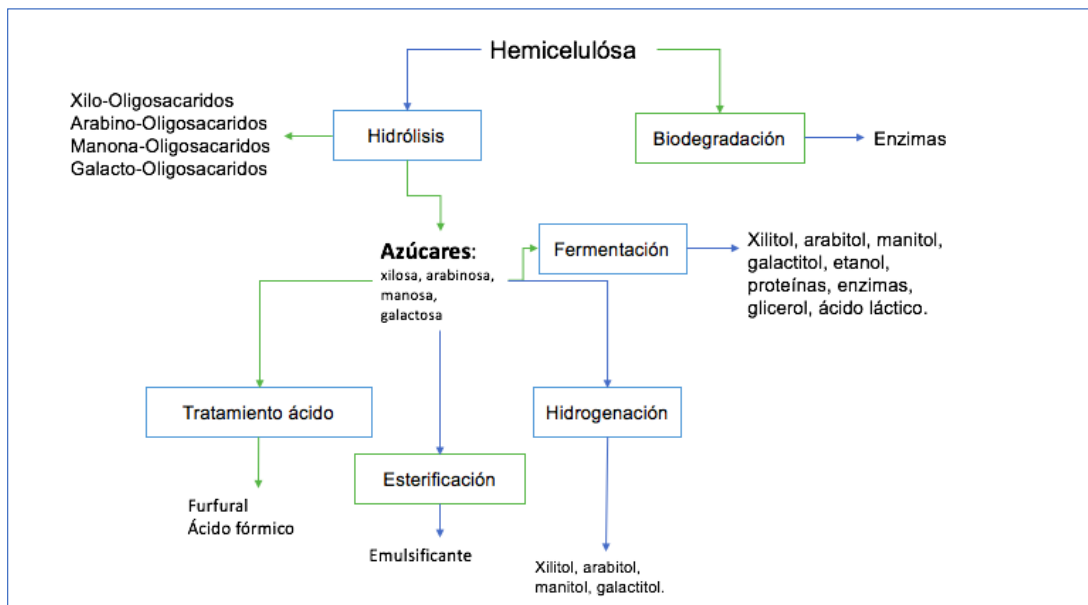


Figura 1.6 Alternativas y aplicaciones de la hemicelulosa obtenida de materiales lignocelulósicos

### 1.4.1 Celulosa

La celulosa es un homopolímero lineal, cristalino con repetidas cadenas de glucosa entrelazados por enlaces beta-glucosídicos, la celulosa es el principal constituyente de la pared celular en plantas (Figura 1.7), cual sostiene el soporte estructural y también se encuentra presente en bacterias, hongos y algas; la estructura molecular de la celulosa y las estructuras de las micro fibrillas son las que condicionan la hidrólisis de celulosa, puesto cuanto más ordenada y cristalina es la celulosa es menos soluble y más difícil degradar (Agbor *et al.*, 2011).

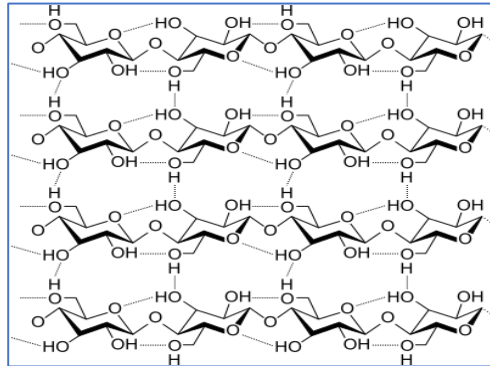
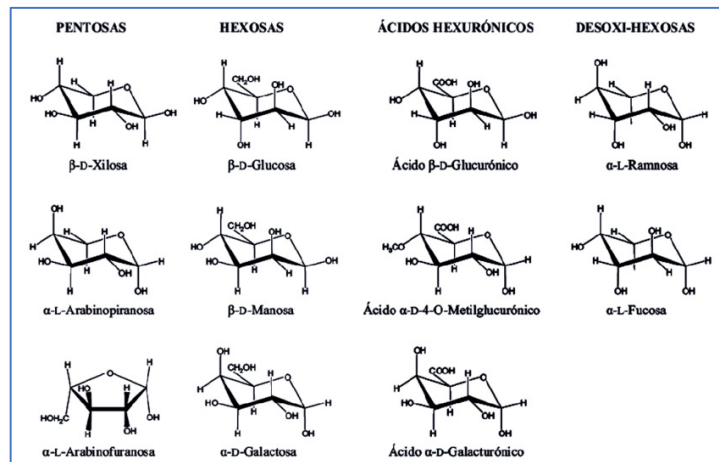


Figura 1.7 Estructura de cadenas contiguas de celulosa

### 1.4.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante de la masa biocelulósica presente entre un 20 a 50%, 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, los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3. En la Figura 1.8 se muestra la representación esquemática de los diferentes componentes hemicelulosicos (Rincón y Silva, 2014), los cuales tienen la característica de ser sensibles térmicamente. Se encuentran dentro de paredes celulares que sirven como recubrimiento de fibras de celulosa y se ha propuesto que debe eliminarse al menos el 50% de hemicelulosa para aumentar

significativamente la celulosa, sin embargo deben ser cuidadosos los parámetros de trabajo para evitar la degradación de la hemicelulosa a productos tales como furfurales e hidroximetil furfural, los cuales inhiben el proceso de fermentación, por esta razón la severidad de las condiciones de pretratamiento generalmente tienen el compromiso de maximizar la producción de azúcar y dependiendo del tipo de método que se use, la hemicelulosa podrá obtenerse como una fracción sólida o combinación de fracciones sólidas y líquidas (Agbor, 2011).



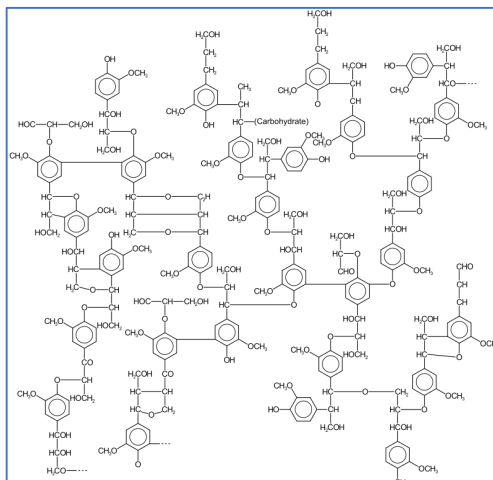
**Figura 1.8** Estructuras de componentes de las cadenas de hemicelulosa

### 1.4.3 Lignina

La lignina es un polímero tridimensional altamente ramificado con una variedad de grupos funcionales que proporcionan centros activos para interacciones químicas y biológicas. Los principales grupos funcionales incluyen los hidroxilos fenólicos, hidroxilos alifáticos, metoxilos, carbonilos y sulfonatos (Rincón y Silva, 2014), la molécula de lignina como se muestra en la Figura 1.9, presenta un elevado peso molecular que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico) (Taiz y Zeiger, 2006).

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





**Figura 1.9** Estructura de la molécula de lignina

La definición estructural de la lignina nunca ha sido tan clara como la celulosa y proteínas; debido a su complejidad, lo que afecta su aislamiento, análisis de composición y caracterización estructural (Rincón y Silva, 2014).

La lignina es una red amorfa heteropolimérica de unidades de fenilpropano unidos por diferentes enlaces, en este compuesto la lignina se identificó como un gran impedimento para la hidrólisis enzimática y microbiana, estudios han demostrado que la digestibilidad de la biomasa es mejorada con el aumento de eliminación de lignina, además de ser una barrera física, los efectos perjudiciales de la lignina incluyen: adsorción de enzimas hidrolíticas a lignina, interferencia y unión no productiva de enzimas celulíticas a complejos de lignina-carbohidratos y toxicidad de derivados de lignina a los microorganismos (Agbor *et al.*, 2011).

### 1.5 Pretratamientos lignocelulósicos

Los pretratamientos lignocelulósicos tienen como objetivo desintegrar la matriz celulosa, hemicelulosa y lignina, de tal manera que la celulosa reduzca al máximo su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático como se muestra en la Figura 1.10 (Abril y Navarro, 2012).

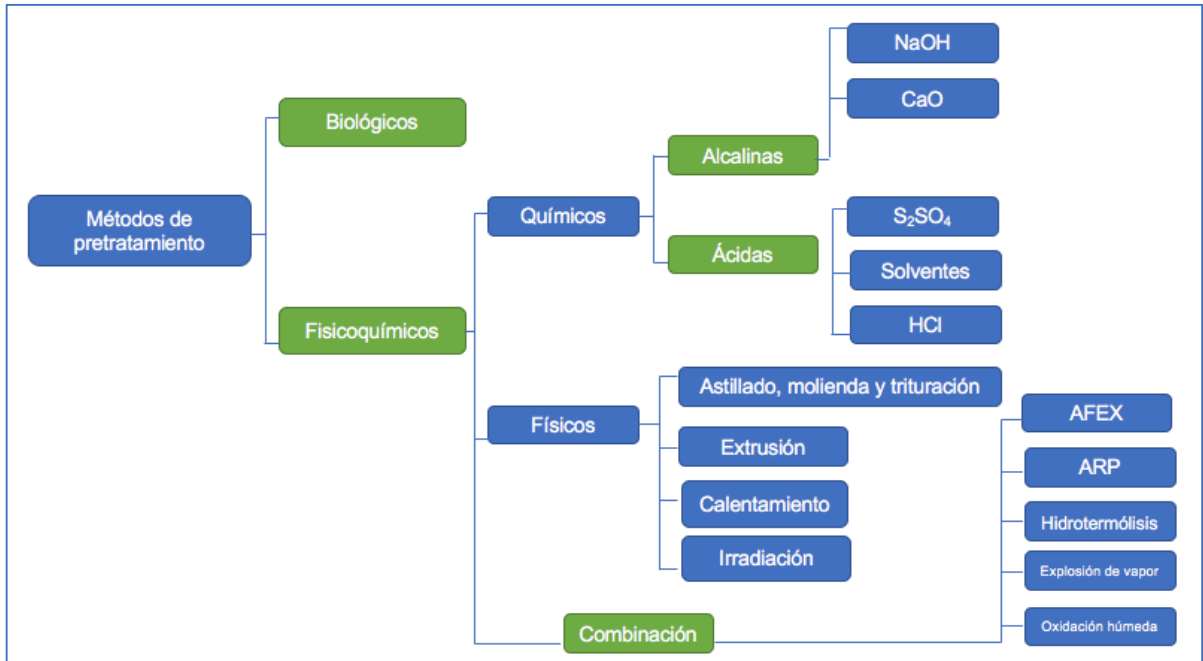


Figura 1.10 Métodos de pretratamientos de masa lignocelulósica

### 1.5.1 Tratamientos químicos

Los tratamientos químicos son generalmente empleados para remover el contenido de lignina a los residuos agroindustriales. El uso de agentes alcalinos o ácidos son empleados comúnmente en la industria del papel para la recuperación de celulosa y producción del mismo. Estos procesos tienden a incrementar el costo del proceso, es por eso por lo que se deben seleccionar agentes químicos que permitan la posterior recuperación y aprovechamiento de los subproductos generados (Dopico *et al.*, 2014).

#### 1.5.1.1 Hidrólisis ácida

Es un proceso químico que emplea catalizadores ácidos para transformar las cadenas de polisacáridos que forman biomasa en sus monómeros elementales. Este tipo de hidrólisis utiliza diferentes clases de ácidos: sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico, siendo solamente usados a nivel industrial los ácidos clorhídrico y sulfúrico. Los métodos industriales de hidrólisis ácida se

agrupan en dos tipos: lo que emplean ácidos concentrados (10 - 30%), trabajan a bajas temperaturas (170 - 190°C) y mayor tiempo de residencia; y los que utilizan ácidos diluidos (1 - 5%), a temperaturas más altas (160 - 240°C) y tiempos cortos de reacción (Liu y Wyman, 2003).

La principal reacción que ocurre durante el pretratamiento ácido es la hidrólisis de la hemicelulosa, generando especialmente xilanos como el glucomanano. La hemicelulosa puede ser sometida a reacciones hidrolíticas produciendo monómeros, como furfural, hidroximetil furfural y otros productos (Liu y Wyman, 2003).

#### **1.5.1.2 Hidrólisis alcalina**

Se lleva a cabo con NaOH diluido donde se sumerge el material lignocelulósico, a 60°C por 24 h, produciendo un hinchamiento de la biomasa, teniendo lugar reacciones como solvatación y saponificación. Esto provoca un estado de inflamación de la biomasa, lo que la hace más accesible por enzimas y bacterias (Sánchez-Riaño, 2009).

#### **1.6 Hidrólisis enzimática**

La hidrólisis de la celulosa es efectuada a través de las enzimas denominadas celulasas, las cuales son altamente específicas. Usualmente, los productos de la hidrólisis son azúcares reductores, incluyendo celulosa y glucosa. Tanto las bacterias como los hongos son capaces de producir enzimas para la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos. Estos microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios, mesófilo o termófilos, sin embargo, los anaerobios tienen una velocidad de crecimiento lento, así como requerimientos de crecimiento de acuerdo con su condición, es por eso que la mayor parte de la investigación de producción de enzimas ha sido a partir de hongos (González *et al.*, 2011).

### 1.6.1 Tipos de celulasa

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción de sinergia de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa. El sistema de celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- $\beta$ -1,4- glucanasa (1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolasa), la exo- $\beta$ -1,4-glucanasa (1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasa) y la  $\beta$ -1,4- glucosidasa (celobiasa) ( $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasa) (Ovando y Waliszewski, 2005).

### 1.6.2 Mecanismo de hidrólisis enzimática

El mecanismo propuesto en la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero la endo  $\beta$ -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración  $\beta$  de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las micro fibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de exo- $\beta$ -1,4-glucanasa (Ovando y Waliszewski, 2005).

En la segunda etapa actúa la exo  $\beta$ -1,4- glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4  $\beta$ -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa. Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis (Ovando y Waliszewski, 2005). Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que

limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -1,4- glucosidasa, porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa (Ovando y Waliszewski, 2005).

### 1.7 Residuos lignocelulósicos

El uso de material lignocelulósico como materia prima para la producción limpia de etanol, parece ser una atractiva solución dada la tendencia al uso de alimentos para su producción. La composición de un material lignocelulósico varía dependiendo diversos factores como la especie, nutrientes, ubicación entre otros; en la Tabla 1.3 muestra la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina contenida en diferentes materiales de esta naturaleza (Cuervo *et al.*, 2009).

**Tabla 1.3** Composición estructural de diferentes materiales lignocelulósicos

Material lignocelulósico.	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cascara 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

### 1.8 Fermentación

Las fermentaciones son reacciones en las que una materia orgánica se convierte en un producto por la acción de microorganismos (levaduras, algas, mohos, protozoos, entre otros) o por la acción de enzimas (sustancias químicas producidas por microorganismos) (Levenspiel y Conesa, 2004).

En particular la última etapa del proceso de generación de etanol (Figura 1.1) consiste en la fermentación por levaduras de la glucosa liberada a partir de la celulosa, así como la de los azúcares procedentes de la hemicelulosa y principalmente de la celulosa que se han liberado durante los pretratamientos de hidrólisis anteriores. La levadura contiene una enzima llamada invertasa, que actúa como catalizador ayudando a convertir los azúcares como glucosa y fructosa, a alcohol (García y García, 2006).

### **1.8.1 Levaduras autóctonas**

Las levaduras son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color, los constituyentes macromoleculares incluyen glicoproteínas, polifosfatos, ácidos nucleicos, su pared celular comprende entre 15 y 25 % de la masa seca de la célula y sus principales componentes son polisacáridos (80-90 %), esencialmente glucanos y mananos, con una menor contribución de quitina, además de proteínas y lípidos. El contenido de proteínas en las levaduras varía entre el 40 y 50% de su peso seco y tienen una excelente calidad en función de su perfil de aminoácidos esenciales. La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4.5 a 6.5 (Suarez *et al.*, 2016).

La *Saccharomyces cerevisiae* ITV01, es una levadura autóctona que fue aislada de melaza de caña de azúcar y seleccionada de entre 103 cepas en función de su rendimiento de etanol, capacidad de crecer en altas concentraciones de sustrato (mayor a 200 g/L) y resistencia al etanol (4%) (Partida, 2017).

### **1.8.2 Nutrientes para medio de cultivo**

Los compuestos orgánicos e inorgánicos en un medio de cultivo desempeñan funciones de activadores o inhibidores para el crecimiento, y tal efecto dependerá

de su naturaleza y de las concentraciones en el medio de cultivo. Así también, cada levadura presenta requerimientos nutricionales diferentes, sin embargo, es posible generalizar sobre sus requerimientos de la siguiente forma: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, oligoelementos y factores de crecimiento (Ortiz, 2010).

**Carbono:** Las levaduras son organismos quimiorganotróficos porque obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos. Estos compuestos son generalmente azúcares, de los cuales la glucosa es la más empleada; sin embargo, no es el azúcar más efectivamente metabolizado para todas ellas. Las levaduras pueden asimilar azúcares tales como hexosas, pentosas, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, así como también alcoholes, ácidos orgánicos, ácidos grasos, hidrocarburos y compuestos aromáticos. Sólo una pequeña proporción (5%) de sus requerimientos de carbono pueden ser incorporados del dióxido de carbono (Walker, 1998).

**Hidrógeno:** Es disponible de carbohidratos y otras fuentes. Los iones hidrógeno (protones) son muy importantes en la fisiología de las levaduras debido a la variación del pH intracelular y extracelular tienen una importante influencia en el crecimiento y metabolismo de las levaduras (Walker, 1998).

**Oxígeno:** La mayoría de las levaduras son organismos aerobios; en cuanto a los requerimientos de oxígeno, las levaduras se pueden clasificar en: aerobias estrictas y anaerobias facultativas. De manera específica, las levaduras requieren oxígeno para la oxidasa de función mixta. La influencia del oxígeno y la disponibilidad de azúcares son los factores que dirigen el metabolismo de los carbohidratos bajo los efectos de represión catabólica (Walker, 1998).

**Nitrógeno:** Puede ser utilizado por las levaduras de diversas formas, ya sea como compuesto orgánico o inorgánico. El sulfato de amonio y fosfato diamónico son las sales más utilizadas como fuente de nitrógeno, ya que aportan, al mismo tiempo,

azufre y fósforo que la célula necesita. El ion amonio es empleado por las levaduras para la formación de ácido glutámico, que actúa como donador de un grupo amino para la síntesis de otros aminoácidos para la célula (Aguilar, 1998).

**Azufre:** Las levaduras lo requieren, principalmente, para la síntesis de aminoácidos azufrados. Las fuentes de azufre pueden ser: sulfato, sulfito, tiosulfato, metionina y glutatión. Sin embargo, el sulfato inorgánico y la metionina son los compuestos centrales del metabolismo del azufre en levaduras. Casi todas las levaduras pueden sintetizar aminoácidos azufrados a partir del sulfato (Aguilar, 1998).

**Fósforo:** Necesario para el crecimiento de las levaduras. Es asimilado por la célula en la forma de ortofosfato monovalente, la forma divalente no es muy usada. El fósforo se encuentra añadido al medio en forma de sales. También mantiene la integridad de la pared celular y participa de forma importante en el metabolismo energético de los microorganismos, además participa en la síntesis de lípidos (Aguilar, 1998).

**Oligoelementos:** Estos son necesarios en la célula en cantidades muy pequeñas, debido a que actúan generalmente como cofactores de diversas enzimas implicadas en el metabolismo microbiano. Se encuentran en forma de sales y su concentración tiene gran importancia; son tóxicas cuando son usadas en exceso (Kocková-Kratochvílová, 1990).

**Factores de crecimiento:** Se le denomina factor de crecimiento a aquel compuesto indispensable que el microorganismo no puede sintetizar y que es fácilmente asimilable y de rápido consumo al inicio de la fermentación. Los factores de crecimiento más empleados en levaduras son: vitaminas (biotina, tiamina y piridoxina) y esteroides como el ergosterol (Aguilar, 1998).



## 1.9 Procesos de fermentación

El cultivo de microorganismos, tanto en el laboratorio como en la industria, ha sido tratado más como un arte que como una ciencia, y a menudo empleando la intuición en lugar de la lógica. Frecuentemente las industrias de procesos bioquímicos se encargan del aprovechamiento, bajo condiciones controladas, de materiales biológicos tales como microorganismos, tejido celular animal, productos microbianos y enzimas (Quintero, 1981).

Los procesos de fermentación, generalmente, se clasifican en dos grupos (Quintero, 1981):

*Procesos por lotes:* Es un sistema cerrado donde iniciado el proceso (al mezclar los nutrientes y microorganismos), sólo se adiciona oxígeno, antiespumantes y bases o ácidos para el control de pH, la fermentación se lleva a cabo en un periodo definido de tiempo, durante el cual varía la composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la de metabolitos (Hernández, 2003).

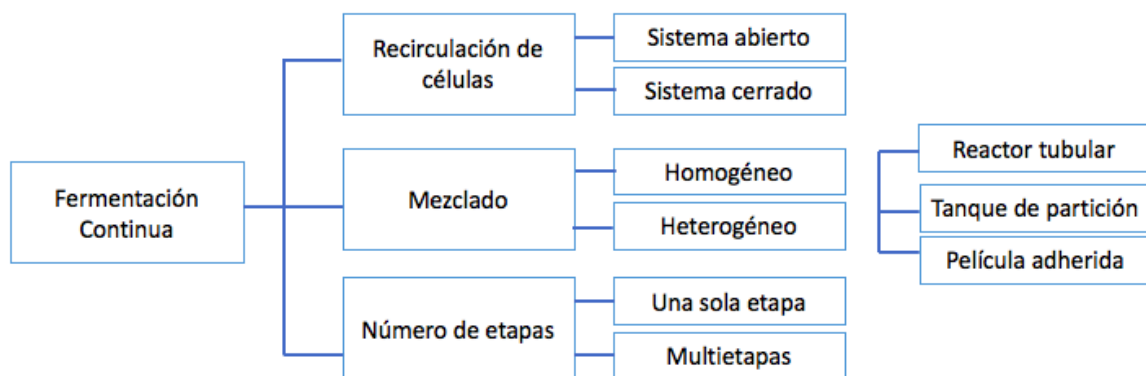
*Procesos continuos:* Las técnicas de cultivo continuo fueron desarrolladas durante la segunda mitad del siglo XX. Existen dos formas básicas de cultivo continuo: el cultivo de flujo tapón y el quimiostato. En el cultivo de flujo tapón ideal, el cultivo se transporta sin mezclarse a través de un tubo o canal. Un quimiostato consiste en un tanque agitado con una suspensión de biomasa perfectamente mezclada y homogénea, a la que se alimenta un medio fresco a una tasa constante; el caldo de fermentación es extraído a la misma velocidad de modo que el volumen permanece constante. Las plantas operadas en forma continua solo son rentables si se conocen los procesos bioquímicos y de regulación de los microorganismos en cultivo continuo, una vez fijada su velocidad específica de crecimiento (Quintero, 1981).

Las ventajas del cultivo continuo se fundan principalmente, en (Quintero, 1981):

1. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) puede establecerse (dentro de los límites del organismo) de acuerdo a las necesidades del experimento. Se puede seleccionar un estado de actividad metabólico particular y el control de éste.
2. Se pueden obtener células en un estado definido independientemente del tiempo.
3. Con equipo de laboratorio se pueden producir, comparativamente grandes cantidades de material celular definido.

Esto contrasta con los métodos por lote en los que, dado el sistema de parámetros variables, no se pueden controlar las reacciones. Debido a que la concentración de sustrato (S) es una función del tiempo (t), la regulación intrínseca representa un estado transitorio en constantes de tiempo muy pequeñas (Quintero, 1981).

Los sistemas de cultivo continuo pueden clasificarse desde varios puntos de vista representado los tipos y prácticas de mayor aplicación. Siguiendo los criterios de recirculación de células, mezclado y número de tanques, es posible describir los sistemas de cultivo continuo para diferentes organismos como se muestra en la Figura 1.11 (Quintero, 1981).



**Figura 1.11** Categorías y clasificación de fermentación continua

De acuerdo con estos criterios un quimiostato es un sistema abierto, homogéneo y de una sola etapa. Para mantener en operación un sistema continuo es necesario alcanzar y mantener un flujo permanente y constante (Partida, 2017).

Durante las operaciones de estado estacionario no deben ocurrir cambios en la concentración del sustrato, en el número de células y en la concentración intracelular de metabolitos. Como resultado de las condiciones ambientales constantes (aireación, nutrición, pH, temperatura), las propiedades regulatorias de las células alcanzan estabilidad durante largos períodos de tiempo (Partida, 2017).

Mediante el cultivo continuo es posible estudiar el efecto sobre el proceso, variables como pH, temperatura, concentración de nutrientes, entre otros, manteniendo constante el valor de  $\mu$ , o bien, fijadas las anteriores, analizar el efecto de  $\mu$  sobre el proceso. De tal modo que es posible separar los distintos efectos y obtener información valiosa para la mejora del proceso (Partida, 2017).

Para poner en marcha un cultivo continuo, se realiza previamente un cultivo por lote y en un momento dado, principalmente cuando se agota el sustrato limitante, se comienza a alimentar el fermentador con medio de cultivo fresco y al mismo tiempo se extrae medio, esto a un flujo establecido, de esta forma se logra que el volumen de cultivo permanezca constante dentro del fermentador. El flujo de salida contendrá células, mientras que la concentración de nutrientes será menor que en el flujo de entrada debido a que en parte fueron consumidos por los microorganismos. Eventualmente se encontrará también algún producto o productos provenientes de la actividad metabólica de los mismos, una de las variables de operación fundamental en este tipo de cultivos es la tasa de dilución ( $D$ ), la que se define como la relación entre el flujo de alimentación ( $F$ ), y el volumen del medio en el fermentador ( $V$ ). El valor dado de  $D$  corresponde a las veces que se renueva el volumen del biorreactor por unidad de tiempo. La concentración de microorganismos se mantiene constante a través del tiempo, puesto que estos continúan multiplicándose, esto hace que se opere en un régimen de estado

estacionario. Así como también se mantendrán constantes en el tiempo las concentraciones de nutrientes y productos (Corro, 2010).

### 1.10 Balances de materia en cultivo por lotes

El comportamiento del cultivo por lotes se describe a partir de los modelos matemáticos (Tabla 1.4), que describen las cinéticas y velocidades de consumo de sustrato y producción de etanol.

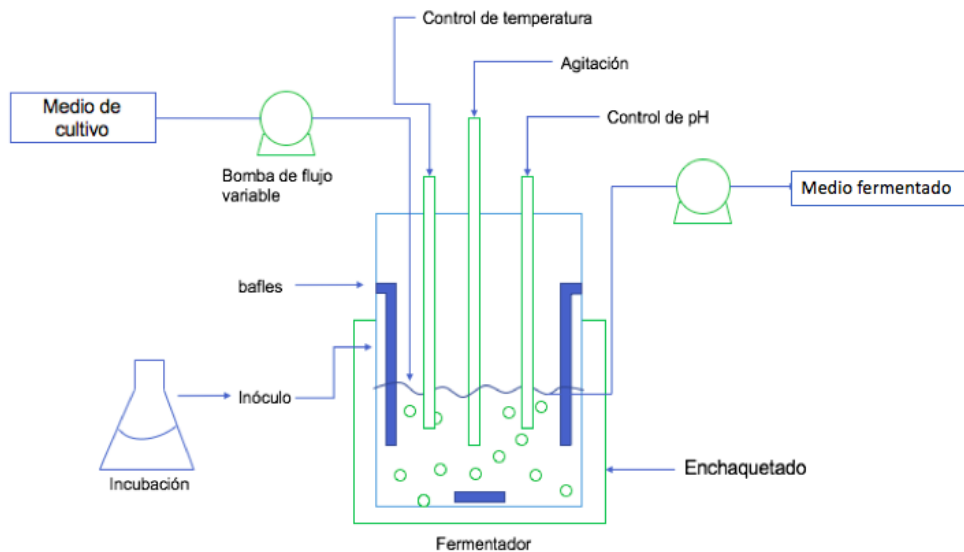
**Tabla 1.4** Ecuaciones de balance de materia en cultivo por lotes

VARIABLE	ECUACIÓN	NO.
<b>Rendimientos y productividad</b>		
Rendimiento (g biomasa / g sustrato)	$Y_{x/s} = \frac{x_f - x_0}{s_0 - s_f}$	(1.2)
Rendimiento $Y_{p/s}$ (g de producto / g de sustrato)	$Y_{p/s} = \frac{p_f - p_0}{s_0 - s_f}$	(1.3)
Productividad volumétrica del cultivo $Q$ (g producto / L h)	$Q = \frac{p_f}{t_f}$	(1.4)
<b>Velocidades globales</b>		
Producción de biomasa $r_x$ (g/Lh)	$r_x = \frac{dx}{dt}$	(1.5)
Consumo de sustrato $r_s$ (g/Lh)	$r_s = \frac{ds}{dt}$	(1.6)
Producción de producto $r_p$ (g/Lh)	$r_p = \frac{dp}{dt}$	(1.7)
<b>Velocidades específicas</b>		
Crecimiento de microorganismos $\mu$ ( $h^{-1}$ )	$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$	(1.8)
Consumo de sustrato $vs$ (g/gh)	$vs = \frac{1}{x} \frac{ds}{dt}$	(1.9)
Generación de producto $vp$ (g/gh)	$vp = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt}$	(1.10)

Quintero, 1981; Partida, 2017

### 1.11 Balances de materia en cultivo continuo

El quimiostato (Figura 1.12), es un cultivo al que se introduce continuamente medio fresco a una velocidad uniforme, el volumen del cultivo se mantiene constante por extracción uniforme del medio de cultivo, donde al igual que el cultivo por lotes el cultivo continuo se basa en el modelo de Monod (Ec. 1.11), en donde la entrada de medio fresco de cultivo a una concentración  $S_0$  y un flujo volumétrico constante dividida por el volumen del cultivo se denomina tasa de dilución (Ec. 1.12), representando la única variable en el sistema (Quintero, 1981).



**Figura 1.12** Representación de un sistema de cultivo continuo

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \quad (1.11)$$

$$D = \frac{F}{V} \quad (1.12)$$

Para un cultivo en estado estacionario cuando  $dx/dt = 0$  la tasa de dilución es igual a  $\mu$  como se muestra en la Ec. 1.13

$$D = \mu \quad (1.13)$$

Para obtener los valores de S y X en régimen permanente se parte de la Ec. 1.11 para obtener las Ec. 1.14 y 1.15

$$S = \frac{K_S D}{\mu_{max} - D} \quad (1.14)$$

$$X = Y \left( S_0 - \frac{K_S D}{\mu_{max} - D} \right) \quad (1.15)$$

La dilución máxima puede obtenerse cuando  $S=S_0$  e insertando este valor en la Ec. 1.11 resultando la Ec. 1.16, donde es el valor máximo de D

$$\mu = D_{critica} = \frac{\mu_{max} S_0}{K_S + S_0} \quad (1.16)$$

En un quimiostato la producción de biomasa por unidad de volumen por unidad de tiempo se denomina productividad P, como se muestra en la Ec. 1.17

$$P = Dx \quad (1.17)$$

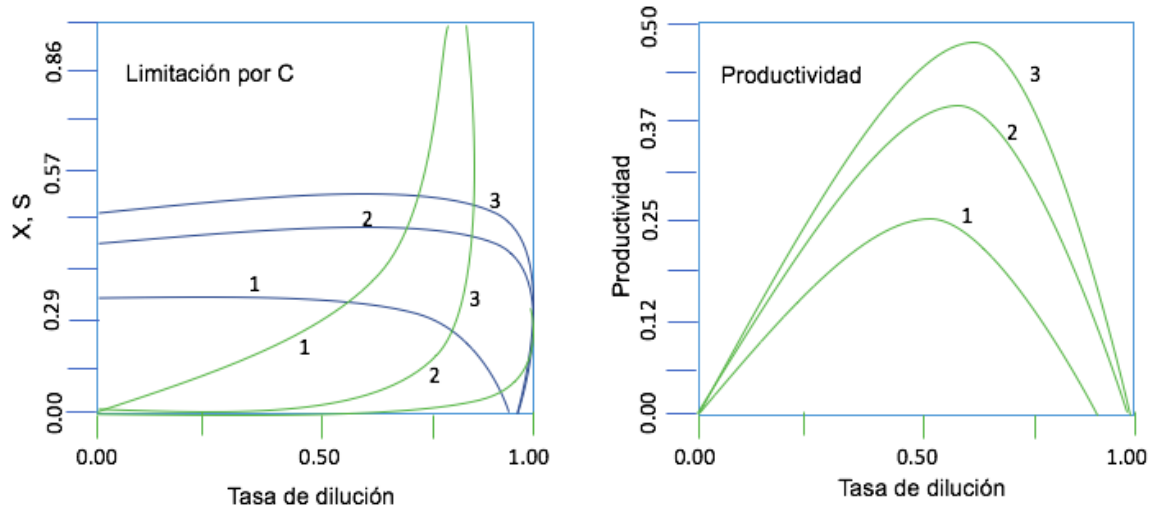
Lo importante es encontrar el valor máximo del este producto, para ello se diferencia la Ec. 1.17 y se igual a 0, donde la solución representa un máximo

$$D_{max} = \mu_{max} \left( 1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + S_0}} \right) \quad (1.18)$$

Al sustituir la Ec. 1.18 en la Ec. 1.15 se obtiene el crecimiento máximo de microorganismos en el cultivo como se muestra en la Ec. 1.19

$$x_{max} = Y \left[ S_0 + K_S - \sqrt{K_S (K_S + S_0)} \right] \quad (1.19)$$

La Figura 1.13 es una representación de las Ecs. 1.17, 1.18 y 1.19 en la que se ve como se afecta la productividad respecto a  $K_S$ , en este sentido es conveniente aclarar que, dependiendo el sustrato,  $K_S$  varia para un mismo organismo (Quintero, 1981).



**Figura 1.13** Efecto de  $K_s$  en la concentración celular ( $X$ ) y en la productividad de un cultivo continuo. Parámetros:  $Y_s=0.5$ ,  $S_0=1.0$  g/L,  $\mu_{max}=1$ , los valores de  $K_s$  se representan como; 1 (0.1 g/L), 2 (0.01 g/L) y 3(0.001 g/L)

## 1.12 Antecedentes

Rafiqul y Sakinah., (2012) estudiaron el efecto de hidrólisis ácida sobre aserrín de madera, para la generación de xilosa, evaluando los factores; tiempo (10-120 min), temperatura (105-130°C), concentración de ácido (2%-12%) y la relación sólido-líquido (8-20 g/g), siguiendo una metodología experimental OFAT, encontrando una combinación óptima de operación a 60 min con una temperatura de 125°C y una concentración de ácido al 4% en una RSL 8 g/g, encontrando concentraciones de xilosa de 17.9 g/L, evaluando dicha concentración con un rendimiento de proceso del 86%.

Pérez-Sariñana y Saldaña-Trinidad, (2014) realizaron una investigación dirigida a la producción de bioetanol a partir de mucílago de café caracterizando el proceso a nivel laboratorio. Partiendo de una concentración de azúcares por parte del sustrato de 60 g/L, se realizó un cultivo por lotes utilizando *Saccharomyces cerevisiae* Y2034, suplementando por sales minerales en una porción de 0.02 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.02 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$  y 2 g/L de extracto de levadura, a 30°C con una agitación de 150 rpm a un pH de 5, durante 16 h con una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  ufc/mL. Obteniendo un consumo de azúcares del 98%, reportando una

afinidad al sustrato con una  $K_s$  de 2.1 g/L con una velocidad de crecimiento bacteriano ( $\mu$ ) de 0.361 h<sup>-1</sup>.

Wang *et al.*, (2014) Implementaron y estudiaron el efecto del H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en combinación como un tratamiento alternativo a materiales lignocelulósicos, utilizando como sustrato para las hidrólisis a un conjunto de mezcla de madera suave y un conjunto de mezcla de maderas duras, la concentración de la mezcla de buffer fue de 80% y 1.77% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente, generando una remoción del 71% al 91% del contenido de lignina y en ambos materiales hubo una remoción de hemicelulosa aproximada al 95%. En la hidrólisis enzimática se utilizó una enzima celulosa comercial *Trichoderma reesei* ATCC26924, generando conversiones de glucosa del 90%, donde se detectó que a mayor concentración de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> sin importar la variabilidad de tamaños de partículas, se obtienen conversiones del 94.9% y 100%.

Santos *et al.*, (2015) estudiaron la fermentación alcohólica mediante cepas de levaduras modificadas con características floculantes *Saccharomyces cerevisiae* C2/00, en un sistema de fermentación de dos reactores con sistema de reciclaje de células a una tasa de 1 a 12 mL/s, en una operación continua, mediante un diseño experimental central compuesto evaluando la concentración de azúcares ( $X_1$ ), la tasa de reciclo ( $X_2$ ) y el tiempo de residencia ( $X_3$ ), de los cuales los puntos encontrados en la optimización respectivamente fueron:  $X_1$  de 225 g/L,  $X_2$  de 5 mL/s y  $X_3$  de 8 h con rendimientos del 92% con una productividad de 12.11 g/Lh, la configuración y montaje del equipo de fermentación permitió que fluyera sin obstrucción, flotación o arrastre de células, dicho estudio mostró una conversión casi completa del azúcar para concentraciones de sacarosa de entrada de aproximadamente de 200 g/L.

Tan *et al.*, (2015) evaluaron la fermentación continua para la generación de etanol a partir de jugo de remolacha mediante *Saccharomyces cerevisiae* floculante KF-7, donde sus estudios preliminares de fermentación por lotes demostró que la adición



de nutrientes minerales no mejora la concentración de etanol, pero acelera la tasa de fermentación, con una tasa de dilución de  $0.1 \text{ h}^{-1}$  y  $0.3 \text{ h}^{-1}$ , el estudio se realizó en dos etapas con una concentración inicial de azúcar de  $190 \text{ g/L}$ , generando una concentración de etanol, rendimiento y productividad de  $70.7 \text{ g/L}$ ,  $89.8\%$  y  $21.2 \text{ g/L h}$  respectivamente, concluyendo que el aumento de sus tasas dilución investigadas no influyen en la concentración de etanol y viabilidad de las células de levadura, pero si en la productividad del proceso, otra conclusión sobresaliente es el que la levadura se mantuvo constante, es decir, la *Saccharomyces cerevisiae* floculante *KF-7* presentó gran tolerancia al alcohol.

Ariyajaroenwong *et al.*, (2016) desarrollaron y analizaron modelos cinéticos para la fermentación discontinua y continua, a partir del jugo de sorgo dulce de *Saccharomyces cerevisiae* *NP 01* inmovilizada en trozos de tallo de sorgo dulce sin pelar. Los modelos representaron la limitación, inhibición del sustrato, la inhibición del etanol y la muerte celular. Se hicieron fermentaciones en lote de etanol a partir de zumo que contenía varias concentraciones iniciales de azúcar ( $120\text{-}280 \text{ g/L}$ ). Encontraron que los valores estimados de la tasa de crecimiento específico máximo ( $\mu_{\text{max}}$ ) y de la constante de Monod ( $K_s$ ) eran  $0.313 \text{ h}^{-1}$  y  $47.51 \text{ g/L}$ , respectivamente, usando un diagrama de Lineweaver-Burk, los datos fueron utilizados para desarrollar modelos fermentativos de forma discontinua y continua para la fermentación por lotes, se encontró que los modelos podrían utilizarse para ajustar satisfactoriamente los datos experimentales para concentraciones iniciales de azúcar que oscilan entre  $130$  y  $225 \text{ g/L}$ . Sin embargo, para la fermentación continua, sólo los datos para el consumo de sustrato y la producción de etanol fueron bien ajustados por los modelos desarrollados.

Wang *et al.*, (2016) estudiaron el efecto de la hidrólisis ácida diluida, evaluando la concentración de ácido y tiempo a condiciones de temperaturas suaves, con el objetivo de establecer las condiciones óptimas de pretratamiento como proceso previo a la sacarificación, los resultados de las variables exploradas fueron una concentración de ácido de  $5.3\%$  (p/p) en un tiempo de reacción de  $118 \text{ min}$ ,

generando una concentración de azúcares reductores de 563 mg/g durante el proceso de hidrólisis ácida. Posteriormente se realizó un cultivo utilizando *Lipomyces starkeyi* para la fermentación del sustrato sin presentar inhibición durante el proceso, logrando una conversión del 81.5% sugiriendo en base a sus resultados que la aplicación de un pretratamiento como la hidrólisis ácida antes de la sacarificación tiene gran potencial de convertir los carbohidratos en azúcares reductores obteniendo altos rendimientos, realizando aportes para procesos a gran escala como lo son las biorefinerías.

Thani *et al.*, (2016), evaluaron la variación de fermentación del potencial redox durante una fermentación continua, con reciclo de células el cual se hizo funcionar utilizando dos fibras huecas (HF) de membranas con tamaños de poro 0.20 y 0.65  $\mu\text{m}$ , a tres velocidades de dilución 0.02  $\text{h}^{-1}$ , 0.04  $\text{h}^{-1}$  y 0.08  $\text{h}^{-1}$  utilizando *Saccharomyces cerevisiae* NP 01 la cual se recicló en el fermentador con una relación de reciclado de 0.625. Acondicionado con un sistema de aireación a 2.5 vvm durante las primeras 4 h y luego se suministró continuamente al 0.25 vvm. A medida que se estableció el estado estacionario, los resultados mostraron que en la fermentación el potencial redox era menor para los procesos que emplean la recirculación celular, que los que no. A la misma dilución la utilización de azúcar y la producción de etanol con células recirculadas fueron más altas. La mayor eficiencia de fermentación obtenida fue 87.94 g/L de etanol, y una productividad teórica de 90%, donde se consiguió usando la membrana de HF de 0.2  $\mu\text{m}$  de recirculación de células a una velocidad de dilución de 0.02  $\text{h}^{-1}$ , concluyendo principalmente que la cantidad de producción de etanol fue inversamente proporcional a la tasa de dilución. El cambio del perfil de potencial redox fue independiente del tamaño de poro de la membrana, pero fue inversamente relacionado con la tasa de dilución.

Thani *et al.*, (2017) realizaron mejoras a sus estudios de fermentación continúa utilizando jugo de sorgo dulce, utilizando recirculación de células *Saccharomyces cerevisiae* NP 01, las variables del proceso fueron la velocidad de aireación y

relación de reciclado en un sistema fermentación continua con reciclado celular (CRS), los jugos de sorgo dulce se optimizaron utilizando la metodología de superficie de respuesta, el estudio se realizó con una concentración inicial de células de  $2.0 \times 10^7$  cell/mL, a una temperatura de  $30^\circ\text{C}$  con una agitación de 200 rpm, trabajando una tasa de dilución de  $0.08 \text{ h}^{-1}$  explorada por investigaciones previas, con una razón de reciclo de 0.625, 1.25 y 1.875. Los resultados de RSM revelaron que la tasa de aireación y la relación de reciclado óptimas eran de 0.25 vvm y 0.625, respectivamente. El experimento de validación bajo condiciones óptimas indicó alta precisión y fiabilidad del experimento, logrando una concentración de etanol de 99.28 g/L, y una productividad de 98.01 g/Lh. La composición intracelular de la levadura, es decir, ácidos grasos insaturados, ácidos grasos totales, ergosterol y trehalosa, se relacionó positivamente con la eficiencia de fermentación y la respuesta adaptativa de levadura bajo estrés etanol.

Arora *et al.*, (2017) estudiaron el mejoramiento en la producción de etanol a través de la herramienta estadística de la metodología de superficie de respuesta optimizando los componentes de los medios para el crecimiento y fermentación de aislados termotolerantes de levaduras *Kluyveromyces marxianus* NIREK1 y NIRE-K3. Se utilizaron cinco sales diferentes en el Diseño Central Compuesto centrado, con las respuestas de la formación de biomasa y la producción de etanol para el crecimiento y la fermentación, respectivamente. Encontraron que el extracto de levadura y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  eran los componentes clave del medio para el crecimiento y la fermentación que se revela a partir de su interacción en ambos aislados de levadura. Los estudios adicionales sobre la cinética de fermentación discontinua utilizando los valores optimizados de la composición del medio para *K. marxianus* NIRE-K1 y NIRE-K3 dieron como resultado una concentración final de etanol de 17.73 (86.27% del rendimiento teórico en etanol) y 19.01 g/L (94.12% etanol), respectivamente. Un aumento en el rendimiento del etanol y la productividad.

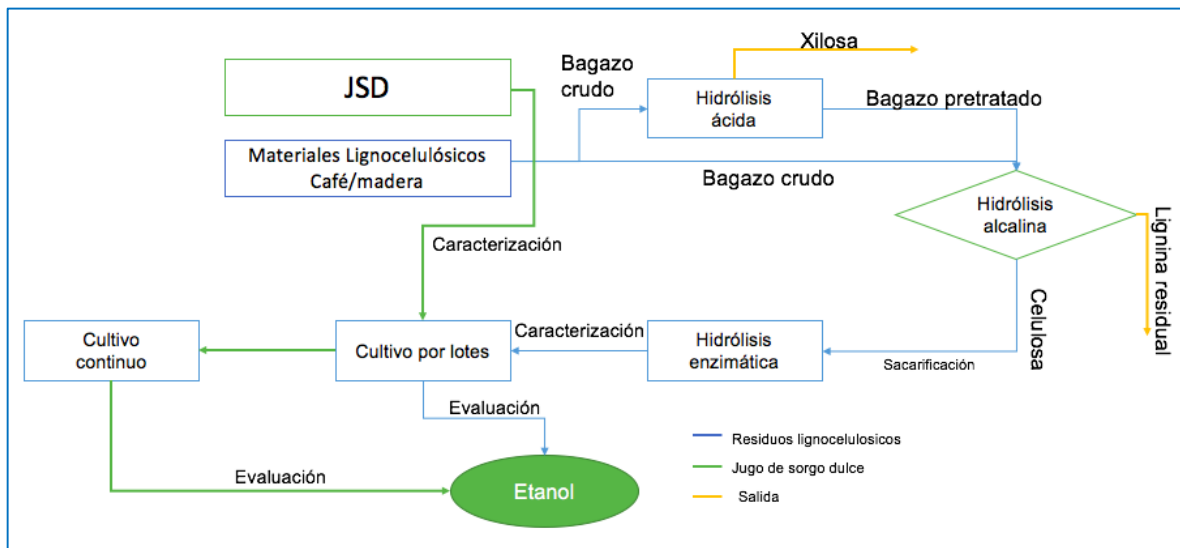
## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPITULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Metodología general

El proceso de estudio de generación de etanol de primera y segunda generación se muestra en la Figura 2.1, donde se observan las etapas de proceso, tratamientos estudiados y optimizados de la operación, como aporte al estado del arte en el área de energéticos. Para fines de esta investigación en los capítulos 2 y 3 se denominó a la cascarilla de café como CC y a la mezcla de bagazo de madera se denominó RMR.



**Figura 2.1** Estructura general del proceso de estudio de generación de etanol de 1ra y 2a generación

#### 2.1.1 Caracterización del material lignocelulósico

El material lignocelulósico residual de CC y RMR se obtuvieron del beneficio Fortuna ubicado en el municipio de Huatusco, Veracruz y de una carpintería local del municipio de Orizaba, Veracruz, respectivamente, los cuales se utilizaron con el tamaño de partícula en el que se encuentran y se sometieron a caracterización del material, determinando; humedad mediante la termobalanza AMB-50, determinación total de grasas y aceites se determina mediante la técnica

estandarizada, AOCS Cc 6a-40 (AOCS, 2017), composición lignocelulósica se realiza mediante la técnica Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, estandarizada por el National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter *et al.*, 2008) evaluando la composición porcentual de celulosa, hemicelulosa y lignina inicial. La caracterización del contenido de azúcares presentes en el JSD se realizó por HPLC.

## 2.2 Hidrólisis ácida

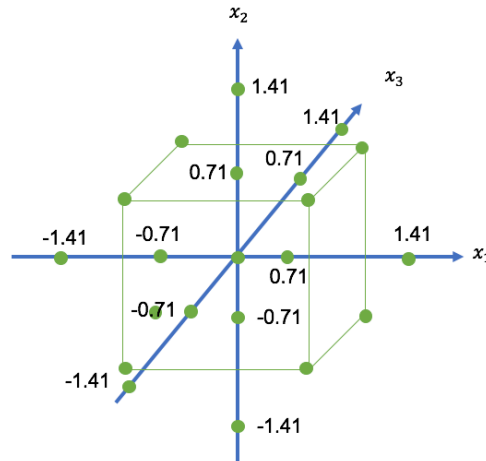
### 2.2.1 Estudio preliminar de hidrólisis ácida

El estudio preliminar de HA se realizó mediante un diseño híbrido de optimización (DHO), cuyos niveles de experimentación se presentan en la Tabla 2.1

**Tabla 2.1** Niveles de operación del proceso de hidrólisis ácida mediante DHO sobre estructura lignocelulósica de CC y RMR

No.	Variables codificadas			Variables naturales		
	$X_{1ha}$	$X_{2ha}$	$X_{3ha}$	$X_{1ha}$ : Tiempo (min)	$X_{2ha}$ : [H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (% v/v)	$X_{3ha}$ : RSL (g:mL)
1	-1	-1	-1	15	1	1:5
2	0	0	0	30	2	1:7
3	1	1	1	45	3	1:9

Se empleó una autoclave marca AESA a una presión de 15 psia. En este estudio se evaluó la concentración de xilosa generada por el proceso y se cuantificó mediante HPLC descrita en la sección 2.10.5, este diseño experimental se empleó como un diseño explorador con la capacidad de llegar a optimizar el proceso debido a los rangos de experimentación de los puntos axiales extrapolados y la curvatura que ofrecen los puntos centrales del estudio (Figura 2.2), las cuales tiene como variables de exploración;  $X_{1ha}$ =tiempo (min),  $X_{2ha}$ = concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (% v/v) y  $X_{3ha}$ = relación sólido-líquido (RSL) (g:mL) sobre lotes de 20 g de CC y RMR.



**Figura 2.2** Matriz y estructura de diseño híbrido de optimización

Al terminar el proceso dentro de la autoclave, el bagazo resultante se prensó, filtró y lavó con un volumen de agua igual a la de la RSL empleada para la hidrólisis en la que fue tratada para alcanzar un pH de 7, para después exponerlo a un secado solar intermitente durante 48 h.

### 2.2.2 Optimización de hidrólisis ácida

La optimización del proceso de HA se realizó mediante diseño central compuesto (CDC) (Figura 2.3), esta técnica de optimización permitió evaluar la influencia significativa de los factores resultantes de la información proporcionada por DHO, cuyos niveles de operación se muestra en la Tabla 2.2, estableciendo como factor fijo para el CC una RSL de 1:6 (g:mL), mientras que para la RMR se estableció un tiempo constante para cada corrida experimental de 30 min.

**Tabla 2.2** Factores y niveles de operación de CDC para la optimización de la HA, sobre residuos lignocelulósicos

Nivel	CC		RMR	
	$X_{C1}$ ;Tiempo (min)	$X_{C2}$ ;[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (% v/v)	$X_{M1}$ ; RSL (g:mL)	$X_{M2}$ ;[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (% v/v)
-1	35	3	1:2.5	2
0	45	4	1:3.5	3
1	55	5	1:4.5	4

Al terminar el proceso dentro de la autoclave, el bagazo resultante se prensó, filtró y lavó con un volumen de agua igual a la de la RSL empleada para la hidrólisis en la que fue tratada para alcanzar un pH de 7, para después exponerlo a un secado solar intermitente durante 48 h. Después del tratamiento de acondicionamiento del bagazo, se evaluó como variable de respuesta el contenido de hemicelulosa.

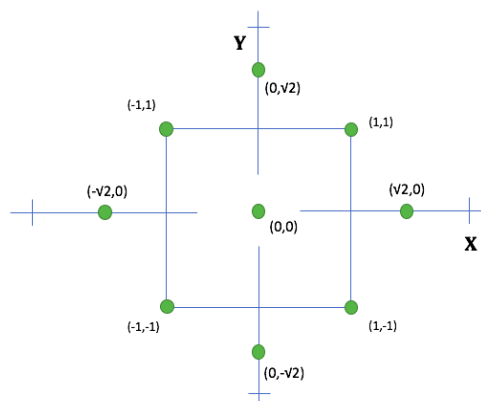


Figura 2.3 Matriz y estructura de CDC equirradial,  $\alpha=\sqrt{2}$

### 2.2.3 Validación y reproducción a escala del tratamiento ácido

Una vez determinada la minimización del contenido hemicelulósico y la maximización de xilosa generada por el proceso de HA, se validaron las condiciones óptimas a un lote de 1 Kg, en donde al licor generado rico en xilosa se cuantificaron los inhibidores tales como ácido acético, furfural y 5-hidroximetil furfural, analizando las muestras de acuerdo a la sección 2.10.5, así como volumen final de licor obtenido. Con respecto al bagazo tratado se cuantificó el agua necesaria para llevar el material a un pH de 7 y posteriormente se evaluó el contenido y estado lignocelulósico después del proceso mediante la técnica NREL (Sluiter *et al.*, 2008).

### 2.3 Hidrólisis alcalina

La etapa de HAL se divide en dos fases, considerando como materia prima al bagazo crudo sin tratamiento previo y al bagazo con tratamiento ácido analizando la posibilidad de evitar una etapa en la producción de etanol partiendo directamente del material lignocelulósico. Este estudio se realizó mediante un diseño central



compuesto (DCC) para CC ácido-alcalino, CC crudo y RMR cruda, mientras que RMR ácida alcalina se utilizó un diseño Box Behnken.

El proceso de HAL se debe realizar en recipientes 50% mayor al volumen de operación del proceso, debido a que, al inicio de la reacción, esta tiene un incremento doble del volumen inicial, durante el proceso ocurre un desprendimiento gases y alcanzándose temperaturas por arriba de 90°C.

### 2.3.1 Optimización de hidrólisis alcalina

La optimización de la HAL tuvo un estudio particular para cada materia prima en su estado inicial (bagazo crudo o bagazo ácido), cuyos factores y niveles de operación se muestran en las Tablas 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6, cuyas corridas experimentales se realizaron en lotes de 20 g. El proceso de HAL se llevó ajustando cada experimento a un pH de 11.5 con NaOH 10 M, con el cual el peróxido de hidrógeno se activó e inició la reacción oxidativa sobre las fibras del material lignocelulósico.

Al terminar la HAL, el bagazo resultante se prensó, filtró y lavó para después exponerlo a un secado solar intermitente durante 48 h, donde se evaluó como variable de respuesta la cantidad de lignina removida del bagazo mediante la técnica de NREL (Sluiter *et al.*, 2008), cuantificando el estado porcentual de la celulosa y hemicelulosa.

**Tabla 2.3** Factores y niveles de operación de CDC para la optimización de hidrólisis ácido-alcalina, sobre CC. Factor fijo; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 8% v/v

No.	Variables codificadas		Variables naturales	
	$x_{1HAcAl-CC}$	$x_{2HAcAl-CC}$	$x_{1HAcAl-CC}$ ; Tiempo (h)	$x_{2HAcAl-CC}$ ; RSL (g:mL)
1	-1	-1	30	1:8
2	0	0	35	1:10
3	1	1	40	1:12

**Tabla 2.4** Factores y niveles de operación de CDC para la optimización de hidrólisis alcalina cruda, sobre CC. Factor fijo; tiempo = 35 h

No.	Variables codificadas		Variables naturales	
	$x_{1HAlCr-CC}$	$x_{2HAlCr-CC}$	$x_{1HAlCr-CC}$ ; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (% v/v)	$x_{2HAlCr-CC}$ ; RSL (g:mL)
1	-1	-1	5	1:8
2	0	0	15	1:10
3	1	1	25	1:12

**Tabla 2.5** Factores y niveles de operación de diseño Box Behnken para la optimización de hidrólisis ácida-alcalina sobre RMR

No.	Variables codificadas			Variables naturales		
	$x_{1HAcAl-RMR}$	$x_{2HAcAl-RMR}$	$x_{3HAcAl-RMR}$	$x_{1HAcAl-RMR}$ ; Tiempo (h)	$x_{2HAcAl-RMR}$ ; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (% v/v)	$x_{3HAcAl-RMR}$ ; RSL (g:mL)
1	-1	-1	-1	27	6	1:12
2	0	0	0	38.5	8	1:16
3	1	1	1	50	10	1:20

**Tabla 2.6** Factores y niveles de operación de CDC para la optimización de hidrólisis alcalina cruda, sobre RMR. Factor fijo; RSL = 1:15

No.	Variables codificadas		Variables naturales	
	$x_{1HAlCr-RMR}$	$x_{2HAlCr-RMR}$	$x_{1HAlCr-RMR}$ ; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (% v/v)	$x_{2HAlCr-RMR}$ ; Tiempo (h)
1	-1	-1	5	20
2	0	0	15	30
3	1	1	25	40

### 2.3.2 Validación y reproducción a escala de tratamiento alcalino

Una vez determinadas las condiciones para la remoción máxima de lignina del material lignocelulósico mediante el proceso alcalino, se validaron las condiciones óptimas en lotes de 1 Kg, en esta etapa se cuantificó el agua de lavado necesaria

para ajustar a pH 5, debido a que se debe acondicionar el bagazo tratado para la próxima etapa enzimática, además se evaluó el contenido y estado lignocelulósico; lignina, hemicelulosa y celulosa mediante la técnica NREL (Sluiter *et al.*, 2008).

#### **2.4 Cinéticas de hidrólisis enzimáticas de residuos lignocelulósicos**

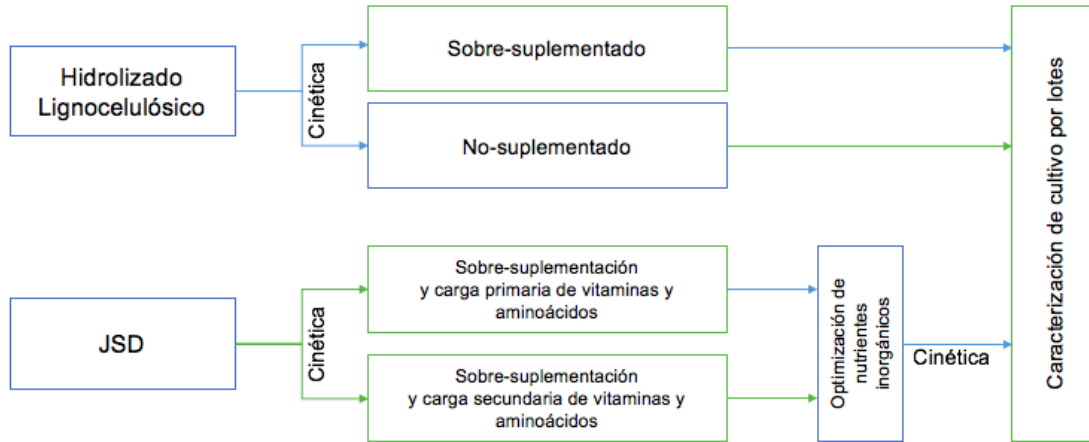
Se realizaron cinéticas a nivel matraz en lotes de 10 g de muestra de CC y RMR ácido-alcalino y bagazo crudo, seguido de réplicas de 75 g de los sustratos ácido-alcalino, utilizando la enzima de tipo Celulasa; Cellic CTec3 de Novozymes y como fase líquida  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0.05 M, ajustando el pH a 5 mediante  $\text{NaOH}$  10 M y  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial, partiendo de la celulosa obtenida en la etapa de hidrólisis alcalina.

La cinética se llevo a cabo durante 72 h, evaluando el incremento de glucosa expresada en g/L, bajo la técnica de DNS cada 12 h con una agitación de 200 rpm a una de temperatura de 50°C, bajo las condiciones enzima-RSL para CC y RMR de; 6% (p/p) – 1:6 y 5% (p/p) – 1:5, respectivamente.

Una vez terminada la hidrólisis enzimática se procede a desnaturalizar la enzima mediante un golpe térmico a 100°C, separando la fracción sólida de la celulosa que no se degradó, la cual es una pequeña mezcla de celulosa cristalina y celulosa amorfa, mientras que a la fase líquida se le cuantificó la glucosa generada durante el proceso enzimático mediante HPLC.

#### **2.5 Evaluación y caracterización del enriquecimiento de la fuente de carbono a partir de nutrientes inorgánicos**

Se realizaron cinéticas de fermentación alcohólica a partir de sustratos lignocelulósicos y jugo de sorgo dulce (JSD) en busca de estudiar, caracterizar y optimizar el proceso fermentativo en cultivo por lotes siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 2.4, en función de la producción de etanol, rendimientos y productividades del proceso.



**Figura 2.4** Caracterización y rutas de suplementación a diferentes fuentes de carbono

## 2.6 Medios de cultivo

### 2.6.1 Medio de conservación

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 es conservada en refrigeración a 4°C y resembrada cada cuatro meses en el medio de conservación descrito en la Tabla 2.7.

**Tabla 2.7** Composición del medio de conservación para la *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01

Componente	Concentración (g/L)
Agar–agar	20
Glucosa	100
Extracto de levadura	10

### 2.6.2 Medio de fermentación

Las cinéticas fermentativas se realizaron utilizando previamente i) un medio de cultivo sintético descrito en la Tabla 2.8, seguido de un ii) pre inculo (composición en Tabla 2.9) que funciona como medio de adaptación del material biológico al sustrato cuya concentración de azúcares, dependerá de la naturaleza de la fuente de carbono a utilizar.

**Tabla 2.8** Composición de medio de activación para la *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4
Extracto de levadura	1

**Tabla 2.9** Composición de medio de pre adaptación para cultivos utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01

Componente	Concentración (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4
Extracto de levadura	1

### 2.6.3 Pre cultivo y pre inoculo

Para realizar la activación de la levadura y obtener el desarrollo ideal del microorganismo durante la fermentación, se toman tres asadas de la caja Petri en la que se encuentra sembrada la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01, se siembra en un matraz Erlenmeyer a un volumen operable de 100 mL de medio sintético descrito en la Tabla 2.8 a pH 5.5 se incuba durante 12 h a 200 rpm y 30°C. Una vez transcurrido este tiempo, se realiza el paso del medio de activación al pre inoculo con un pH de 5.5 a una concentración de células de  $3 \times 10^6$  cell/mL y se incuban 12 h a 200 rpm y 30°C. Transcurrido este tiempo se inoculan los matraces preparados para la cinética de estudio con una concentración inicial de  $3 \times 10^6$  cell/mL.

## 2.7 Cultivo por lotes

### 2.7.1 Fermentación por lotes de hidrolizados lignocelulósicos

Las cinéticas de fermentación de los hidrolizados lignocelulósicos se llevaron a cabo en matraces de 250 mL con un volumen de sustrato operable de 160 mL, con la composición de nutrientes descritos en la Tabla 2.10.

**Tabla 2.10** Composición nutrimental de cinéticas del cultivo por lotes de hidrolizados lignocelulósicos

Componente	Café		Madera	
	Sobre-	No-	Sobre-	No-
	suplementado	suplementado	suplementado	suplementado
	CC1	CC2	CM1	CM2
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	0	5	0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	0	2	0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1	0	1	0
Extracto de levadura	2	1	2	1

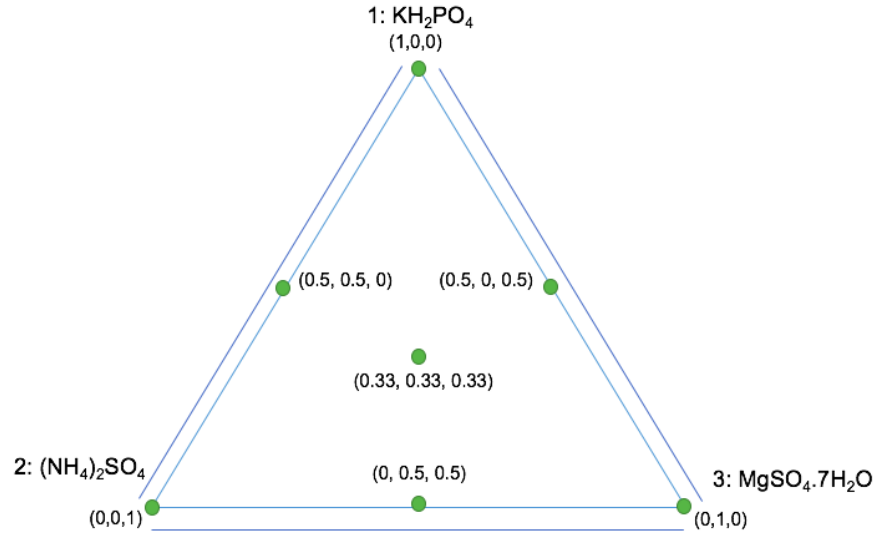
El objetivo de las fermentaciones a partir de sustratos lignocelulósicos es demostrar las deficiencias nutrimentales de fuentes nitrogenadas, de potasio y magnesio en hidrolizados enzimáticos, además de demostrar la potencialización del cultivo suplementado en función de la mayor concentración de etanol obtenida y evaluando los rendimientos y productividades del cultivo. El estudio se realizó en una incubadora marca STIK a 200 rpm, 30 °C con un pH de 5.5 y concentración celular inicial de  $3 \times 10^6$  cell/mL, durante 32 h evaluando composición de sustrato, concentración de etanol, células y biomasa cada cuatro horas.

### 2.7.2 Fermentación por lotes de jugo de sorgo dulce

El estudio del efecto de nutrientes inorgánicos y carga de vitaminas y minerales en el JSD, se realizó mediante el esquema de dos diseños simplex centroide cuya matriz de diseño se muestra en la Figura 2.5.

Este diseño genera un modelo de orden superior que es capaz de describir los efectos de cada componente en unitario y mezcla (Tabla 2.11), que maximicen la concentración de etanol resultante de cada cinética de fermentación; con el objetivo de evaluar el efecto de una composición estándar de componentes inorgánicos en función de la respuesta a la carga de extracto de levadura como fuente de vitaminas y aminoácidos para el mejor desarrollo del proceso de producción de etanol, análisis

de productividad y rendimientos del proceso de fermentación bajo el esquema de cultivo por lotes.



**Figura 2.5** Matriz y estructura de diseño simplex centrado

**Tabla 2.11** Factores y niveles de operación del diseño simplex centrado para evaluación cinética del cultivo por lotes de JSD. Diseño 1 (CsxA); Carga de 1 g de extracto de levadura, Diseño 2 (CsxB); Carga de 2 g de extracto de levadura

Corrida	Variables codificadas			Variables naturales		
	Xs <sub>1</sub>	Xs <sub>2</sub>	Xs <sub>3</sub>	sx <sub>1</sub> :KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sx <sub>2</sub> :(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sx <sub>3</sub> :MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
	Fracción	Fracción	Fracción	(g/L)	(g/L)	(g/L)
1	1	0	0	7	0	0
2	0	1	0	0	5	0
3	0	0	1	0	0	1.5
4	0.5	0.5	0	3.5	2.5	0
5	0.5	0	0.5	3.5	0	0.75
6	0	0.5	0.5	0	2.5	0.75
7	0.3333	0.3333	0.3333	2.3331	1.6665	0.49995

### 2.7.3 Cinéticas patrón de jugo de sorgo dulce

Se realizaron dos cultivos patrón; A: con carga de extracto de levadura a 1 g/L y B: con carga de extracto de levadura a 2 g/L, ambas suplementados con los nutrientes inorgánicos descritos en la Tabla 2.9, que sirven como cultivos comparativos a una dosificación estándar, contra los estudios de efecto de sales nutrientes. Los cultivos patrón se realizaron en una incubadora marca STIK a 200 rpm, 30°C con un pH de 5.5 y concentración celular inicial de  $3 \times 10^6$  cell/mL, durante 32 h evaluando la composición de sustrato, concentración de etanol, células y biomasa cada cuatro horas.

## 2.8 Optimización de la suplementación inorgánica del jugo de sorgo dulce

### 2.8.1 Metodología de superficie de respuesta (MSR) generada a partir del diseño Box Behnken, sobre JSD como fuente de carbono

La etapa de optimización a partir de la dosificación de sales nutrientes se inicia mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR), empleando un diseño de optimización Box Behnken; el diseño rotatable de optimización genera 15 corridas experimentales, a partir de los factores;  $x_{1BBF} = \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $x_{2BBF} = (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $x_{3BBF} = \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , cuyos niveles y factores de estudio se presentan la Tabla 2.12, evaluando como variable de respuesta la máxima concentración de etanol generado por corrida experimental.

Las cinéticas fermentativas en cultivos por lotes a partir del JSD se evaluaron durante un periodo de tiempo de 32 h a condiciones estándar de fermentación; en una incubadora marca STIK a 200 rpm, 30°C con un pH de 5.5 y concentración celular inicial de  $3 \times 10^6$  cell/mL, evaluando la composición de sustrato, concentración de etanol, células y biomasa cada cuatro horas.



**Tabla 2.12** Factores y niveles de operación de diseño Box Behnken para la optimización de suplementación inorgánica del JSD

No.	Variables codificadas			Variables naturales		
	$x_{1BBF}$	$x_{2BBF}$	$x_{3BBF}$	$x_{1BBF}$ : KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	$x_{2BBF}$ : (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	$x_{3BBF}$ : MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)
1	-1	-1	-1	3	1	0.5
2	0	0	0	5	3	1
3	1	1	1	7	5	1.5

### 2.8.2 Optimización global de la suplementación inorgánica sobre el proceso fermentativo en cultivo por lotes

En base a los estudios cinéticos representados por el diseño simplex centroide y el estado estacionario en punto de silla del diseño de optimización Box Behnken, se estableció al MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O como un factor fijo; lo que permitió plantear un CDC para optimizar el proceso de suplementación inorgánica de nutrientes al cultivo por lotes para maximizar el proceso y producción de etanol.

Los factores evaluados mediante el diseño de optimización son;  $X_{1CDCF}$ =KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y  $X_{2CDCF}$ =(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, cuyos niveles de operación se muestra en Tabla 2.13, evaluando como variable de respuesta la producción de etanol en g/L, mediante cinéticas de 300 mL como volumen de trabajo a condiciones estándar de fermentación una incubadora marca STIK a 200 rpm, 30°C con un pH de 5.5 y concentración celular inicial de 3x10<sup>6</sup> cell/mL, evaluando la composición de sustrato, concentración de etanol, células y biomasa cada cuatro horas.

**Tabla 2.13** Factores y niveles de operación de CDC para la optimización de la suplementación inorgánica del JSD. Factor fijo;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0.75 \text{ g/L}$  con carga a  $2 \text{ g/L}$  de extracto de levadura

No.	Variables codificadas		Variables naturales	
	$x_{1CDCF}$	$x_{2CDCF}$	$x_{1CDCF}$ ; $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)	$x_{2CDCF}$ ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)
1	-1	-1	2	4
2	0	0	3	5
3	1	1	4	6

### 2.8.3 Validación y caracterización de cinética óptima

A partir de las condiciones de suplementación obtenidas mediante el estudio de enriquecimiento de la fuente de carbono (JSD) mediante nutrientes inorgánicos, se estableció una cinética de fermentación alcohólica, monitoreando la producción de etanol, sustrato, biomasa y células para evaluar la productividad, rendimientos, eficiencias y determinar parámetros biocinéticos como  $\mu_{\max}$ , que permitieron establecer condiciones en un cultivo continuo, dicho análisis se realizó en un biorreactor Aplikon, en un volumen de trabajo de 1 L, durante un periodo de tiempo de 24 h a condiciones estándar de fermentación; 200 rpm, 30°C con un pH de 5.5 y concentración celular inicial de  $3 \times 10^6 \text{ cell/mL}$ .

### 2.8.4 Aplicación de ecuaciones en cultivo por lotes

Para el cálculo de la productividad (Q), se utiliza la concentración de etanol (EtOH) durante el proceso de fermentación en el tiempo (t) en que se obtuvo (Ec. 2.1), expresado en g/Lh.

$$Q = \frac{\text{EtOH}}{t} \quad (2.1)$$

El cálculo del rendimiento producto/sustrato ( $Y_{E/S}$ ) se obtuvo considerando la diferencia de la concentración de etanol entre el diferencial de la concentración de sustrato durante el proceso de fermentación (Ec. 2.2) expresado en g/g.

$$Y_{E/S} = \frac{EtOH_1 - EtOH_0}{s_1 - s_0} \quad (2.2)$$

La eficiencia de fermentación se determinó a partir de la relación del valor del rendimiento producto/sustrato ( $Y_{E/S}$ ) con el rendimiento teórico de 0.511 g/g (Ec. 2.3) expresado en %.

$$n_f = \frac{Y_{E/S}}{0.511} \times 100 \quad (2.3)$$

El consumo de sustrato que ocurre durante el proceso de fermentación se determinó a partir la relación del sustrato residual entre el sustrato inicial (Ec. 2.4) expresado en %.

$$s_c = 100 - \frac{s_r \times 100}{s_0} \quad (2.4)$$

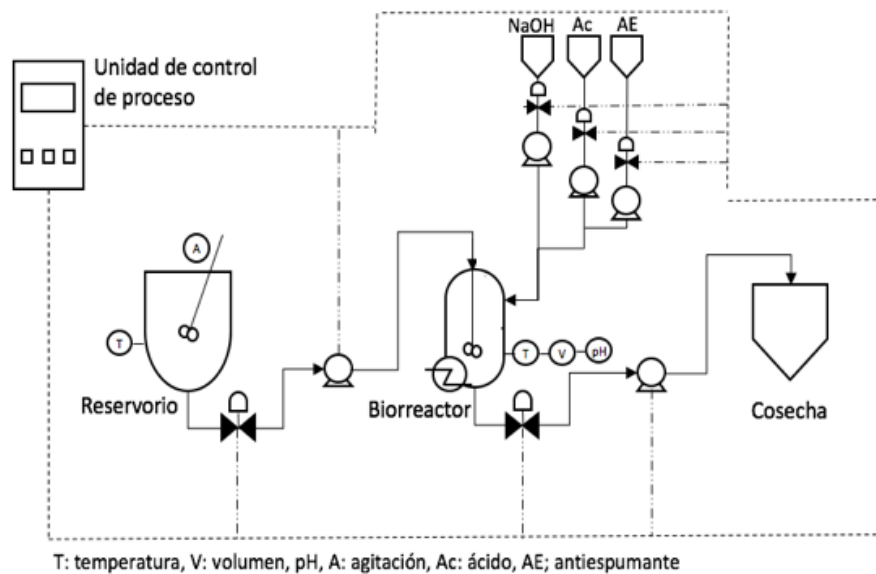
El cálculo de la velocidad de crecimiento se determinó considerando la diferencia logarítmica de la concentración celular durante la fermentación y la concentración inicial celular del cultivo entre el tiempo dado del análisis (Ec. 2.5) expresado  $h^{-1}$ , mientras que el máximo crecimiento celular se determinó a partir del modelo de Monod (1.11).

$$\mu = (LnX - LnX_0)/t \quad (2.5)$$

## **2.9 Estudio de cinética de crecimiento y producción de etanol mediante cultivo continuo, generado a partir de la suplementación óptima de nutrientes inorgánicos**

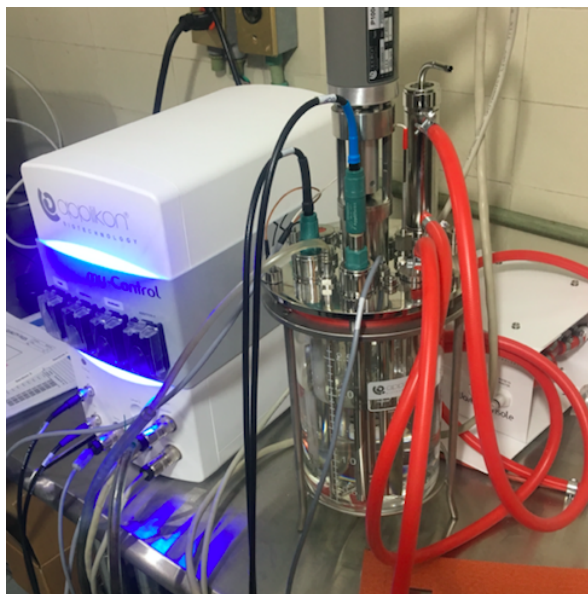
Mediante la información generada del estudio, caracterización y optimización del proceso de cultivo por lotes del JSD como fuente de carbono, se evaluaron tres tasas de dilución ( $D, h^{-1}$ ); 0.15, 0.20 y 0.25 establecidas a partir de la  $\mu_{max}$  encontrada

en la validación de la cinética óptima para encontrar la tasa de dilución óptima ( $D_{op}$ ,  $h^{-1}$ ). A partir de un sistema de cultivo continuo (Figura 2.6), se pudo obtener la máxima productividad de etanol sin que exista lavado de células, manteniendo el un volumen constante de 1000 mL, regulando el flujo de operación mediante la Ec. 1.12. Los caudales de entrada y salida se iniciaron durante la fase de crecimiento exponencial. Durante el cultivo la corriente de entrada contenía todos los nutrientes necesarios, pero no células y la corriente de salida contenía células, nutrientes sin reaccionar y productos de fermentación.



**Figura 2.6** Sistema de cultivo continuo de una sola etapa para producción de etanol operada por unidad de control

Cada tasa de dilución estudiada fue evaluada por un período de dos veces el tiempo de residencia ( $\tau = 1/D$ ) siendo analizada la estabilidad en el sistema durante la operación continua. Para evitar contaminación dentro del reservorio debido a los tiempos de residencia empleados, el sustrato fue esterilizado previo al arranque de la fermentación. El proceso de fermentación se llevó a cabo bajo condiciones estándar de operación; 200 rpm,  $30^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  con un pH de 5.5 y concentración celular inicial de  $3 \times 10^6$  cell/mL en la fase por lotes, mediante un biorreactor Applikon 3L con unidad de control My-Control (Figura 2.7).



**Figura 2.7** Biorreactor Applikon 3L con unidad de control *My-Control*

El sustrato contenido en el reservorio estuvo suplementado a partir de las sales inorgánicas ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) en función de las concentraciones obtenidas en la optimización de enriquecimiento de la fuente de carbono de la sección 2.8.2.

El flujo volumétrico de entrada y salida fue regulado mediante la unidad de control y las bombas peristálticas de la unidad *my-Control*, donde el flujo de salida tuvo como destino final un deposito hermético (cosecha) para evitar la evaporación y contaminación del producto.

## **2.10 Métodos analíticos**

### **2.10.1 Determinación de biomasa**

La determinación de la biomasa se realizó mediante análisis de densidad óptica (DO) evaluada a una longitud de onda de 620 nm, mediante un espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 20, empleando celdas de cuarzo con una trayectoria

óptica de 10 mm, realizando las diluciones necesarias para obtener lecturas de absorbancias por debajo de 0.8, que posteriormente se llevara a una correlación mediante un polinomio de primer orden (Ec. 2.6) reportando la biomasa generada en g/L.

$$\text{peso seco } \left(\frac{g}{L}\right) = 0.5035x(DO) - 0.0005 \quad (2.6)$$

### 2.10.2 Conteo celular

El conteo celular se realizó mediante el empleo de la cámara de Neubauer, realizando las diluciones necesarias para poder contar hasta un límite de 300 células por lectura. Los conteos se realizaron en cinco principales regiones (cuadros) con la que cuenta la cámara, cuatro de ellos ubicados en las esquinas, con 16 cuadros en su interior, y uno en el centro, el cual cuenta con 16 cuadros pequeños en su interior, reportando la concentración celular en cell/mL mediante la correlación de expresada en la Ec. 2.7.

$$x \left(\frac{\text{cell}}{\text{mL}}\right) = \frac{N(10^3)}{Nc(d)} \quad (2.7)$$

Donde N; representa el número de células contadas, Nc; número de cuadrantes y d; la dilución empleada sobre la muestra para el conteo celular.

### 2.10.3 Determinación de azúcares reductores totales

La determinación de azúcares reductores se efectuó mediante el método de DNS, basada en una técnica colorimétrica que emplea 3,5-ácido dinitrosalicílico para la hidrólisis de polisacáridos presentes en la muestra problema, evaluado a una longitud de onda de 540 nm, mediante un espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 20, empleando celdas de cuarzo con una trayectoria óptica de 10 mm, realizando las diluciones necesarias para obtener lecturas de absorbancias por debajo de 1.0, que posteriormente se llevara a una correlación mediante un

polinomio de primer orden reportando la concentración de azúcares reductores totales en g/L.

#### **2.10.4 Determinación de etanol y sustrato**

La determinación de la concentración de azúcares y etanol presente en las cinéticas de fermentación se cuantificó mediante HPLC, siguiendo la metodología de preparación de muestras del apartado de 2.10.5.

#### **2.10.5 Preparación de muestra analizadas por HPLC**

Las muestras serán centrifugadas a 10 000 rpm por 10 min a 4°C y congeladas, para posteriormente ser analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Antes de ser analizadas por HPLC las muestras serán tratadas con una solución de BaO 0.3 M y de ZnSO<sub>4</sub> al 5 % p/v con la finalidad de eliminar impurezas presentes tales como proteínas y almidones entre otras que son capaces de tapar tanto los filtros como la precolumna y columna del HPLC. La relación utilizada fue 8:1:1, dejando reposar por 10 min después de una agitación vigorosa de los tubos eppendorf, pasando posteriormente a una centrifugación durante 10 min a 10 000 rpm. La concentración de los sustratos (glucosa y fructosa) y los productos (etanol, glicerol y ácido acético) serán determinados por HPLC, utilizando una columna Shodex SH1011, específica para la separación de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes.

La fase móvil empleada será H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 N, Velocidad de flujo, 0.6 mL/min; Temperatura de la columna, 55 °C; Tipo de detector: índice de refracción Marca Waters modelo 2414; Volumen de inyección, 10 µL y 30 min de duración de análisis por muestra. El software utilizado fue Empower (Waters), que reporta directamente la concentración de la muestra mediante una correlación con estándares previamente realizados (glucosa anhidra, grado alimenticio de Golden Bell Reactivos y fructosa, grado reactivo de Baker, ambas en concentraciones de 100,

50, 16.6, 10, 5, 2.5, 1.66, 1.25, 1, 0.50 y 0.33 g/L; glicerol anhidro, grado reactivo, Baker en concentraciones de 10, 5, 1.66, 1, 0.5, 0.25, 0.16, 0.12, 0.10, 0.05 y 0.03 g/L ; ácido acético glacial, grado reactivo, Baker en concentraciones de 30, 15, 5, 3, 1.5, 0.75, 0.5, 0.37, 0.3, 0.15 y 0.1 g/L, y alcohol etílico absoluto anhidro, grado reactivo, Baker en concentraciones de 10, 5, 1.66, 1, 0.5, 0.25, 0.16, 0.12, 0.10, 0.05 y 0.03 g/L).

### 2.11 Metodología de superficie de respuesta

El análisis de experimentación se ajustará a un modelo de segundo orden similar al que se muestra en la Ec. 2.8 el cual incorporará la curvatura que aproxime la respuesta de cada modelo generado por el diseño experimental utilizado (Montgomery, 2004).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.8)$$

Donde la solución matemática general del modelo de experimentación para la localización del punto estacionario se realizará con la notación matricial descrito en la Ec. 2.9, que comprende la estructura de las Ecs. 2.10, 2.11 y 2.12 (Montgomery, 2004).

$$y = \beta_0 + x'b + x'Bx \quad (2.9)$$

donde

$$x = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_k \end{pmatrix} \quad b = \begin{pmatrix} \hat{\beta}_1 \\ \hat{\beta}_2 \\ \vdots \\ \hat{\beta}_k \end{pmatrix} \quad B = \begin{pmatrix} \hat{\beta}_{11}, & \hat{\beta}_{12}/2 & \hat{\beta}_{1k}/2 \\ \hat{\beta}_{12}/2 & \cdots & \hat{\beta}_{2k}/2 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \text{simetrica} & \cdots & \hat{\beta}_{kk} \end{pmatrix} \quad (2.10, 2.11, 2.12)$$

Al definir los coeficientes de regresión, la matriz simétrica cuya diagonal principal son los coeficientes cuadráticos puros y anexos los coeficientes cuadráticos mixtos, la solución del punto estacionario está dada por la Ec. 2.13 (Montgomery, 2004).

$$X_0 = -\frac{1}{2} B^{-1} b \quad (2.13)$$



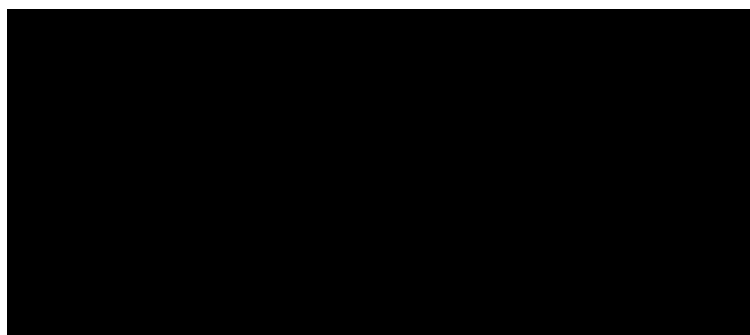
## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

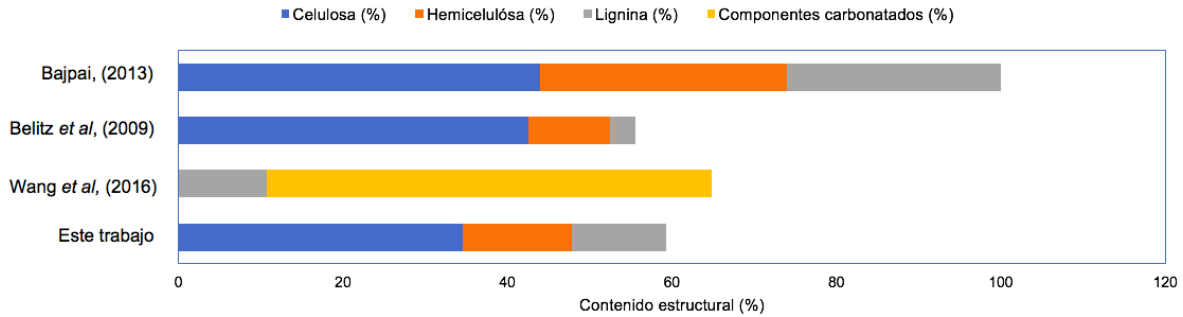
## CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Caracterización de sustratos lignocelulósicos residuales

La caracterización de los materiales lignocelulósicos se presentan en la Tabla 3.1, la cual se realizó sobre muestras representativas de los lotes de materia prima inicial empleada durante la experimentación.



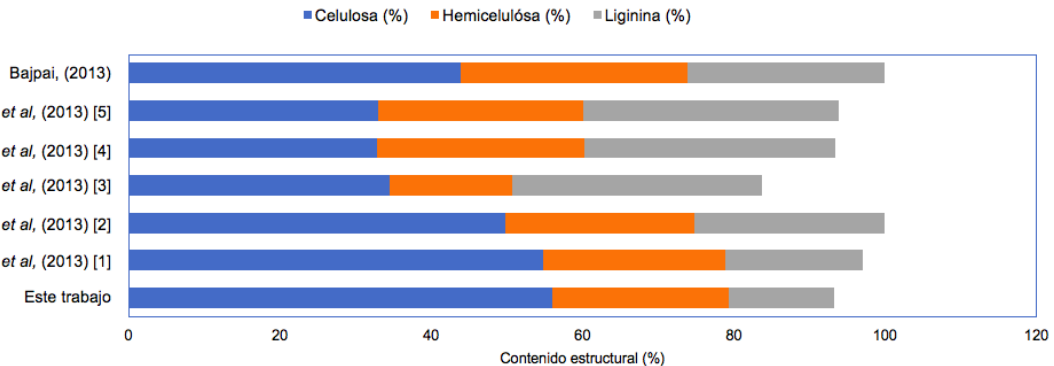
Analizando la composición estructural del CC, se observa que el contenido de celulosa se encuentra dentro del rango bibliográfico reportado por Mussatto *et al.*, (2011) que va del 32 al 40%, mientras que el contenido de hemicelulosa supera a la composición reportada por Hijosa-Valsero *et al.*, (2018) en un 37.24%, siendo esto una característica favorable para la obtención de azúcares fermentables. La cantidad de lignina presente (11.51%) en la muestra en este trabajo, resultado menor que la reportada por Hijosa-Valsero *et al.*, (2018), en un 50%, lo cual favorece el proceso, dado que entre menor sea la barrera policristalina ofrecida por la lignina, mayor es el aprovechamiento de monosacáridos. En base a la variación de los componentes; celulosa, hemicelulosa y lignina, se puede determinar que la biomasa lignocelulósica depende directamente de la cosecha, tierra, ubicación geográfica, clase y tipo de cultivo, puesto como se observa en la Figura 3.1 existe una variación en la composición de la biomasa, respecto a las investigaciones de otros autores que han trabajado con residuos de CC.



**Figura 3.1** Comparación de contenidos lignocelulósico de CC

La RMR empleada en este trabajo, se compone de una mezcla no controlada de diferentes cantidades y tipos de maderas (blandas y duras), el análisis de este lote presentó un contenido de celulosa superior al 27.65% al contenido reportado por Bajpai, (2013) que fue del 44%, mientras que las composiciones de celulosa para maderas duras y blandas propuesta por Cuervo *et al.*, (2009), disponen de un contenido mayor de 2.12% y 2.32% respectivamente.

Soto *et al.*, (2013) realizaron trabajos de deslignificación de diferentes mezclas suaves nativas mexicanas, a lotes controlados cuyas composiciones lignocelulósicas se observan en la Figura 3.2, en donde de forma general el lote de este trabajo contiene un contenido promedio mayor del 53.42% respecto a la celulosa.

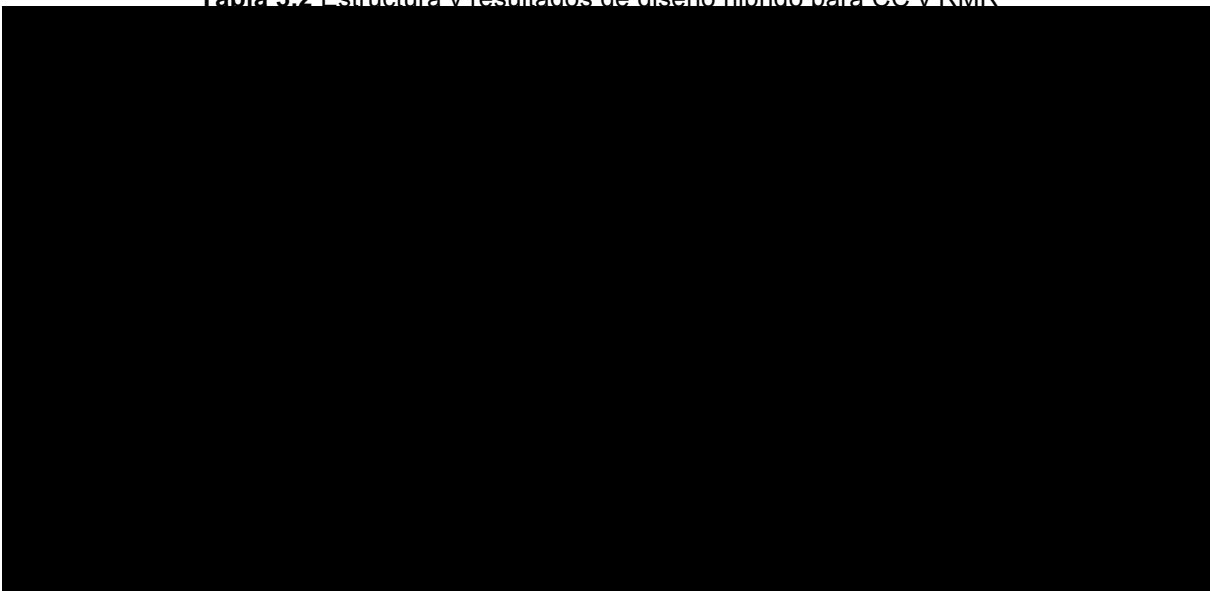


**Figura 3.2** Comparación de contenidos lignocelulósico de RMR; [1] madera dura, [2] madera suave, [3] *P. Arizona* (madera suave), [4] *P. Cooperi* (madera suave), [5] *durangensis* (madera suave)

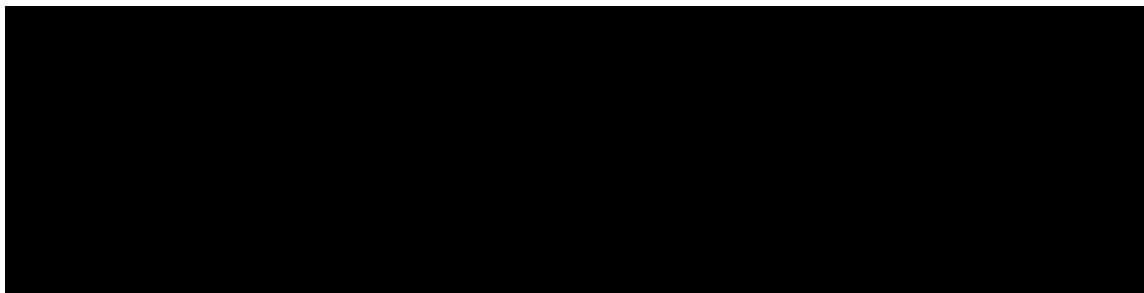
### 3.2 Resultados de hidrólisis ácida de CC y RMR

El estudio del proceso de hidrólisis ácida se realizó mediante un diseño híbrido de optimización (DHO) cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.2, se alcanzaron valores máximos de xilosa para CC y RMR de 13.02 g/L y 20.80 g/L, respectivamente, observándose la presencia de glucosa en concentraciones de 3.94 g/L y 1.74 g/L.

**Tabla 3.2** Estructura y resultados de diseño híbrido para CC y RMR



El análisis estadístico se realizó mediante el software NCSS, siendo la variable de respuesta la concentración de xilosa (g/L), en donde se obtuvo una  $R^2$  con ajuste del 99.30% para el CC y 84.26% para la RMR, lo cual garantiza la fiabilidad de las correlaciones del modelo que se muestra en las Ecs. 3.1 y 3.2.

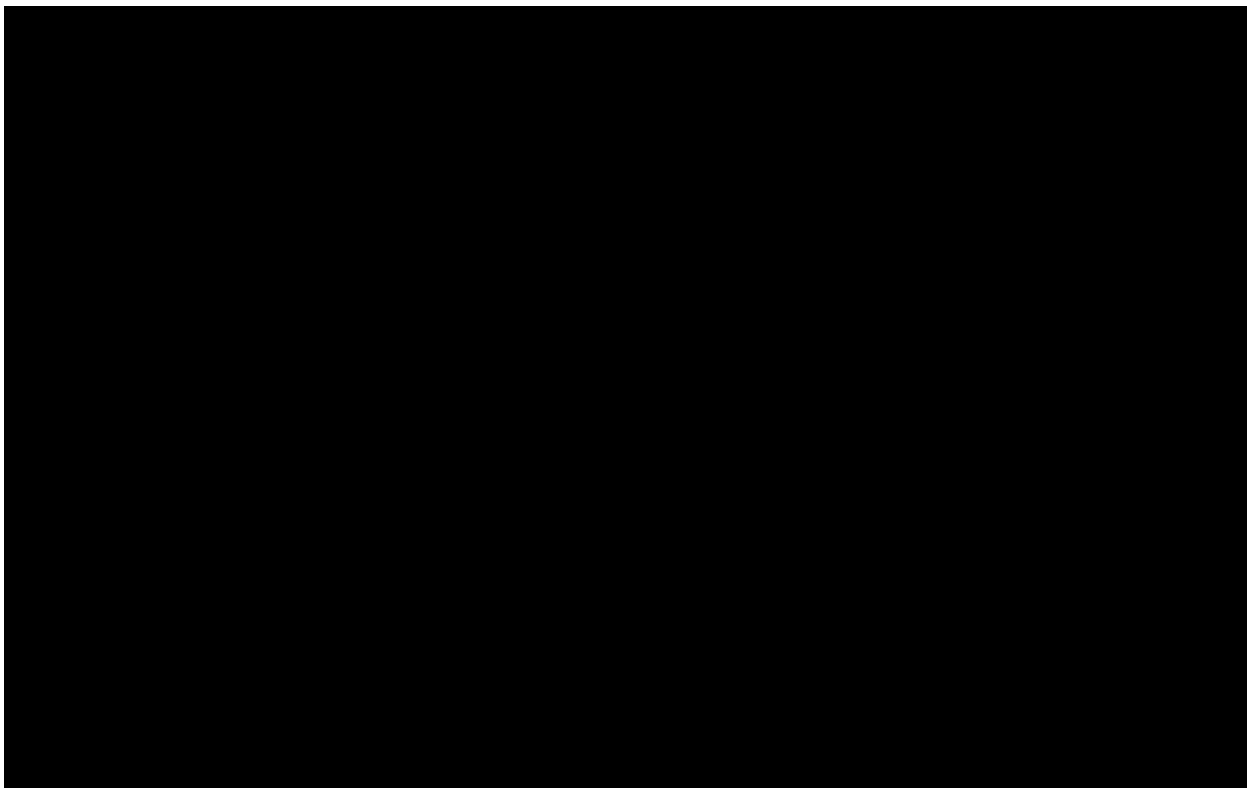


(3.1)

(3.2)

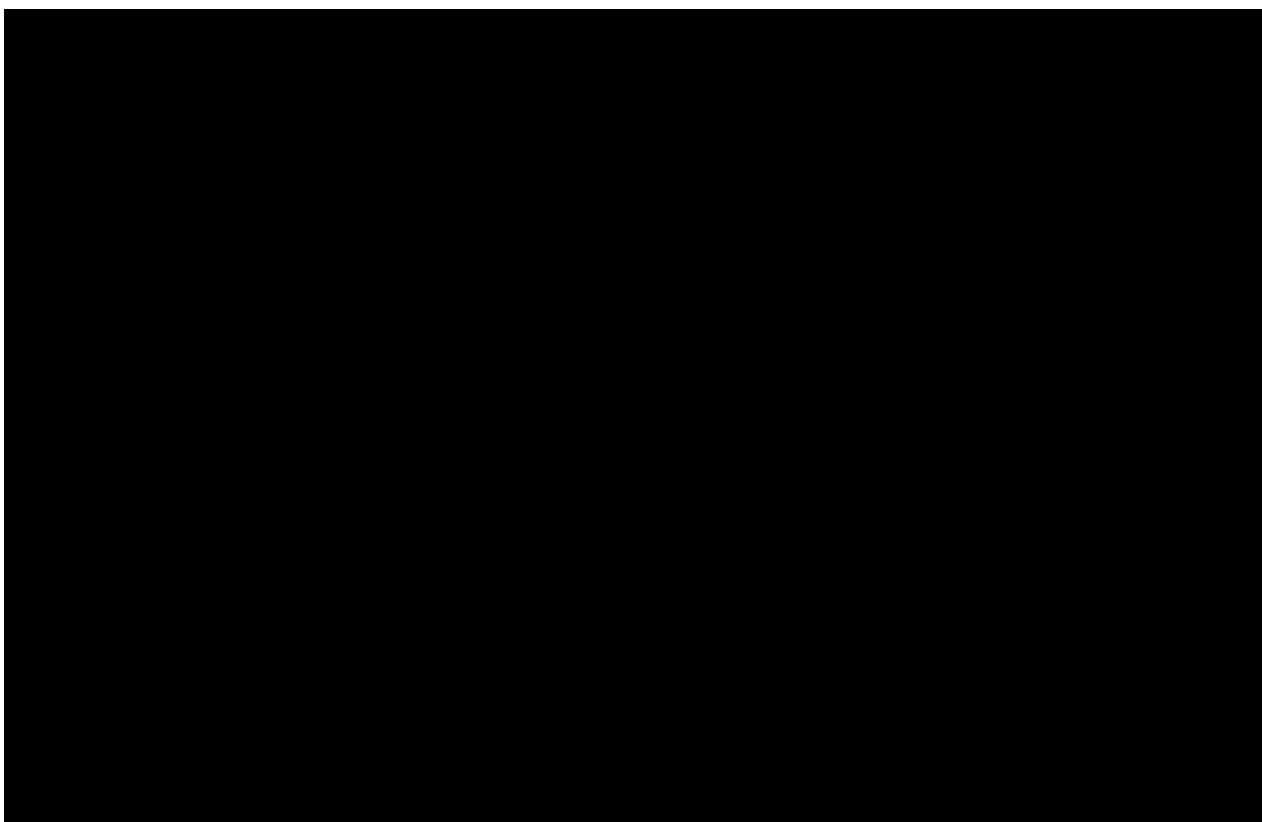
En el Anexo A1, se presenta el análisis de residuos encontrándose una dispersión de 0.70% y 15.74% respectivamente para CC y RMR.

Mediante el análisis estadístico del ANOVA para los sustratos lignocelulósicos (Anexo A2 y A3) resultantes de los DHO, se determinó que el efecto de la RSL para el CC y el efecto del tiempo para la madera sobre el proceso de HA, son factores no significativos. A partir un análisis de superficie de respuesta (Figura 3.3) se observa el comportamiento general de la experimentación de HA para el CC, en donde el incremento de la concentración de xilosa ocurre a partir de los 30 min de proceso como se observa en la Figura 3.3a, en un rango de concentración de ácido de 2% a 3% v/v descrito en las Figuras 3.3b y 3.3c, presentándose un incremento de xilosa directamente proporcional al incremento de la concentración de ácido a lo largo de tiempo de proceso.



**Figura 3.3** GSR del proceso de HA del DHO, de CC: a) tiempo (min) vs  $[H_2SO_4]$  (% v/v), b) RSL (g:mL) vs  $[H_2SO_4]$  (% v/v) y c) RSL (g:mL) vs tiempo (min)

El comportamiento y rendimiento del proceso ácido para la RMR se describe mediante la Figura 3.4, en donde el incremento de la concentración de xilosa se obtiene a los 30 min de haber iniciado el proceso como se observa en la Figura 3.4a y 3.4c, mientras que a partir de las superficies de las Figuras 3.4b y 3.4c se detectó que entre menor sea el medio líquido en el que sumerge al bagazo, mayor es la destrucción de la cadena de hemicelulosa, obteniendo así una menor cantidad de licor de xilosa, pero a mayor concentración.



**Figura 3.4** GSR del proceso de HA del DHO RMR, a) tiempo (min) vs  $[H_2SO_4]$  (% v/v), b) RSL (g:mL) vs tiempo (min) y c)  $[H_2SO_4]$  vs RSL (g:mL)

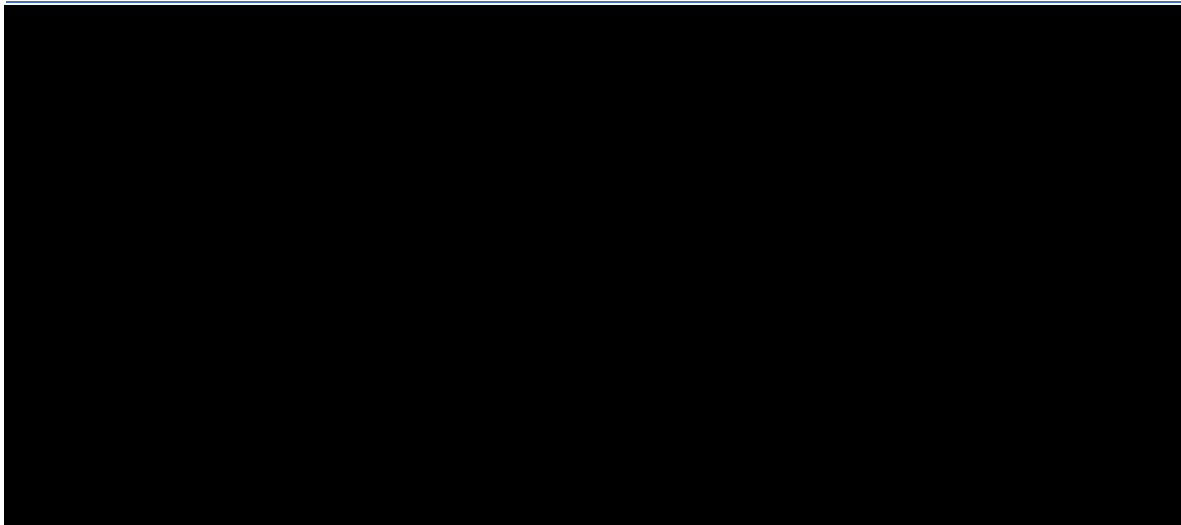
La generación de xilosa a partir de la destrucción de las cadenas carbonatadas de la fibra lignocelulósica es directamente proporcional a la disminución del contenido de hemicelulosa, por lo tanto la concentración de xilosa más alta obtenida mediante el DHO en ambas fibras lignocelulósicas se generó en un tiempo de 30 min, con una concentración de ácido de 3.41% v/v, a una RSL de 1:5.58 g:mL para el CC y para RMR con una concentración de  $H_2SO_4$  de 2% v/v a una RSL de 1:4.18. Es por ello que para la optimización del proceso de HA se evaluó el efecto inverso siendo

la variable de respuesta el contenido de hemicelulosa en la fibra lignocelulósica monitoreando la concentración de xilosa obtenida como un metabolito secundario de interés.

### 3.2.1 Optimización del proceso de hidrólisis ácida de CC

El rango experimental y los niveles de las variables independientes investigadas durante el proceso de minimización de hemicelulosa contenida en CC se reportan en la Tabla 3.3, en donde el análisis de datos se realizó mediante el software NCSS generando el ANOVA y el gráfico de probabilidad normal con una dispersión de 15.47% (Anexo B1), generando el polinomio de segundo orden de la Ec. 3.3.

**Tabla 3.3** Optimización de HA mediante CDC; minimización del contenido de hemicelulosa y concentración de xilosa en CC

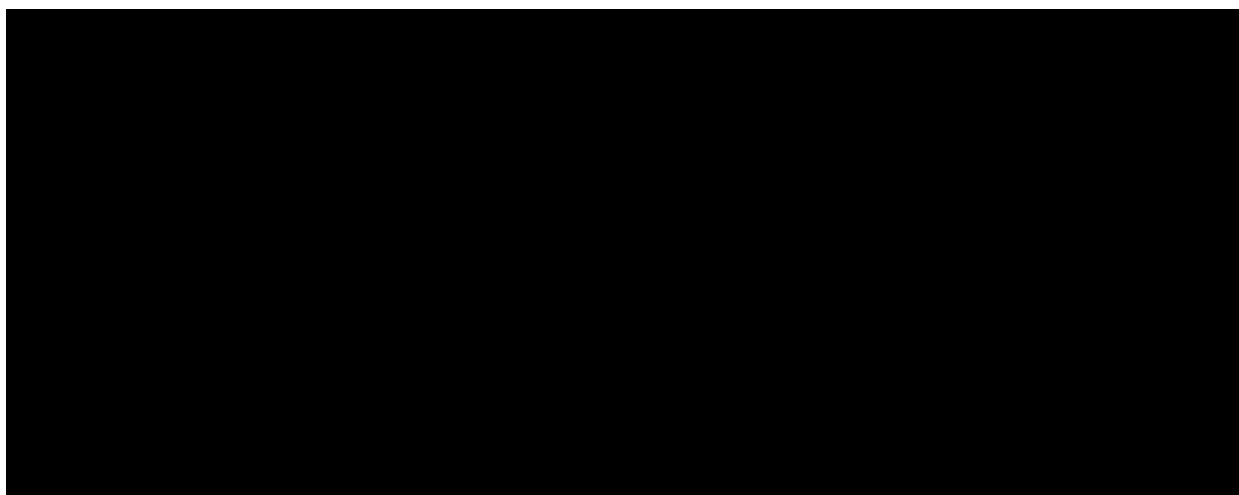


$$\begin{aligned} \text{Hemicelulosa } (\%)_{HACC} = & 68.0740 - 1.5994x_{1C} - 12.2766x_{2C} + 0.0141x_{1C}^2 + 1.0419x_{2C}^2 + \\ & 0.0765x_{1C}x_{2C} \end{aligned} \quad (3.3)$$

Mediante la MSR se analizó el efecto que tuvo el  $H_2SO_4$  en función del tiempo sobre la estructura hemicelulósica del sustrato, encontrando la minimización del proceso en los niveles medios de la operación como se observa en la gráfica de superficie de respuesta (Figura 3.5a), el CC salientes de la HA se cuentan con un contenido final de hemicelulosa de 6.31%, lo cual representa una remoción sobre el contenido

original (13.23%) de 52.28% valores superiores a los reportados por Niglio *et al.* (2017) con un contenido final promedio de hemicelulosa de 8.87%.

De forma general en el proceso se observa que las concentraciones de ácido bajas, no tienen efecto significativo sobre la destrucción de la pared de hemicelulosa del CC al igual que las concentraciones altas, puesto que se evidencia un daño al material lignocelulósico, por lo tanto, la minimización del proceso en base al diagrama de contornos (Figura 3.5b) en un rango de concentración de ácido de 3.7% a 4.3% v/v en un tiempo aproximado de 37 a 43 min de proceso.



**Figura 3.5** (a) GSR de la minimización de hemicelulosa óptima, (b) Gráfico de contornos de la zona óptima de minimización de hemicelulosa del proceso de HA de CC

Mediante un análisis canónico se determinó la optimización del proceso de HA de CC, el cual se basó la localización de los puntos estacionarios (Ec. 3.4) generados a partir del modelo experimental de la Ec. 3.3, determinándose un tiempo de 45.12 min, la concentración de  $H_2SO_4$  de 4.23 % v/v a una RSL 1:6 g:mL.

$$\text{[Redacted Equation 3.4]}$$

(3.4)

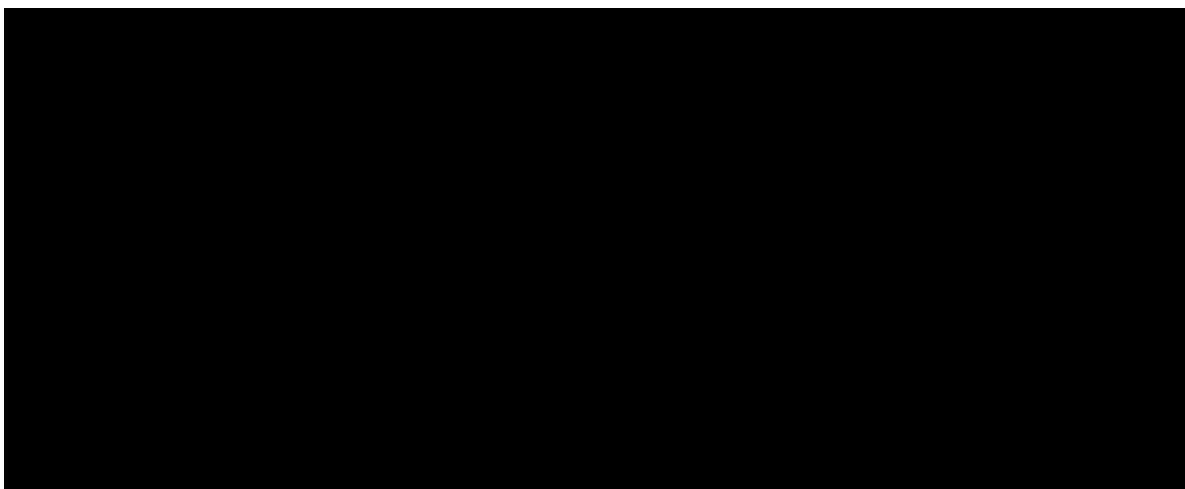
A partir de la Ec. 3.5 que representa la forma canónica del modelo experimental y la denotación positiva de los eigenvalores contenidos en la ecuación se comprueba la minimización óptima del contenido de hemicelulosa y validan los puntos



estacionarios obtenidos en el proceso que se localizan en el gráfico de contornos de la Figura 3.5b.

$$\hat{y}_{CDC} = 68.0740 + 1.0433W_{1CC}^2 + 0.0127W_{2CC}^2 \quad (3.5)$$

El monitoreo de generación de metabolitos secundarios mediante el CDC, generó una máxima concentración de xilosa de 18.19 g/L a partir de una concentración de ácido de 5.68% v/v a un tiempo de 45 min con una RSL de 1:6 g:mL, como se observa en la Figura 3.6a, obteniendo una concentración mayor de xilosa que la reportada por Dessie *et al*, (2018) de 17.08 g/L, quienes emplearon condiciones más altas de RSL (1:10) y concentración de ácido (17.65 %v/v), en un tiempo de 30 min, similares a las condiciones del punto estacionario donde se alcanzó una concentración de xilosa de 17.25 g/L



**Figura 3.6** (a) GSR de máxima producción de xilosa, (b) Gráfico de contornos de la producción de xilosa; efecto de la concentración de ácido respecto al tiempo sobre rupturas de pentosas en CC

En base a los resultados obtenidos el proceso de HA se define que el incremento de la concentración de xilosa es una respuesta directamente proporcional al aumento de la concentración de ácido en un tiempo de 45 min, puesto que llevar el proceso fuera de este tiempo, genera un decremento de la concentración de xilosa, debido que a cortos tiempos de haber iniciado el proceso, el efecto del ácido no alcanza a realizar el rompimiento de la estructura lignocelulósica, mientras que la exposición del sustrato a tiempos prolongados de la reacción, provocan un efecto de desacetilación hemicelulósica y la descomposición de pentosas, generando

inhibidores como ácido acético y furfural, tal efecto es perceptible en el gráfico de contorno de la Figura 3.6b, donde los contornos rojos definen zonas de mínima producción de xilosa localizados a tiempos menores de 35 min sin importar la concentración de ácido y la zona alta ocurre a tiempos superiores a 50 min a concentraciones por debajo del 4% v/v.

### 3.2.2 Optimización del proceso de hidrólisis ácida de RMR

La experimentación del proceso de HA realizada sobre RMR presentó los resultados que se encuentran en la Tabla 3.4, en donde el análisis de datos se realizó mediante el software NCSS generando el ANOVA y el gráfico de probabilidad normal con una dispersión de 15.47% (Anexo B2 y B3), generando el polinomio de segundo orden con un ajuste de 84.53% que garantiza la fiabilidad de las correlaciones del modelo que se muestra en la Ec. 3.6.

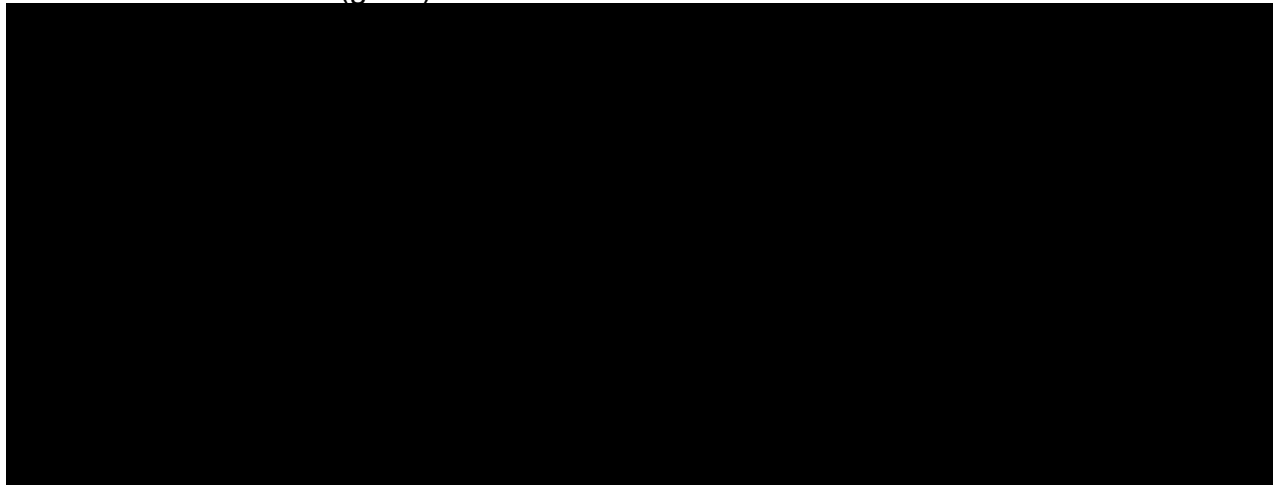
**Tabla 3.4** Optimización de HA mediante CDC; minimización del contenido de hemicelulosa y concentración de xilosa en RMR

No	X <sub>1RMR</sub> : RSL (p:v)	X <sub>2RMR</sub> : [H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (% v/v)	Hemicelulosa (%)	Xilosa (g/L)	Hemicelulosa Residual (%)	Hemicelulosa removida (%)

$$Hemicelulosa (\%)_{HARMR} = 47.8 - 8.82x_{1RMR} - 9.53x_{2RMR} + 1.266x_{1RMR}^2 + 1.335x_{2RMR}^2 + 0.09x_{1RMR}x_{2RMR} \quad (3.6)$$

A partir del gráfico de superficie de respuesta que se muestra en la Figura 3.7a se observa que las condiciones medias de operación llevan a una minimización del

proceso, alcanzándose concentraciones finales promedio de hemicelulosa de 14.56% que representan una remoción de 37.56%. Respecto al contenido original (23.33%), variando con los datos reportados por Gallina *et al.* (2018) de 9.7%, 10.9% y 18.8% del contenido final de hemicelulosa en cedro, arce y madera blanda tallada respectivamente. En el proceso se observa que mediante los factores medios de operación, se obtiene el efecto de minimización de hemicelulosa, donde el factor RSL se establece como la cantidad mínima necesaria para humedecer la materia, debido a que ésta presenta una alta capacidad de absorción a un medio líquido, por lo tanto mediante la Figura 3.7b se delimita los rangos de optimización la cual ocurre en un rango tolerante de concentración de  $H_2SO_4$  de 2.86% a 3.5% v/v, con una RSL de 1:3.4 a 1:3.6 (g:mL).



**Figura 3.7** (a) GSR de la minimización de hemicelulosa óptima, (b) Gráfico de contornos de la zona óptima de minimización de hemicelulosa del proceso de HA de RMR

Mediante un análisis canónico se determinó la optimización del proceso de HA de RMR, el cual se basó la localización de los puntos estacionarios que se muestran en la Ec 3.7 que se generan a partir del modelo experimental de la Ec 3.6, determinándose un tiempo de 30 min, una concentración  $H_2SO_4$  de 3.45 % v/v y una RSL de 3.36 g:mL

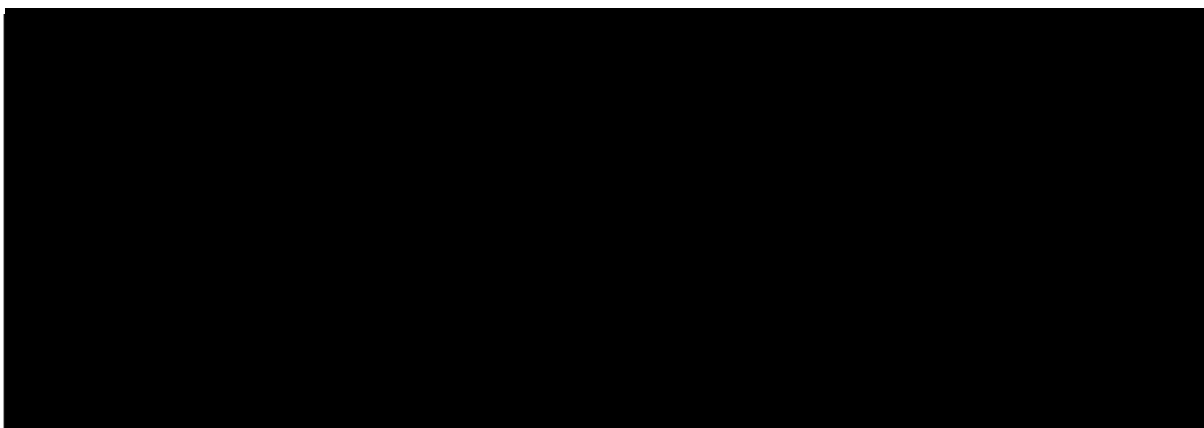
$$\text{[Redacted Equation]} \quad (3.7)$$

A partir de la Ec. 3.8 que representa la forma canónica del modelo experimental y la denotación positiva de los eigenvalores contenidos en la ecuación se comprueba

la minimización del contenido de hemicelulosa y los puntos estacionarios obtenidos en el proceso que se localizan en el gráfico de contornos de la Figura 3.7b.

$$\hat{Y}_{CDRMR} = 47.8 + 1.36W_{1RMR}^2 + 1.25W_{2RMR}^2 \quad (3.8)$$

La producción de xilosa generado a partir del CDC de HA de RMR, se observa una maximización de la concentración de xilosa, la cual crece mientras mayor sean los niveles de RSL (Figura 3.8a), encontrándose un límite físico en la absorción del medio ácido por parte de RMR, por lo que el licor obtenido éste presentó una mayor concentración de xilosa en menor cantidad de licor, bajo las condiciones óptimas de operación, de 30 min, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 3.45% v/v y una RSL de 1:3.36 (g:mL) se obtuvo una concentración de xilosa de 25.16 g/L, como se observa en la Figura 3.8b, cuya producción de xilosa obtenida a partir de la ruptura de las pentosas contenidas en la fracción hemicelulósica es 40.55% mayor que la reportada por Rafiqul *et al.* (2012) de 17.9 g/L empleando condiciones más altas de tiempo (60 min) y concentración de ácido de (4% p/p).



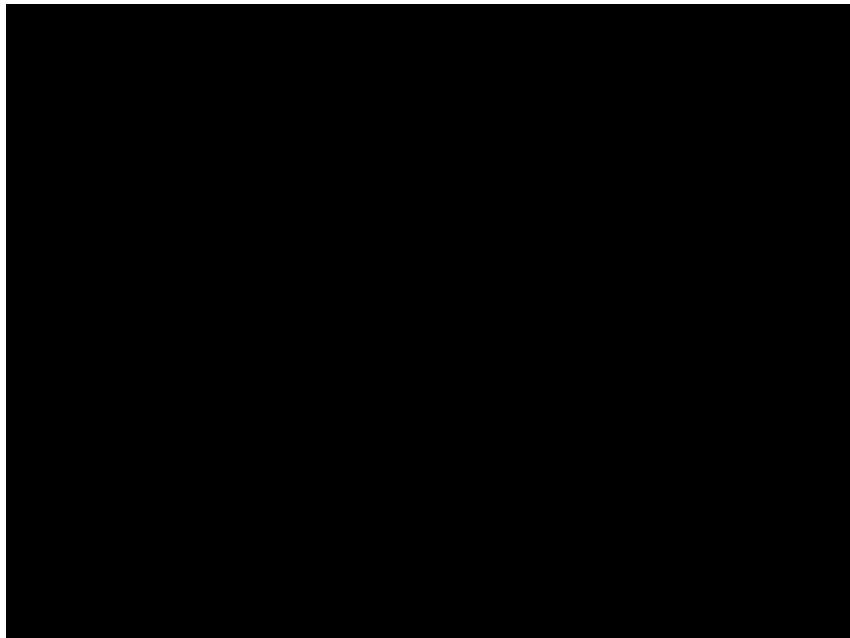
**Figura 3.8** (a) GSR de máxima producción de xilosa, (b) Gráfico de contornos de la producción de xilosa; efecto de la concentración de ácido respecto al tiempo sobre rupturas de pentosas en RMR

### 3.2.3 Validación de optimización del proceso de remoción del contenido de hemicelulosa para CC y RMR

Los resultados de validación del proceso óptimo de remoción de componentes hemicelulosicos después de la HA se muestra en la Tabla 3.5, donde también se reportan rendimientos de materia y concentración de inhibidores donde de acuerdo

a Parajo *et al.* (1998) la concentración máxima permisible de inhibidores es de 6 y 4 g/L para el ácido acético y furfural respectivamente, en esta investigación, sólo se formó ácido acético como inhibidor, a una concentración por debajo del límite, el cual se produjo como consecuencia de la desacetilación de las cadenas laterales de la hemicelulosa por efecto de la hidrólisis ácida, mientras que la aparición de furfural se le atribuye a la descomposición térmica de las pentosas debido a la prolongada exposición de los azúcares a temperaturas superiores a los 120 °C (Jeevan *et al.*, 2011).

**Tabla 3.5** Reporte de datos obtenidos sobre validación de HA en prueba semi-piloto de 1 Kg



### 3.3 Hidrólisis alcalina

#### 3.3.1 Hidrólisis ácida-alcalina (HAcAl) de CC

El proceso de optimización de HAcAl para el CC se realizó mediante un CDC equirradial, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.6.

El análisis estadístico se realizó mediante el software NCSS, siendo la variable de respuesta el contenido de lignina (%), en donde se obtuvo una  $R^2$  con un ajuste del

85.18%, lo cual garantiza la fiabilidad de las correlaciones del modelo que se muestra en la Ec. 3.9, generando el gráfico de probabilidad normal con una dispersión de 14.82% (Anexo C1) y el ANOVA que se muestra en el Anexo C2.

**Tabla 3.6** Optimización de HAcAl de CC mediante CDC; minimización del contenido de lignina  
Factor fijo; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 8% v/v

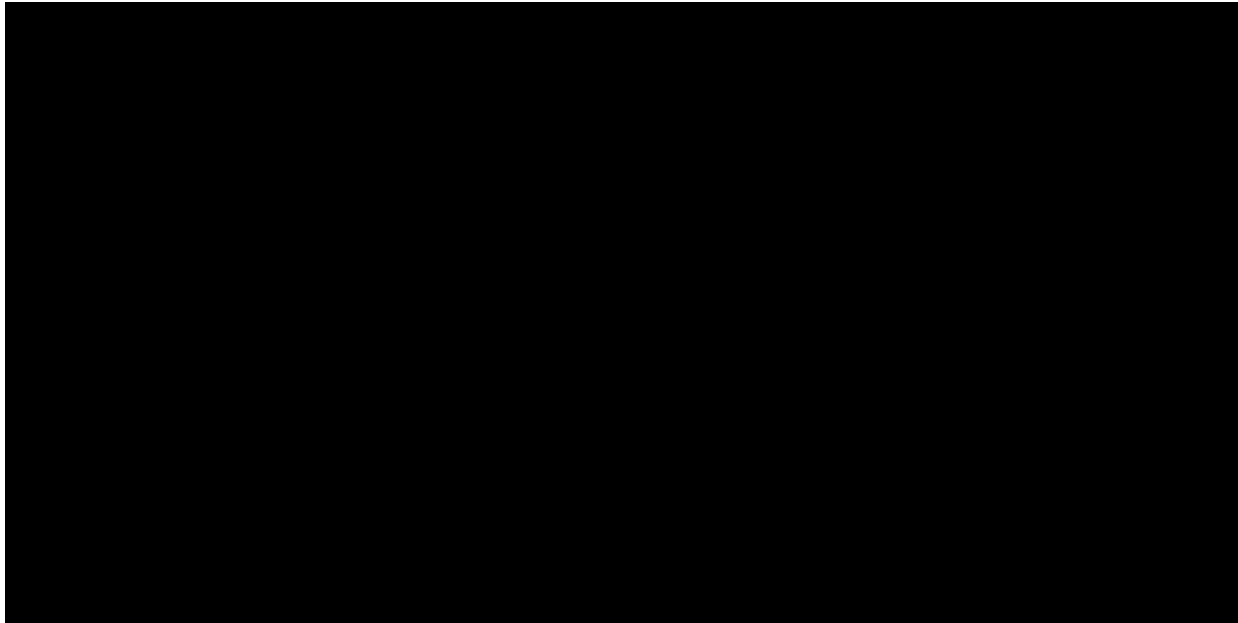
Variables codificadas	Resultados

$$Lignina(\%)_{HAcAl-CC} = 92.6812 - 3.3562x_{1HAcAl-CC} - 5.4711x_{2HAcAl-CC} + 0.0405x_{1HAcAl-CC}^2 + 0.1954x_{2HAcAl-CC}^2 + 0.0477x_{1HAcAl-CC}x_{2HAcAl-CC} \quad (3.9)$$

El proceso de remoción de lignina sobre el CC ocurre en condiciones descritas, como se observa en Figura 3.9a; a tiempos prolongados y RSL altas, el contenido de lignina no disminuye considerablemente, siendo las condiciones medias de operación las que se encargan de minimizar el contenido de lignina, con concentraciones promedio finales de 6.38% representado remociones de lignina de 58.30%.

Mediante un análisis canónico se determinó la optimización del proceso de ácido-alcalino de CC, el cual se basó la localización de los puntos estacionarios que se muestran en la Ec 3.10 que se generan a partir del modelo experimental de la Ec

3.9, determinándose un tiempo de 35.76 h, una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 8 % v/v a una RSL de 1:9.64 g:mL.



**Figura 3.9** (a) GSR del proceso de minimización de lignina, (b) Gráfico de contornos de zona óptima del proceso de minimización óptima de lignina en cascarilla de CC

A partir de la Ec. 3.11 que representa la forma canónica del modelo experimental, se comprueba la minimización del contenido de lignina y los puntos estacionarios obtenidos en el proceso que se localizan en el gráfico de contornos de la Figura 3.9b, donde se denota que el proceso de optimización ocurre en intervalo de tiempo de 32.8 a 38.2 h con una RSL de 1:8.56 a 1:11.4 g:mL.

$$\hat{Y}_{HACAL-CC} = 92.6812 + 0.1993w_{1CC}^2 + 0.0366w_{2CC}^2 \quad (3.11)$$

### 3.3.2 Hidrólisis alcalina-cruda (HAICr) de CC

El proceso de optimización de HAICr para el residuo de CC se realizó mediante un CDC equirradial, cuyas condiciones de operación se muestran en la Tabla 3.7, donde dichos resultados se analizaron estadísticamente (Anexo C3) generando el ANOVA y gráfico de probabilidad normal con una dispersión de 4.07%. La experimentación de la hidrólisis alcalina cruda de CC está representada por el

modelo de la Ec. 3.12 en donde se obtuvo una  $R^2$  con ajuste del 95.93%, lo cual garantiza la fiabilidad de las correlaciones experimentales.

**Tabla 3.7** Optimización de HAICr de CC mediante CDC; minimización del contenido de lignina. Factor fijo; tiempo = 35 h

Variables codificadas	Resultados

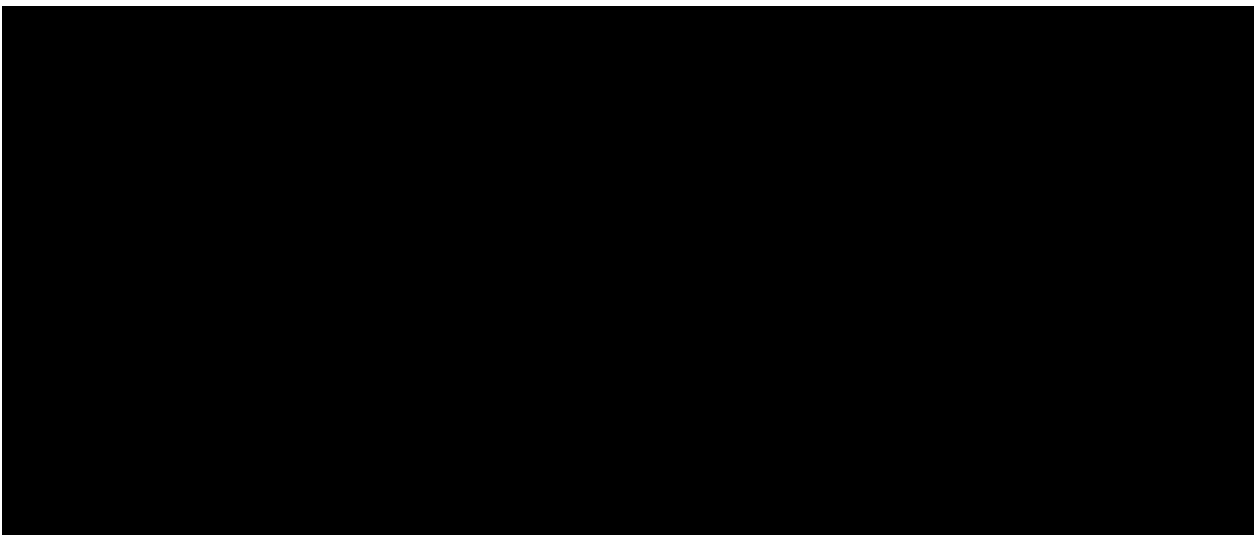
$$\text{[Redacted Equation]} \quad (3.12)$$

La minimización de lignina a partir de la materia cruda duplica la concentración de peróxido en comparación con el proceso ácido alcalino, con una RSL de 1:12 (g:mL), en donde a partir de una RSL de 1:14 (g:mL) el proceso se empieza a inhibir como se muestra en la Figura 3.10a. El contenido de lignina sobre CC crudo disminuye a un promedio de 5.41%, lo que representa una remoción promedio de 52.95% que se presenta en los niveles medios de operación.

Mediante un análisis canónico se determinó la optimización del proceso de HAICr de CC, el cual se basó la localización de los puntos estacionarios que se muestran en la Ec 3.13 que se generan a partir del modelo experimental de la Ec 3.12,



obteniéndose una RSL de 1:12.46 g:mL, una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 14.82 % v/v a un tiempo de 35 h.



**Figura 3.10** (a) GSR del proceso de minimización de lignina, (b) Gráfico de contornos de zona óptima del proceso de minimización de lignina en cascarilla de CC

A partir de la Ec. 3.14 que representa la forma canónica del modelo experimental, se comprueba la minimización del contenido lignina y los puntos estacionarios obtenidos en el proceso que se localizan en el gráfico de contornos de la Figura 3.10b, donde se denota perfectamente que el proceso de optimización ocurre en intervalo de peróxido de 7.6 a 21 % v/v con una RSL de 1:10.59 a 1:14.3 g:mL.

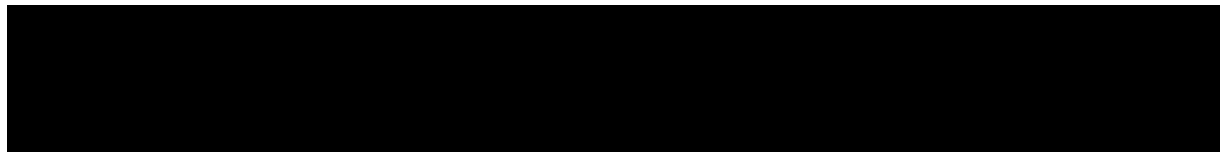
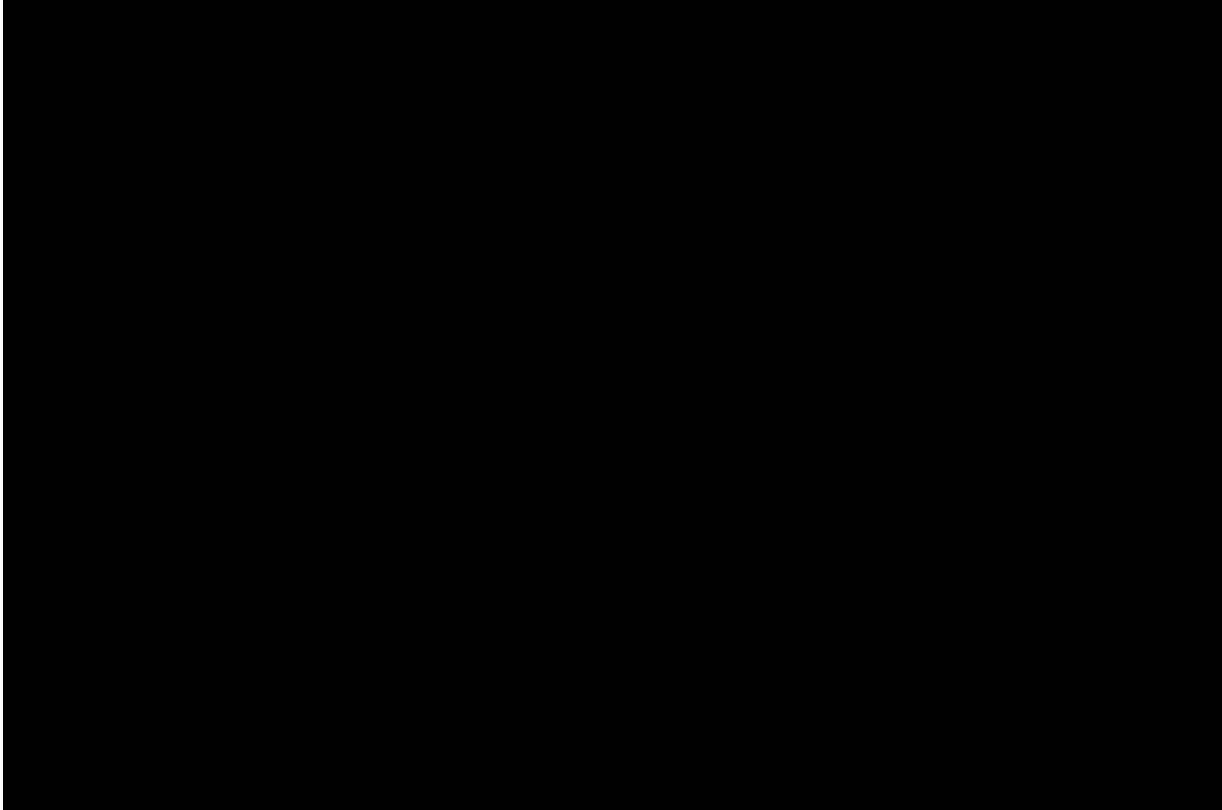
$$\hat{y}_{HAlCr-CC} = 41.17 + 0.2048w_{1CC}^2 + 0.0186w_{2CC}^2 \quad (3.14)$$

### 3.3.3 Hidrolisis ácida-alcalina de RMR

El proceso de optimización de HAcAl sobre residuos de RMR se realizó mediante un diseño Box Behnken, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.8. El análisis estadístico se realizó mediante el software NCSS, siendo la variable de respuesta el contenido de lignina (%), generado el grafico de probabilidad normal con una dispersión de 1.11% (Anexo D1) y el ANOVA (Anexo D2). El modelo obtenido mediante la experimentación de hidrolisis ácida alcalina descrito en la Ec. 3.15

obtuvo un ajuste ( $R^2$ ) del 98.89% que garantiza la fiabilidad de las correlaciones experimentales.

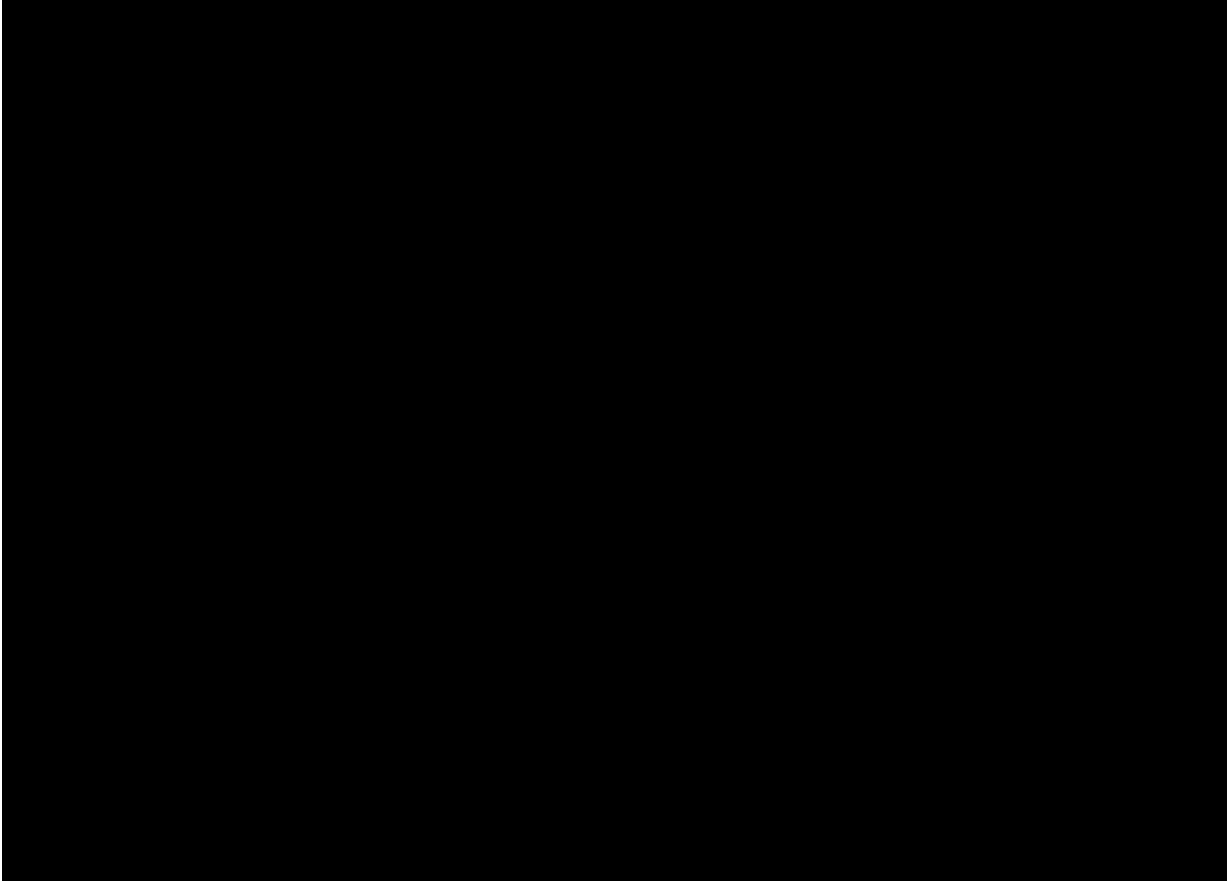
**Tabla 3.8** Optimización de HAcAl de RMR mediante Box Behnken; minimización del contenido de



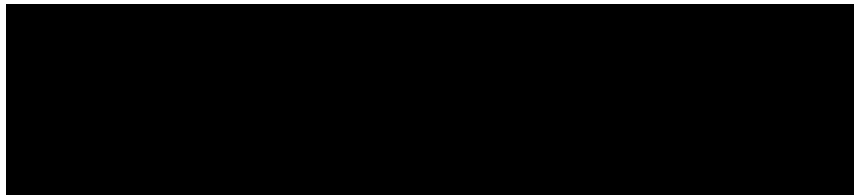
El RMR tiene como característica principal el ser un material altamente absorbente por lo que requiere para la minimización (Figura 3.11) RSL altas (1:16) en una concentración aproximada de 8% de  $[H_2O_2]$ , con respecto al tiempo, para todas las combinaciones peróxido/RSL, la minimización se presenta en un intervalo de 35 a 40 h, dejando un contenido promedio de 8.82% el cual representa una remoción del 42.4% sobre la materia ácida alcalina.

Mediante un análisis canónico se determinó la optimización del proceso de HAcAl de RMR, el cual se basó en la localización de los puntos estacionarios que se

muestran en la Ec 3.16 que se generan a partir del modelo experimental de la Ec. 3.15, obteniéndose un tiempo de 43.56 h, una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 7.95 % v/v y una RSL de 1:16.77 g:mL.



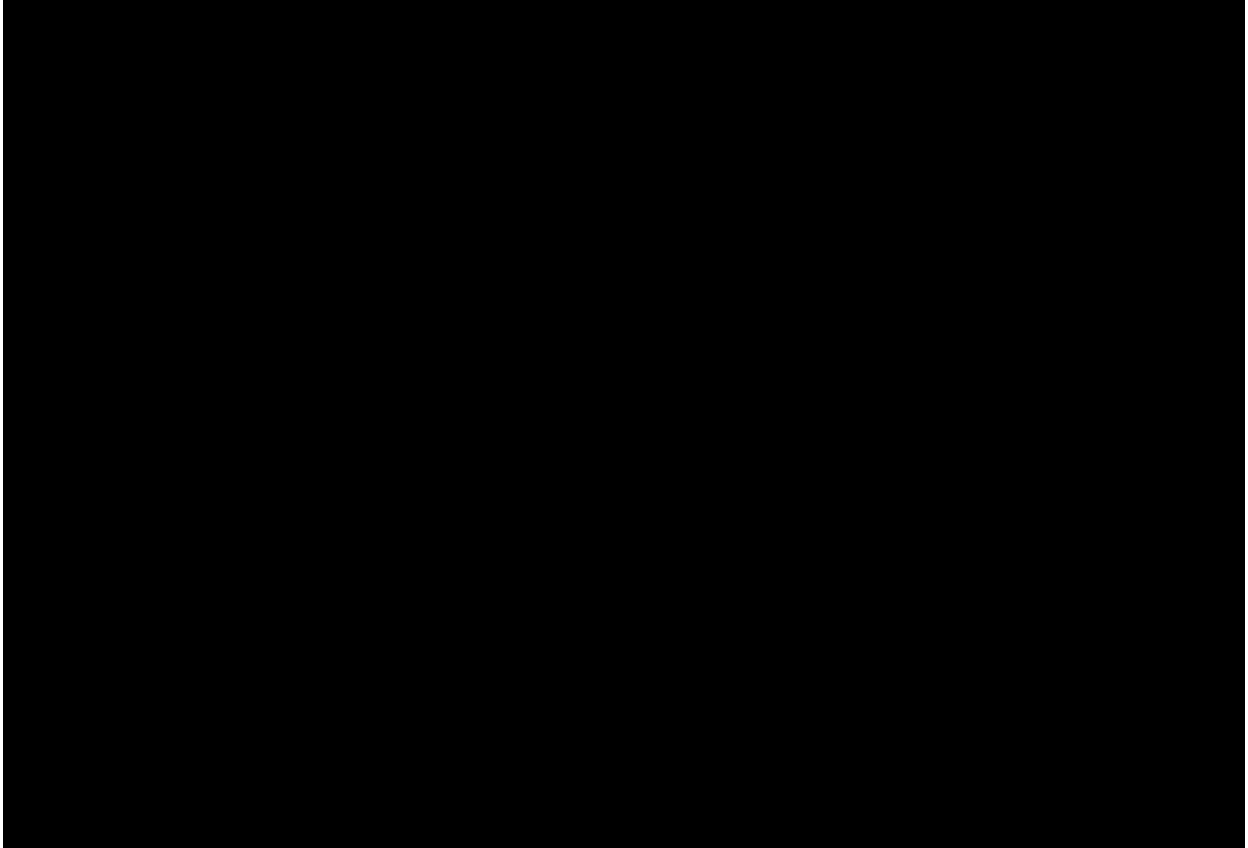
**Figura 3.11** GSR del proceso de minimización óptima del contenido de lignina sobre RMR ácida alcalina; a)  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  (%v/v) vs tiempo (h), b) tiempo (h) vs RSL (g:mL) y c) RSL (g:mL) vs  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  (%v/v)



(3.16)

A partir de la Ec. 3.17 se representa la forma canónica del modelo experimental, donde se comprueba la minimización del contenido de lignina y los puntos estacionarios obtenidos en el proceso que se localizan en el gráfico de contornos de la Figura 3.12, la optimización ocurre en un intervalo de tiempo de 36 a 44 h con una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 7.3 8.6 y una RSL de 1:14.8 a 1:16.8 g:mL.

$$\hat{y}_{HAAl-M} = 132.41 + 0.7392w_{1madera}^2 + 0.1741w_{2madera}^2 + 0.0132w_{3madera}^2 \quad (3.17)$$



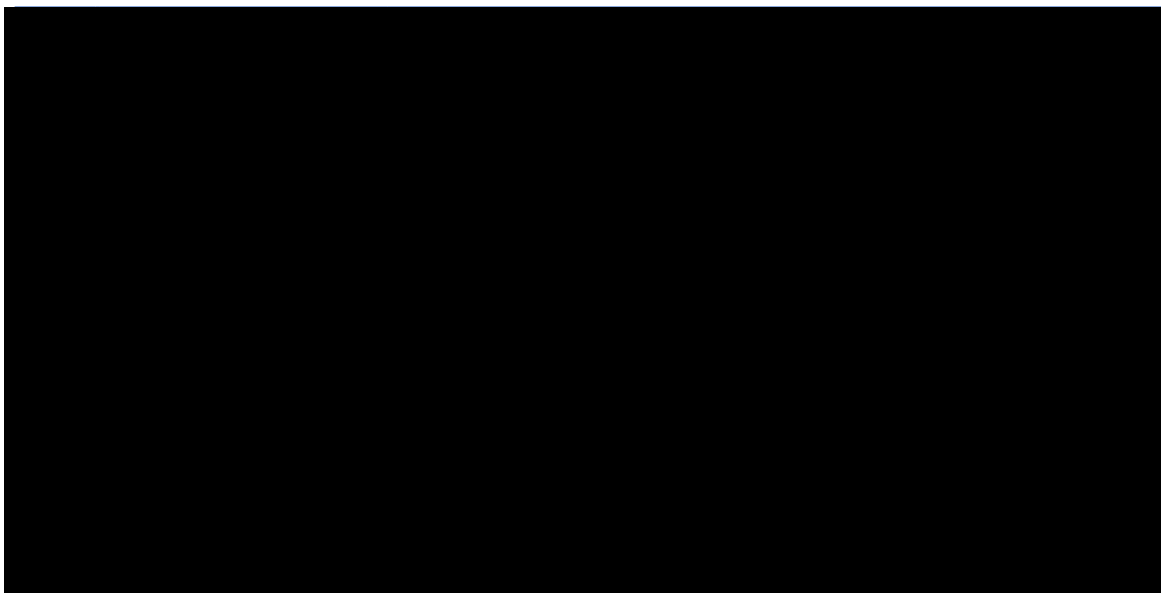
**Figura 3.12** Contornos de zona optima del proceso de minimización de lignina en RMR ácida-alkalina: a) tiempo (h) vs [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (%v/v), b) tiempo (h) vs RSL (g:mL) y c) [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (%v/v) vs RSL (g:mL)

### 3.3.4 Hidrolisis alcalina-cruda de RMR

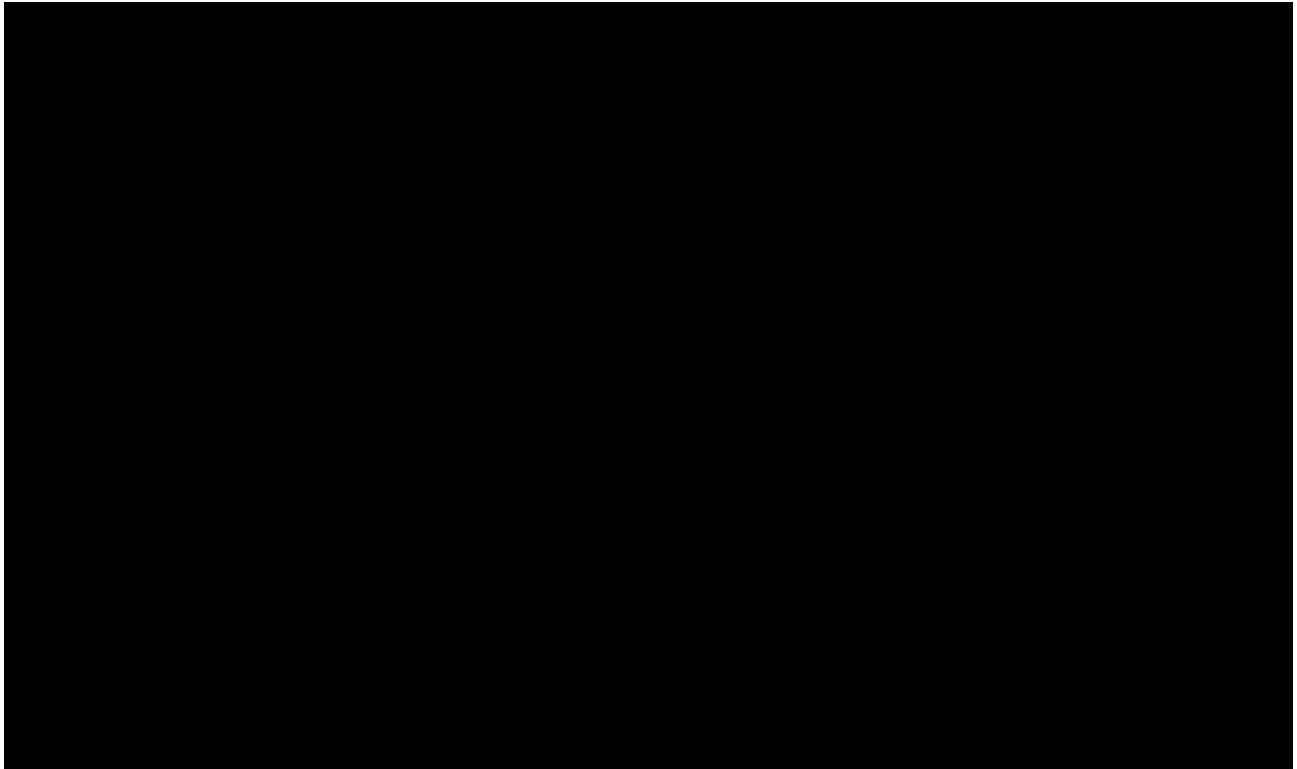
El proceso de optimización de HAICr de RMR se realizó mediante un CDC equirradial, cuyas condiciones de operación se muestran en la Tabla 3.9. El análisis estadístico se realizó mediante el software NCSS, siendo la variable de respuesta el contenido de lignina (%), en donde se obtuvo una R<sup>2</sup> con ajuste del 95.04%, lo cual garantiza la fiabilidad de las correlaciones del modelo que se muestra en la Ec. 3.18. generado grafico de probabilidad normal con una dispersión de 4.96% (Anexo D1) y el ANOVA (Anexo D3).

El proceso de remoción de lignina se aprecia en la GSR (Figura 3.13a) sobre el bagazo crudo de RMR la cual ocurre en los niveles medios del proceso, a tiempos cortos se remueve la lignina en apenas un 20% y la prolongación de los tiempos daña el material proporcionalmente a la concentración de peróxido utilizada, debido a la acción oxidativa a altas concentraciones de la reacción propia, este último factor tiene un límite de operación por debajo de 20% v/v, donde la zona ideal de minimización del proceso remueve el contenido de lignina sobre el bagazo crudo de RMR de 7.38% representado remociones de lignina de 46.42%.

**Tabla 3.9** Optimización de HAcAI de RMR mediante CDC; minimización del contenido de lignina.  
Factor fijo; RSL = 1:15



Mediante un análisis canónico se determinó la optimización del proceso de HAICr de RMR, el cual se basó la localización de los puntos estacionarios que se muestran en la Ec 3.19 que se generan a partir del modelo experimental de la Ec 3.18, siendo los valores estacionarios una RSL de 1:15 g:mL, una concentración de  $H_2O_2$  de 15.54 % v/v en un tiempo de 30.64 h como se observa en la Figura 3.13b, comprobándose la optimización del proceso mediante los eigenvalores de la Ec. 3.20.



**Figura 3.13** (a) GSR del proceso de minimización de lignina, (b) Gráfica de contornos de zona óptima del proceso de minimización de lignina en bagazo de RMR cruda

### **3.3.5 Validación de optimización del proceso de remoción del contenido de lignina para procesos de CC y RMR; ácida alcalina y alcalina cruda**

Los resultados de la validación de las condiciones óptimas, sobre 1 Kg de materia prima, se muestra en la Tabla 3.10.

**Tabla 3.10** Validación de condiciones óptimas del proceso de hidrólisis para CC y RMR mediante hidrólisis ácida alcalina y alcalina cruda

El efecto de deslignificación de CC generó remociones de 58.30% y 52.95 % para los tratamientos ácido alcalino y alcalino crudo respectivamente, mejorando el proceso contra las fibras de RMR residual en un 27.01 y 19.64 % para dichos tratamientos.

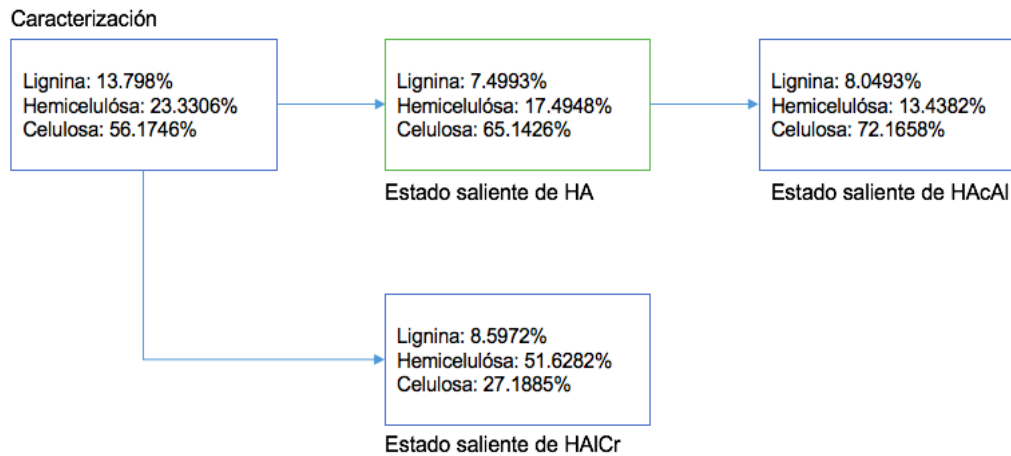
Los resultados de remoción de lignina en RMR a partir de la hidrólisis ácida-alcalina fue de 42.4% y para el tratamiento directo (alcalino-crudo) fue de 46.42%, remociones menores a las reportadas por Rodríguez *et al.* (2017) sobre madera suave de pino con remociones de lignina de 57.07%, mientras que Hosgun y Bozan (2014) trabajando con plantíos de amapola como sustrato obtuvieron remociones de 58.89%. Estos dos sustratos tienen la particularidad de ser sometidos a tratamientos previos de tipo ácido e hidrolizados en un medio alcalino a concentraciones 50% menores a los puntos estacionarios mostrados en las Ecs. 3.16 y 3.19.

Estas remociones a menores concentraciones de agentes oxidantes se deben a que fueron aplicados a un solo tipo de sustrato y no a una mezcla de maderas no controladas como fue el utilizado en esta investigación, puesto que las concentraciones bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tienen la capacidad de romper las diferentes proporciones poliméricas de todos los tipos de madera.

Las remociones obtenidas en esta investigación son mayores al obtener disminuciones de lignina de alrededor del 50% en promedio comparado contra las remociones reportadas por Soto *et al.* (2013) quienes realizaron hidrólisis alcalinas como pretratamiento a una sacarificación a lotes de madera mezclada en igual proporción de *P. Arizonica*, *P Cooperi*, *P durangensis* y *Averge* en igualdad de proporciones obteniendo remociones promedio de lignina de 12.12%.

### 3.3.6 Prueba de aplicación de condiciones óptimas del proceso de hidrólisis alcalina en madera dura

Se realizó una prueba sobre madera dura (cedro), empleando las condiciones óptimas del proceso, desde la caracterización para darle el correcto seguimiento a la variación de la composición lignocelulósica (Figura 3.14) donde el proceso tiene un comportamiento similar al estudio de RMR, obteniéndose una remoción de 45.68% de lignina para el proceso ácido-alcalino y 37.70% para el tratamiento alcalino-crudo, eficiencias menores a las reportadas por los procesos de deslignificación de mezclas de madera.



**Figura 3.14** Composición estructural de madera dura; cedro, después de cada proceso de pretratamiento de hidrólisis

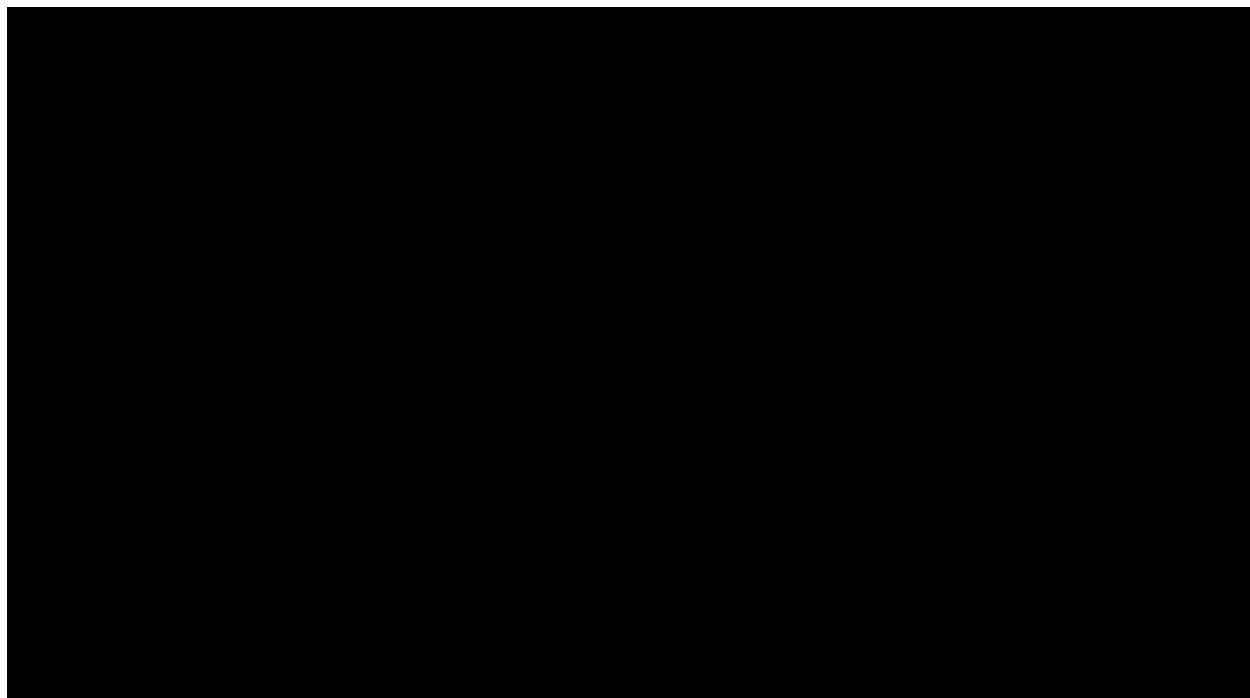
### 3.4 Hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de CC y RMR

En la Figura 3.15 se muestra el comportamiento y desarrollo de las cinéticas enzimáticas realizadas con muestras de 10 g.

El proceso de sacarificación de CC se observa en la Figura 3.15a, en donde el tratamiento ácido-alcalino alcanza una generación de glucosa con una concentración de 98.54 g/L representado un rendimiento del 59.12%, mientras que el CC proveniente del tratamiento alcalino-crudo generó una concentración de 70.36

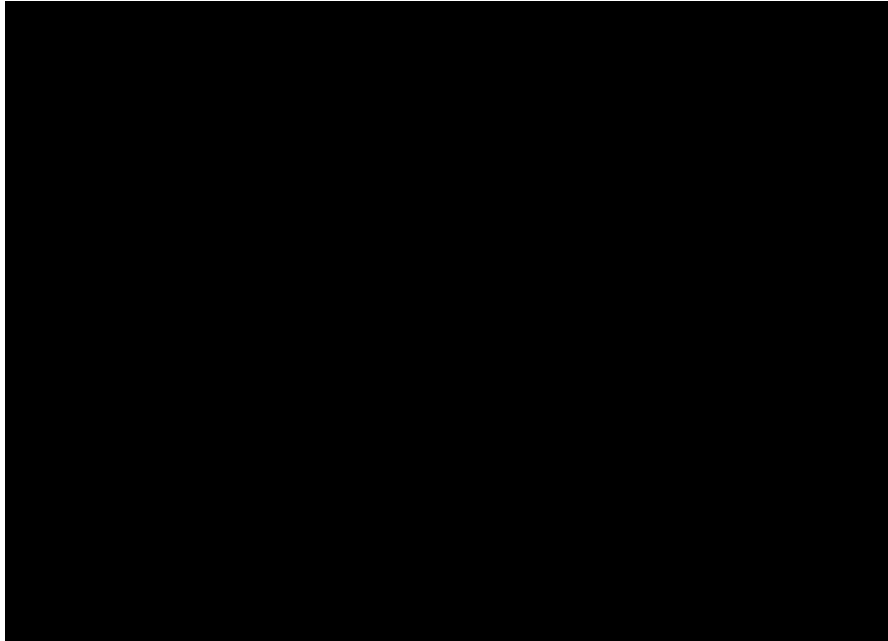


g/L equivalente a un rendimiento de proceso de 42.22%, es decir, 40.05% menos de glucosa en iguales condiciones de operación descritas en la sección 2.4.



En la Figura 3.15b se observa el comportamiento de generación de glucosa de la RMR a partir de los tratamientos ácido-alcalino y alcalino-crudo, los cuales tuvieron concentraciones finales de glucosa de 47.67 g/L y 45.28 g/L respectivamente, representando un rendimiento global del proceso de 22.64% y 23.87%, observándose que no hay una diferencia sustancial entre los resultados, con apenas un 5.27% mayor la concentración de glucosa obtenida a partir del tratamiento ácido-alcalino sobre el tratamiento alcalino-crudo.

En base a los resultados obtenidos, donde los sustratos ácido-alcalino obtuvieron la mayor generación de glucosa durante el proceso de sacarificación, se realizó el estudio y generación de azúcares fermentables de estos sustratos en lotes de 75 g. El proceso general a nivel reactor de la cinética enzimática a partir de celulasas; Cellic CTec3 de la empresa Novoenzymes se muestran en la Figura 3.16 para CC y RMR.



**Figura 3.16** Cinética enzimática del proceso de sacarificación a partir de sustratos lignocelulósicos ácido-alcalino para generación de glucosa nivel reactor

El comportamiento del incremento de producto en función del tiempo queda representado por la regresión polinomial de segundo orden que muestran las Ecs. 3.21 y 3.22, con un ajuste ( $R^2$ ) de 0.9991 y 0.9957 respectivamente.

$$Glucosa\left(\frac{g}{L}\right)_{CC} = -0.024t^2 + 3.3194t - 0.2541 \quad (3.21)$$

$$Glucosa\left(\frac{g}{L}\right)_{RMR} = -0.0134t^2 + 1.8345t + 0.1984 \quad (3.22)$$

En el análisis de la cinética escalada de los sustratos empleados se observa un incremento en la concentración de glucosa en comparación con las pruebas realizadas a 10 g, obteniéndose concentraciones finales de azúcares fermentables de 115.59 g/L y 63.32 g/L, para el CC y RMR respectivamente, lo cual representa un incremento en la concentración del 17.30% y 32.82% respecto a la prueba nivel matraz, esto debido a la mayor estabilidad que ofrece el sistema de control del reactor empleando, en donde la madera fue el sustrato de mayor inestabilidad con

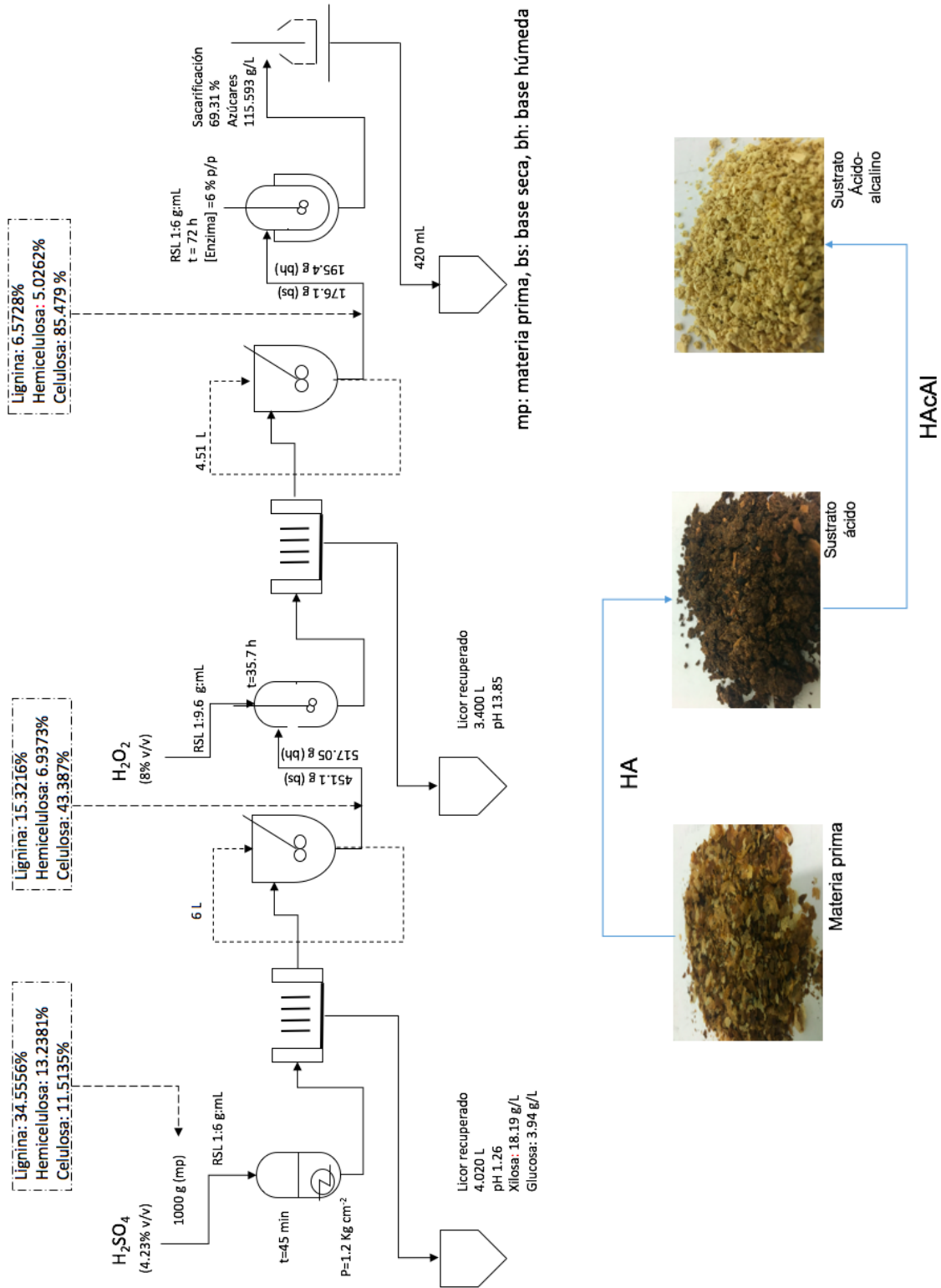
una tendencia hacia la acidificación del licor de reacción lo cual provocó una adición constante de NaOH para el ajuste al pH óptimo de operación. En términos generales el proceso tuvo rendimientos globales de 69.35% para el CC y 31.66% para el RMR.

Scully *et al.* (2016), reportaron un estudio de hidrólisis enzimática a partir de residuos de café, evaluando el tiempo, carga enzimática Celluclats y de sustrato, alcanzando concentraciones de azúcares de 26.05 g/L, 4 veces menor que la encontrada en ésta investigación. Yamada *et al.* (2016) realizaron el proceso de sacarificación a tres tipos de madera; madera suave, eucalipto y cedro generando conversiones de glucosa de 39.8%, 43.5% y 40.8%, utilizando acetato de sodio como buffer mediante la utilización de Cellic CTec1, siendo en promedio 50% menor que la encontrada con mezcla de maderas en esta investigación.

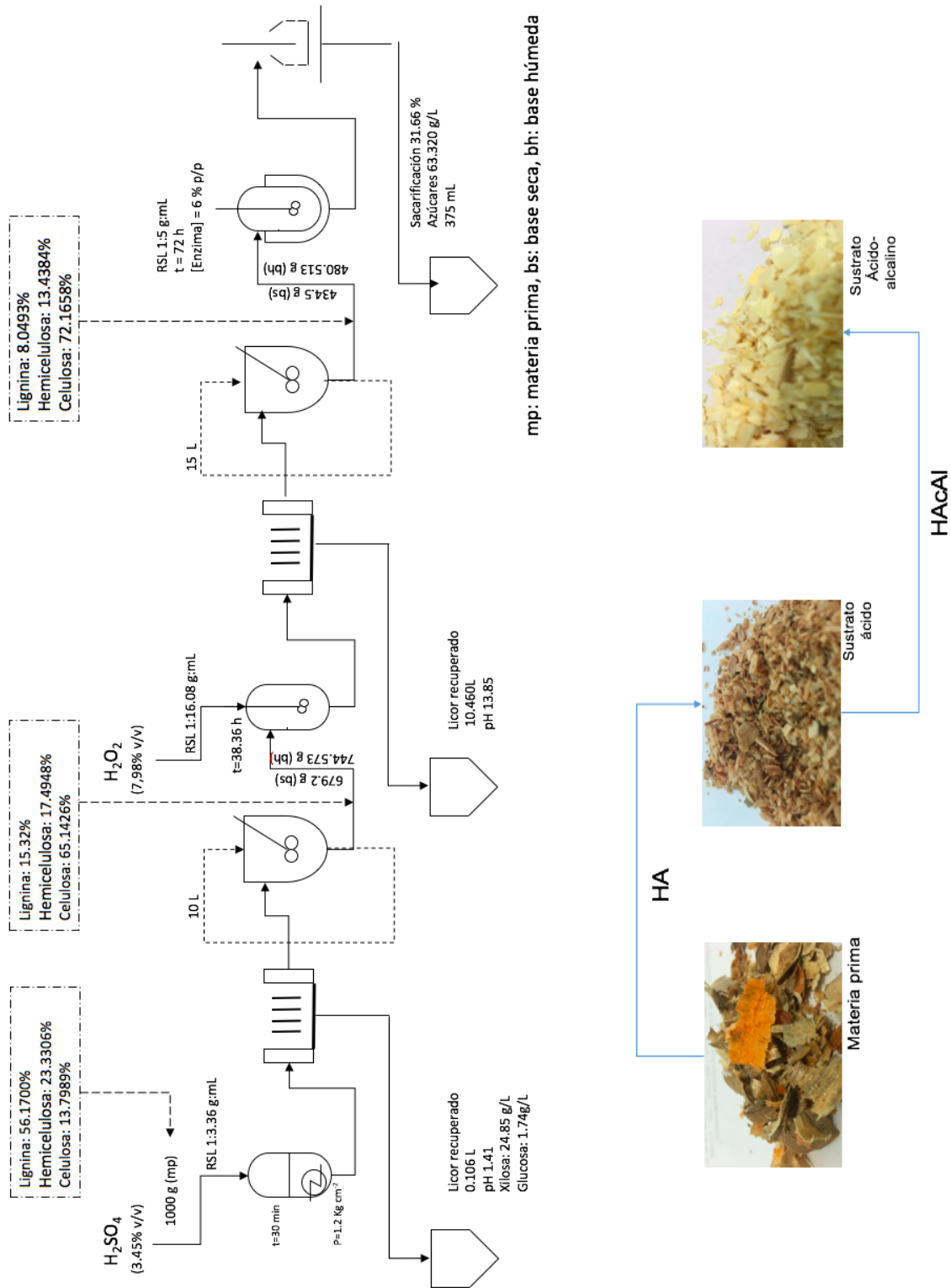
### **3.5 Resumen y balance del proceso de generación de azúcares fermentables mediante residuos lignocelulósicos**

El estudio de las múltiples etapas del proceso de obtención de azúcares fermentables, se muestra en las Figuras 3.17 y 3.18 para los procesos que comprenden las etapas de hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y sacarificación mientras que en las Figuras 3.18 y 3.19 presentan la línea de proceso que comprende las etapas de hidrólisis alcalina y sacarificación.

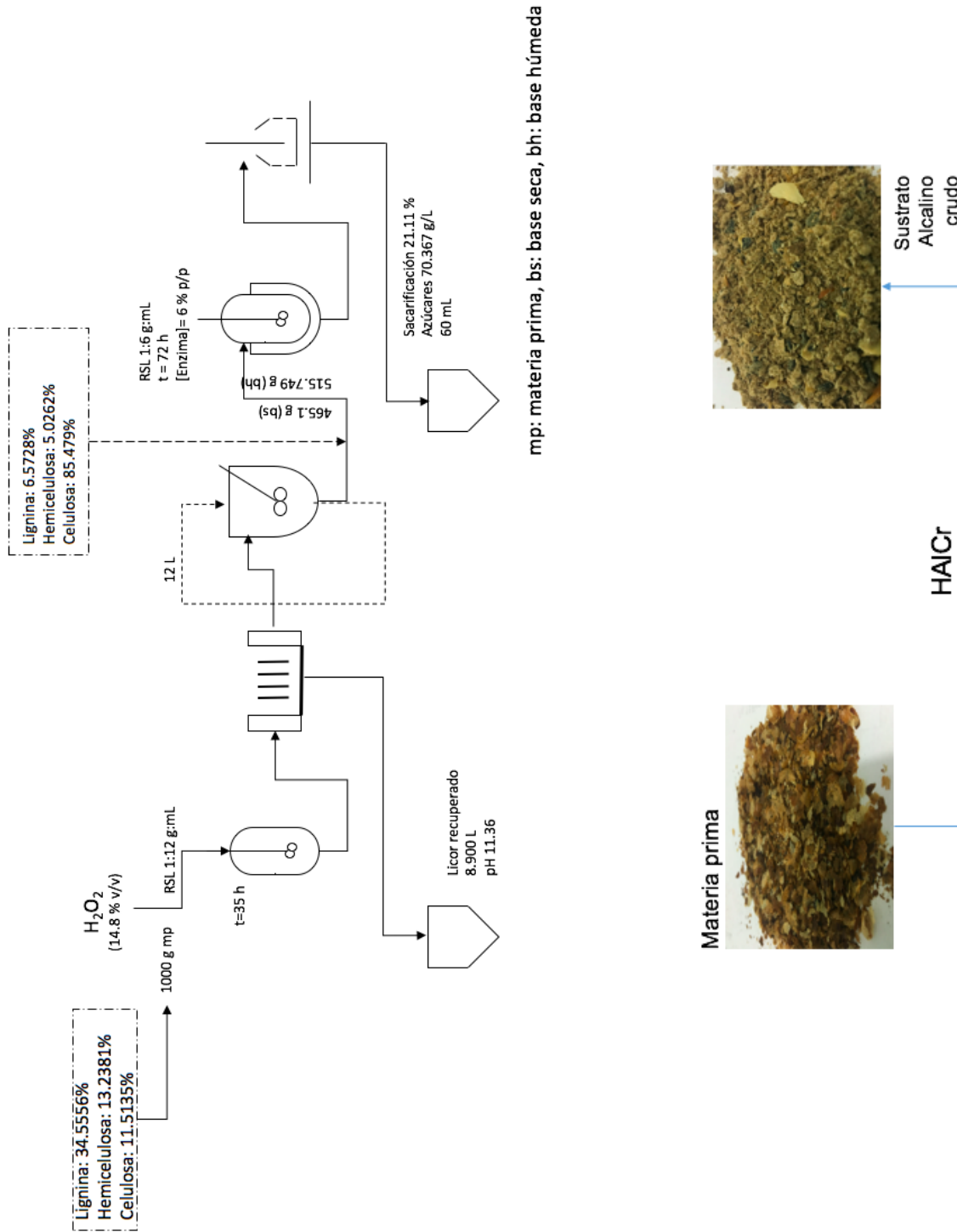
En estos esquemas de proceso se observa el balance de materia, utilización de insumos, entradas y salidas de proceso, así como las condiciones de operación de cada hidrólisis, demostrando el estado lignocelulósico del sustrato después de cada etapa de proceso fisicoquímico.



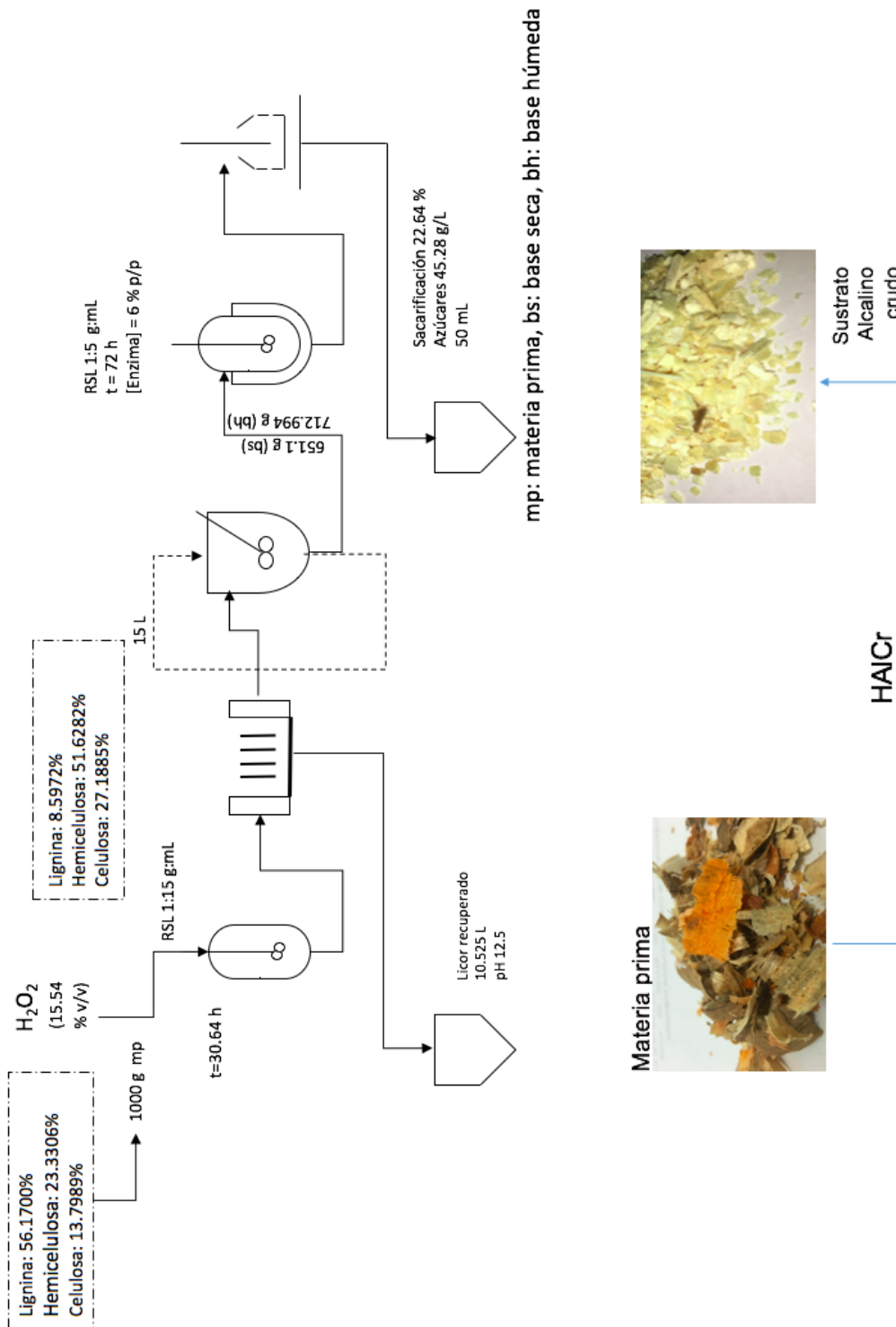
**Figura 3.17** Línea de proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de CC mediante; hidrólisis ácido-alcalina-enzimática y efecto de tratamientos sobre fibras lignocelulósicas



**Figura 3.18** Línea de proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de RMR mediante; hidrólisis ácido-alcalina-enzimática y efecto de tratamientos sobre fibras lignocelulósicas



**Figura 3.19** Línea de proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de CC mediante; hidrólisis alcalina-enzimática y efecto de tratamientos sobre fibras lignocelulósicas



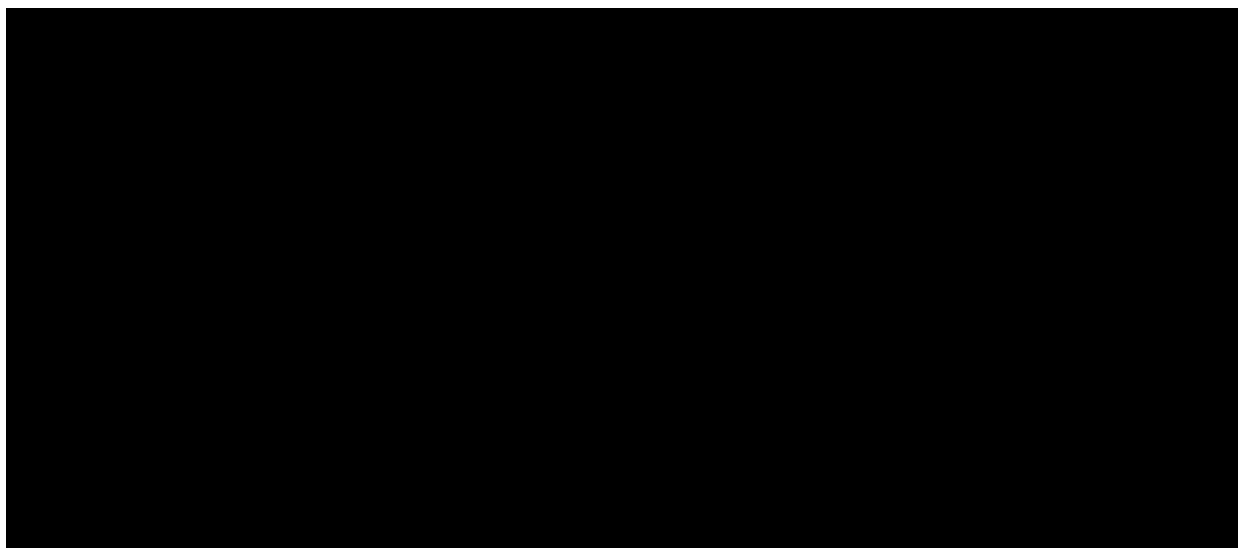
**Figura 3.20** Línea de proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de RMR mediante; hidrólisis alcalina-enzimática y efecto de tratamientos sobre fibras lignocelulósicas

### 3.6 Producción de etanol de segunda generación

A partir de los licores ricos en azúcares fermentables, generados en el proceso de sacarificación de CC y RMR se procedió a realizar cultivos de fermentación alcohólica por lotes para producir etanol de segunda generación de carácter lignocelulósico, donde dicho estudio permitió evaluar la viabilidad del proceso mediante el análisis de rendimientos y productividades generados durante el mismo.

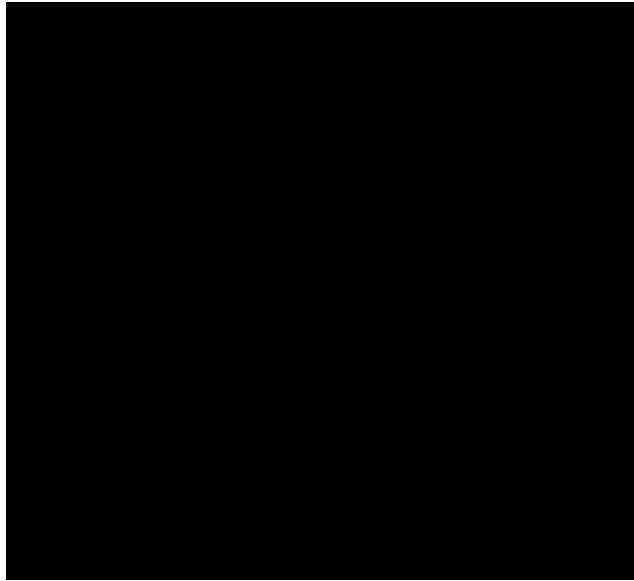
#### 3.6.1 Cultivos de hidrolizados lignocelulósicos de CC para producción de etanol de segunda generación

Se realizaron dos cinéticas fermentativas a partir de la fuente de carbono generadas mediante la hidrólisis enzimática de CC deslignificado. Los cultivos por lotes estudiados se clasificaron en función de la suplementación empleada; i) cultivo en exceso de nutrientes (CC1) (Figura 3.21a) y ii) cultivo en ausencia de nutrientes (CC2) (Figura 3.21b), alcanzando una concentración promedio de biomasa de 5.26 y 3.38 g/L respectivamente para el cultivo enriquecido y no enriquecido cuyo comportamiento se observa en la Figura 3.22.



**Figura 3.21** Cinética de fermentación del sustrato generado a partir de material lignocelulósico de CC: a) ácido alcalino fortificado y b) no fortificado





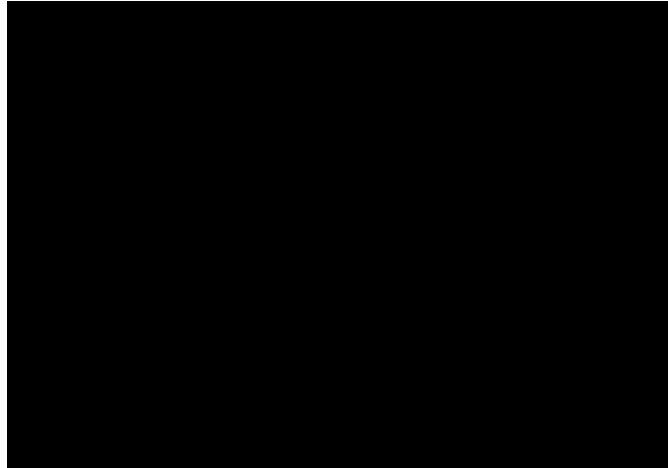
**Figura 3.22** Comportamiento de biomasa durante cinética de fermentación del sustrato generado a partir de material lignocelulósico de CC ácido alcalino fortificado y no fortificado

En la Figura 3.21a, se puede observar que la máxima producción de etanol para el cultivo CC1 fue de 48.19 g/L presente a las 20 h, mientras que la cinética del CC2 a las 12 horas encontró su máxima concentración de etanol de 29.02 g/L; mediante las concentraciones obtenidas se observó que la concentración de etanol fue 66.05% mayor a la del cultivo en exceso de nutrientes sobre el cultivo carente de nutrientes, evidenciando que la fuente de carbono lignocelulósica, necesita una suplementación rica en nutrientes para maximizar el correcto desarrollo de las células sobre el sustrato y generar la máxima producción de etanol y el consumo total del sustrato, puesto que la cinética CC2 dejó un remanente del 21.29% de azúcares fermentables.

En la Tabla 3.11 se presenta la comparación de los parámetros biocinéticos entre los cultivos de hidrolizados lignocelulósicos de café; en donde el mayor rendimiento ( $Y_{E/S}$ ), lo obtuvo el cultivo suplementado con un valor de 0.416 g/g el cual representa un incremento 371.9% (0.1121 g/g) mayor que el cultivo no suplementado, Respecto a la productividad del proceso, ambos cultivos tienen un valor similar (2.40 y 2.41 g/Lh), este parámetro está directamente ligado con el tiempo de generación de

etanol y a pesar de haber logrado una mayor concentración en el cultivo CC1, el cultivo CC2 obtuvo su mayor concentración en menor tiempo. La eficiencia del proceso fermentativo de CC1 superó tres veces el valor de eficiencia de CC2.

**Tabla 3.11** Rendimientos y bioparámetros de las cinéticas del cultivo lignocelulósicos de CC



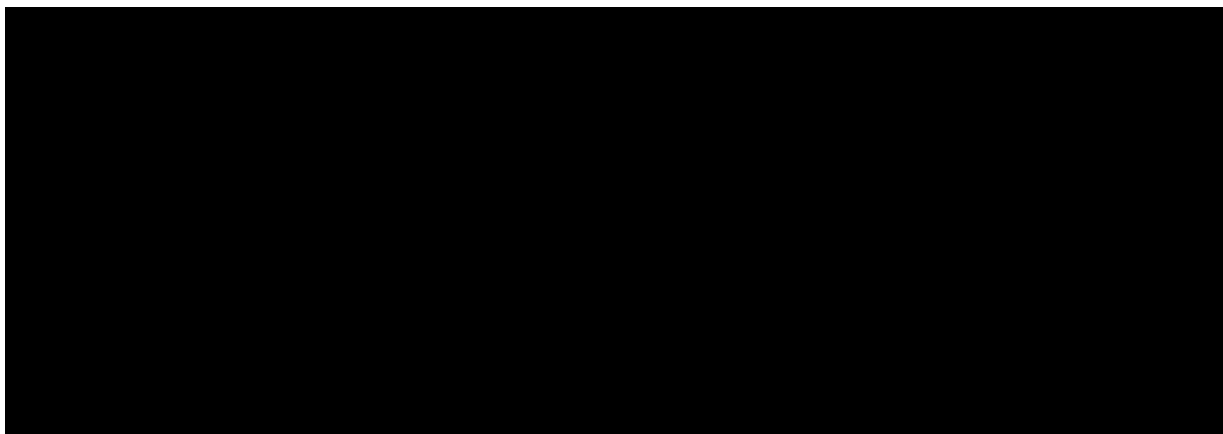
Menezes *et al.* (2013) realizaron una fermentación por lotes a partir de una concentración de azúcares de 34.23 g/L (2.3 veces menor a los azúcares fermentables de esta investigación) suplementado con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.1 g/L) y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2 g/L) generando una concentración de etanol de 11.99 g/L, concentración menor a los dos cultivos analizados en esta sección, generando un rendimiento de  $Y_{E/S}=0.40$  g/g similar a al rendimiento aquí obtenido de 0.41 g/g.

Mussatto *et al.* (2012), obtuvieron un rendimiento de  $Y_{E/S}=0.26$  g/g con una  $Q=0.49$  g/L h y una  $\eta_f=50.2\%$  a una concentración inicial de 54 g/L, éstos resultados son altamente deficientes contra esta investigación en base a los datos reportados en la Tabla 3.11.

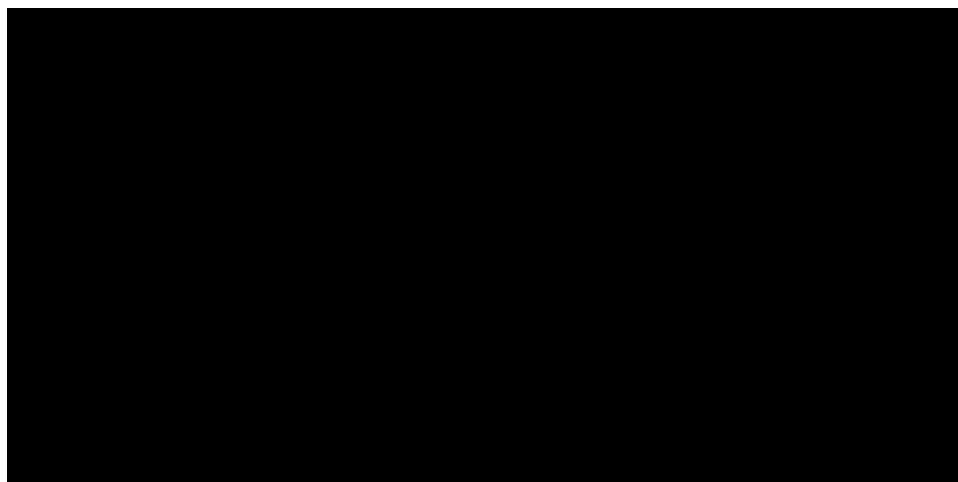
### **3.6.2 Cultivo de hidrolizados lignocelulósicos de RMR para producción de etanol de segunda generación**

De forma análoga a los cultivos de CC, se realizaron cinéticas de fermentación por lotes de los hidrolizados de RMR; i) cultivo en exceso de nutrientes (CM1) y ii) cultivo

en ausencia de nutrientes (CM2), cuyo comportamiento se muestra en las Figuras 3.23 y 3.24.



**Figura 3.23** Cinética de fermentación del sustrato generado a partir de material lignocelulósico de RMR ácido alcalino fortificado; a) consumo de sustrato, b) producción de etanol del CM1 y c) producción de etanol del CM2



**Figura 3.24** Cinética de fermentación del sustrato generado a partir de material lignocelulósico de RMR ácido alcalino no fortificado; a) crecimiento de biomasa y b) presencia de glicerol en CM2

A partir de la Figura 3.23a se observa el consumo total de sustrato de ambos cultivos con una concentración inicial 63 g/L, mientras que en las Figuras 3.23b y 3.23c se observa que se obtuvieron concentraciones de etanol de 22.56 g/L y 18.70 g/L (CM1 y CM2), siendo 26.74 y 5.05 % respectivamente mayor a los datos reportados por Ko *et al.* (2016) debido a que ellos obtuvieron una concentración de etanol de 17.8 g/L, con una concentración inicial de glucosa de 27.7 g/L, en condiciones de cultivo

similares (30°C, pH 5, 200 rpm). La inestabilidad del cultivo se evidencio debido a que la cinética del CM1 con un promedio de biomasa de 3.18 g/L (Figura 3.24a) tuvo una tendencia a la generación de glicerol (Figura 3.24b), en donde el efecto de metabolización de etanol se presentó hasta las 24 h y fue descendiendo hasta el final de la cinética, mientras que la cinética del CM2 mostro una deficiente asimilación de las células con el sustrato puesto que la presencia de etanol ocurrió a las 4 h y después de ese tiempo no se presentó respuesta alguna por parte del cultivo debido a la nula presencia de nutrientes que ayudaran a la correcta metabolización y crecimiento de biomasa la cual tuvo una presencia promedio de 1.93 g/L (Figura 3.24a).

El efecto de la suplementación inorgánica sobre la fuente de carbono lignocelulósica se evidenció con el incremento de la concentración del producto con una variación del 20.64% del cultivo CM1 contra el CM2, obteniendo una productividad de  $Q=0.94$  g/Lh considerada deficiente de acurdo al parámetro descrito por Vázquez y Dacosta (2007), además de obtener un rendimiento de  $Y_{E/S}=0.011$  g/g (97.84% menor al rendimiento teórico) para el cultivo suplementado, mientras que para el cultivo no suplementado, su nula asimilación al medio provisto por el sustrato lignocelulósico y la falta de continuidad cinética evidenciada por el brusco descenso de la concentración de etanol en el cultivo (Figura 3.23c), complica la correcta evaluación de parámetros cinéticos y rendimientos. El estudio no se pudo concretar debido a que se necesita explorar o realizar pruebas en la etapa enzimática para obtener un sustrato estable que sea posible fermentar.

En la Tabla 3.12, se presenta la comparación con otros autores, en base a las concentraciones y rendimientos obtenidos en los cultivos de café y madera, siendo evidente que el café se muestra como un sustrato lignocelulósico capaz de competir como una alternativa energética de generación de etanol de segunda generación.

**Tabla 3.12** Comparación de concentraciones y rendimientos de cultivos lignocelulósicos

Autor	Sustrato	EtOH (g/L)	Q (g/L h)	$Y_{E/S}$ (g/g)
Govumoni <i>et al.</i> (2013)	Paja de trigo	24.40	0.67	0.44
Partida, (2017)	Sorgo dulce	38.44	1.83	0.31
Kleingesinds <i>et al.</i> (2018)	Elote	26.60	1.02	0.37
Sathendra <i>et al.</i> (2019)	Madera de palma	22.90	0.27	-
Este trabajo	CC	48.19	2.40	0.41
Este trabajo	RMR	22.56	0.94	0.011

### 3.7 Cultivo de exploración y efecto de sales nutrientes en JSD

Se realizó el estudio del efecto de fuentes únicas de potasio, amonio y magnesio sobre cultivos de JSD, además de la interacción de estos minerales a diferentes porciones de mezcla sobre la fuente de carbono, evaluando el incremento en la concentración de etanol, rendimientos y productividades; comparándolos contra los cultivos patrón A y B estandarizados como cultivos de referencia, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.13.

**Tabla 3.13** Parámetros y rendimientos de cultivos patrón

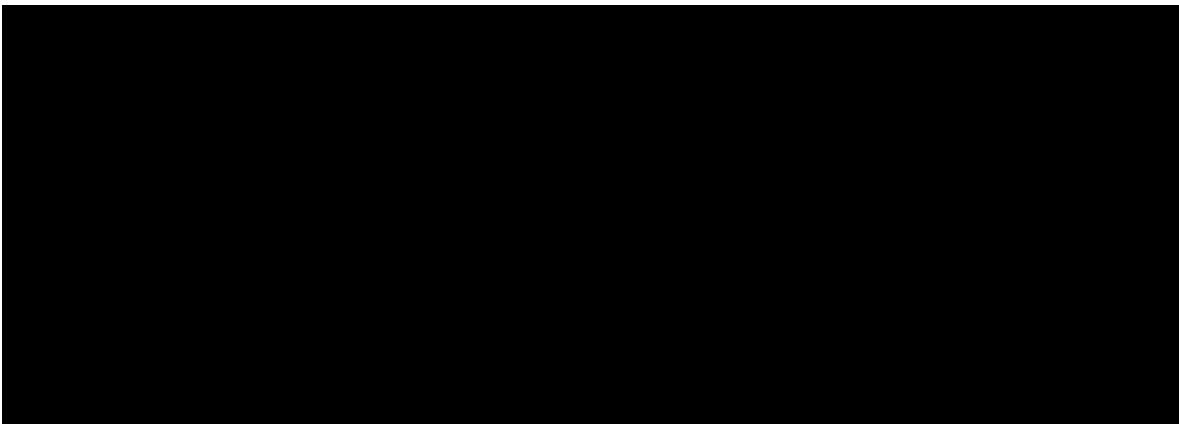
Parámetro	Cultivo patrón A	Cultivo patrón B
Etanol [EtOH] (g/L)	61.9375	63.6125
Productividad [Q] (g/L h) (Ec. 2.1)	2.5807	2.6505
Rendimiento [ $Y_{E/S}$ ] (g/g) (Ec. 2.2)	0.4414	0.453
Eficiencia de fermentación [ $E_f$ ] (%) (Ec. 2.3)	86.37	88.67

De acuerdo a las cinéticas que se muestran en las Figura 3.25 se observan concentraciones de etanol alcanzadas de 61.93 g/L y 63.61 g/L para los cultivos patrón A y B respectivamente, con un consumo de sustrato de 97.44% y 97.49%, ambas concentraciones de etanol fueron obtenidas a las 24 h de haber iniciado la fermentación con una diferencia poco representativa del cultivo B sobre el A del 2.71% mayor en función del producto. Analizando las productividades y rendimientos del cultivo estas tienen un comportamiento similar con una diferencia aproximada de  $\pm 3\%$ .

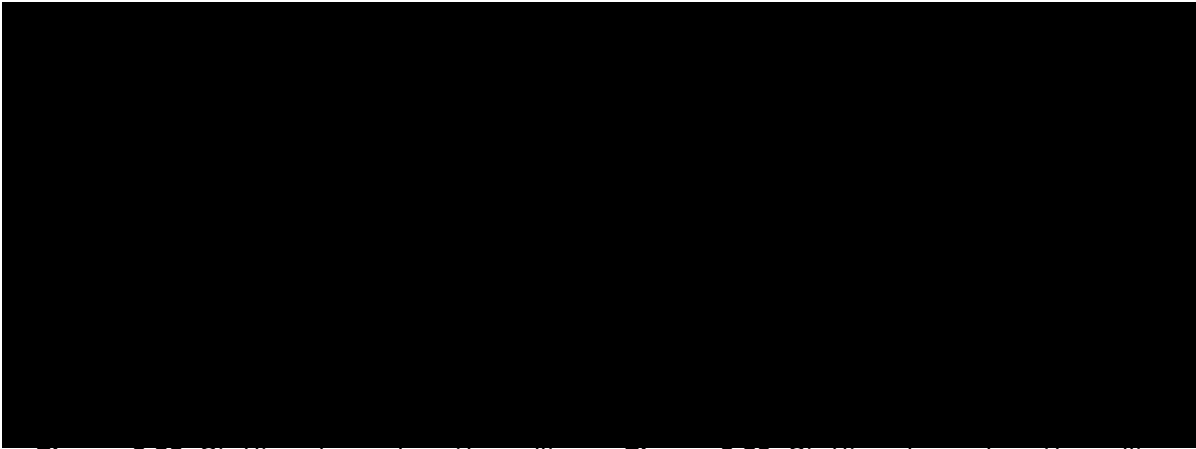


**Figura 3.25** Cinética de exploración cultivos patrón A y B suplementado por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

El estudio cinético de la producción de etanol empleando *Saccharomyces cerevisiae* /TV-01 que presenta este estudio, a partir del diseño planteado en la sección 2.7.2, se presenta en las Figuras 3.26 a la 3.32, donde se observa que los rangos de concentraciones de etanol obtenidas para el CsxA varían entre 51.27 g/L a 59.44 g/L, donde la concentración más alta de etanol fue obtenida a las 24 h, siendo 4.02% menor al cultivo patrón A y 3.49% mayor que el promedio general de experimentación de las cinéticas analizadas. Para este diseño donde se empleó 1 g/L de extracto de levadura, la tendencia hacia el incremento de producto se vió favorecido mediante las cinéticas CsxA 2 y CsxA 3 suplementadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  respectivamente con una concentración alcanzada de 58.25 g/L y 59.44 g/L.

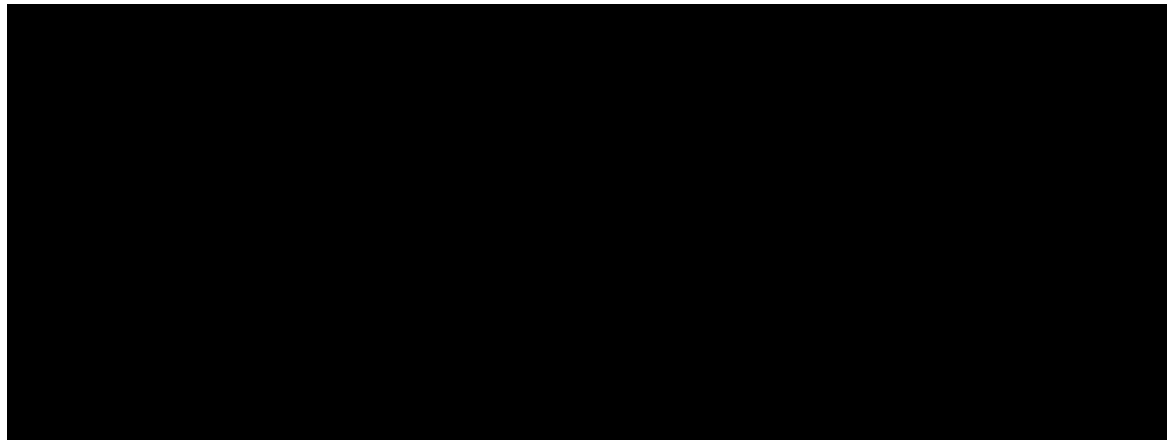


**Figura 3.26** Cinética de exploración cultivos CsxA 1 y CsxB 1, suplementado por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  **Figura 3.27** Cinética de exploración cultivos CsxA 2 y CsxB 2 suplementado por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



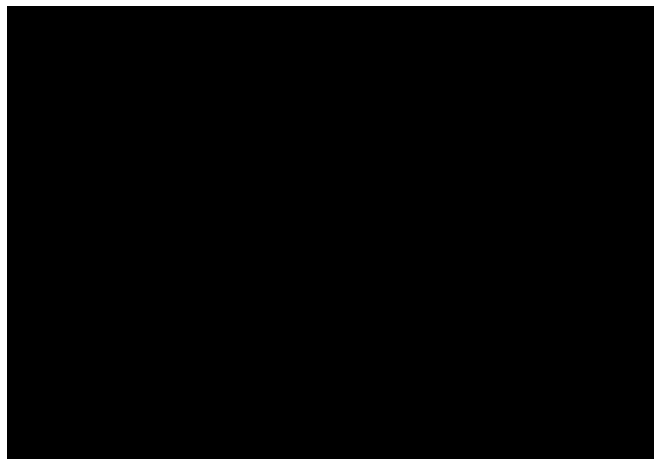
**Figura 3.28** Cinética de exploración cultivos CsxA 3 y CsxB 3, suplementado por  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

**Figura 3.29** Cinética de exploración cultivos CsxA 4 y CsxB 4 suplementado por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



**Figura 3.30** Cinética de exploración cultivos CsxA 5 y CsxB 5, suplementado por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

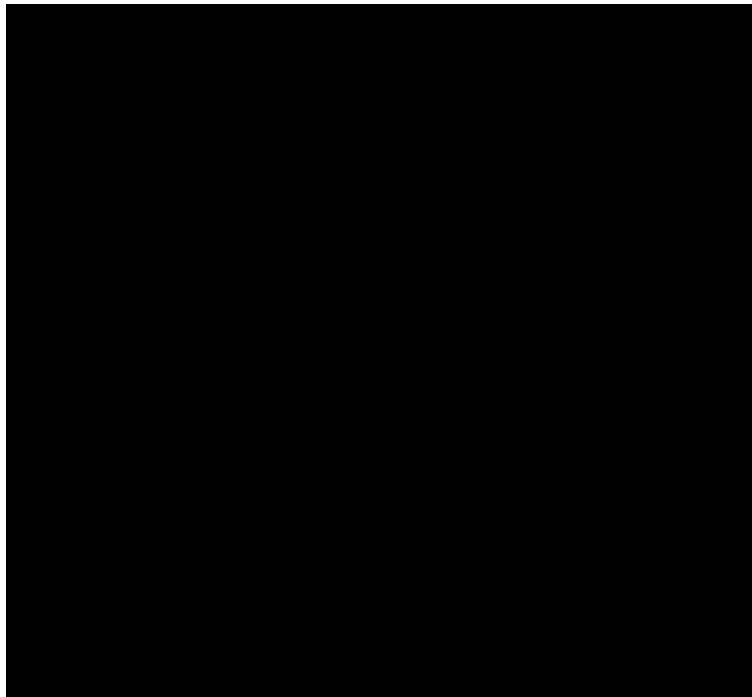
**Figura 3.31** Cinética de exploración cultivos CsxA 6 y CsxB 6 suplementado por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



**Figura 3.32** Cinética de exploración cultivos CsxA 7 y CsxB 7, suplementado por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

El análisis del CsxB presenta una variación de etanol de 50.76 g/L a 62.84 g/L obtenidas a las 24 h, a excepción del CsxB 7 que se presentó a las 32 h, el cual fue el cultivo de concentración más alta, siendo 1.21% menor al cultivo patrón B y 11.48% mayor al promedio de las concentraciones obtenidas, en este diseño a 2 g/L de extracto de levadura tiene una tendencia hacia la utilización de las tres sales inorgánicas a menor proporción (una fracción de 0.333) para elevar la concentración de etanol.

La evaluación de la productividad de cada cultivo (Ec. 2.1) según su suplementación se muestra en el Figura 3.33, donde se observa que la productividad más alta ( $Q=2.92$  g/Lh) está dada por el cultivo CsxA 4, suplementado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , obteniendo valores similares a los reportados por Partida (2017) quien obtuvo una  $Q=2.93$  g/Lh mediante un cultivo de sorgo dulce suplementado por las mismas sales inorgánicas, mientras que para el CsxB 2 resultó 8.5% inferior con una  $Q= 2.70$  g/Lh generada por la suplementación de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .



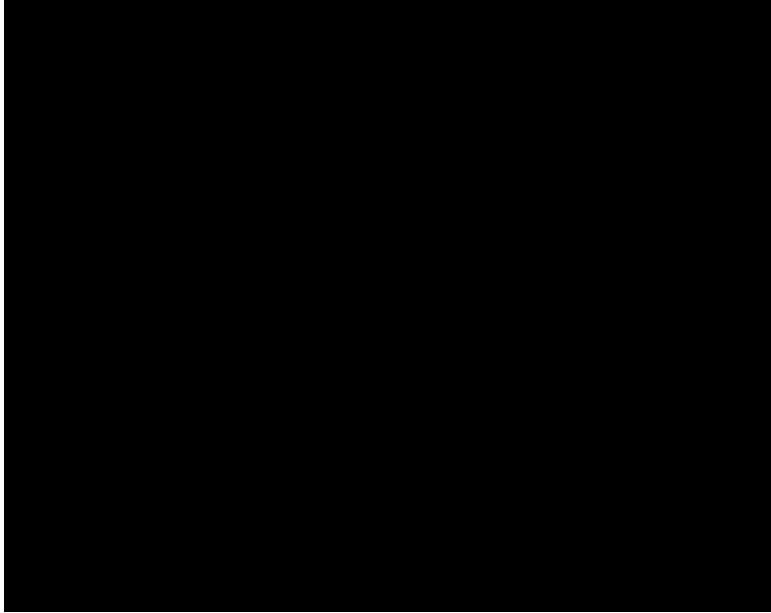
**Figura 3.33** Productividades obtenidas a partir de los CsxA y CsxB, considerando diferentes composiciones nutrimentales



Las productividades generadas a partir de los cultivos CsxA 6 y CsxB 2 de experimentación resultaron con valores mayores a los obtenidos mediante las cinéticas patrón con una diferencia de 13.17% y 1.85% mayor, generadas por la presencia de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en donde el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se mantiene presente en ambas cinéticas, lo que evidencia que el jugo de sorgo dulce carece de compuestos nitrogenados necesarios para el crecimiento de la *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01.

De acuerdo con Vázquez y Dacosta (2007) en una fermentación por lotes, las productividades entre 1.9-2.5 g/Lh son consideradas deficientes en el proceso, en esta investigación se alcanzaron productividades de hasta 2.91 g/Lh respecto la sección 2.7.2, que comprendió el estudio cinético y efecto de suplementación de la fuente de carbono.

El análisis de las cinéticas experimentales en función de los rendimientos etanol/sustrato (Ec. 2.2) se observan en la Figura 3.34, oscilando entre 0.355 g/g - 0.413 g/g, para los CsxA, siendo el de mejor rendimiento el CsxA 3 (suplementado con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), siendo 6.77% menor al rendimiento generado por el cultivo patrón A, por lo que se evidencia la posibilidad de maximizar el efecto de la suplementación de la fuente de carbono para una mejora en la producción de etanol al localizar y utilizar la correcta concentración de las fuentes nitrogenadas, de potasio y magnesio con las que se fortificó el medio de cultivo, mientras que para el lote de CsxB el rango de rendimientos estuvo entre 0.352 g/g - 0.449 g/g, en donde el cultivo CsxB 7 se perfiló como el mejor cultivo al contener las tres sales inorgánicas estudiadas;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  que generaron el mayor rendimiento de  $Y_{E/S}=0.449$  casi similar al rendimiento del cultivo patrón de  $Y_{E/S}=0.453$ .



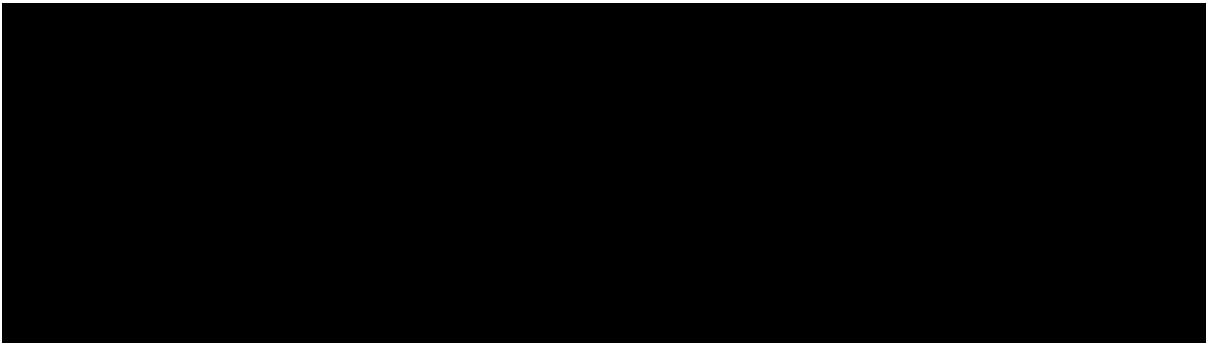
**Figura 3.34** Rendimientos obtenidos a partir de los CsxA y CsxB, considerando diferentes composiciones nutrimentales

Los valores de  $Y_{E/S}=0.413$  para CsxA 3 y  $Y_{E/S}=0.449$  para CsxB 7 reflejan una eficiencia de fermentación ( $\eta_f$ ) de 80.89% y 88.05% respectivamente (Ec. 2.3), siendo el lote experimental con carga de 2 g/L de extracto de levadura como el conjunto de cultivos que favorecen de forma general el proceso de fermentación, presentando la mayor concentración de etanol (62.84 g/L) y mayores rendimientos. Si bien no se obtuvieron las mejores productividades, se evidenció que la suplementación inorgánica generada a partir de las tres sales utilizadas en esta investigación en conjunto con una doble carga de extracto de levadura, ofrecen y se tienden a maximizar el proceso, por lo que en la sección 3.8 se evaluó el efecto de maximización óptima localizando los puntos estacionarios de sales inorgánicas sobre la metabolización celular sobre los cultivos por lotes del JSD.

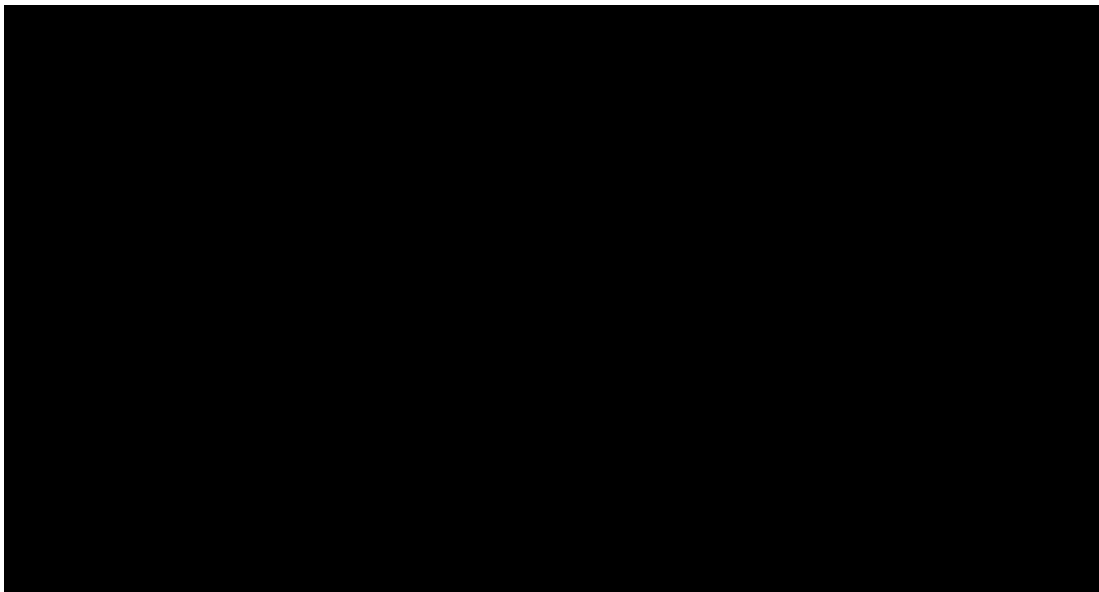
### **3.7.1 Evaluación de la MSR-simplex para el cultivo de exploración y efecto de sales nutrientes en JSD**

El estudio del proceso de maximización de la concentración de etanol a partir efecto de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en cultivos de JSD se realizó mediante el análisis de composición de mezclas de nutrientes de forma gradual y con variación

fraccional de 0 a 1, cuyo comportamiento se ve descrito a partir de un polinomio cúbico especial (Ecs. 3.23 y 3.24) respectivamente para el lote de cinéticas; CsxA y CsxB generados a partir de las máximas concentraciones de etanol alcanzadas en las cinéticas descritas por las Figuras 3.26 a 3.32, ambos con un coeficiente de regresión del 99% como se observa en la Figura 3.35.



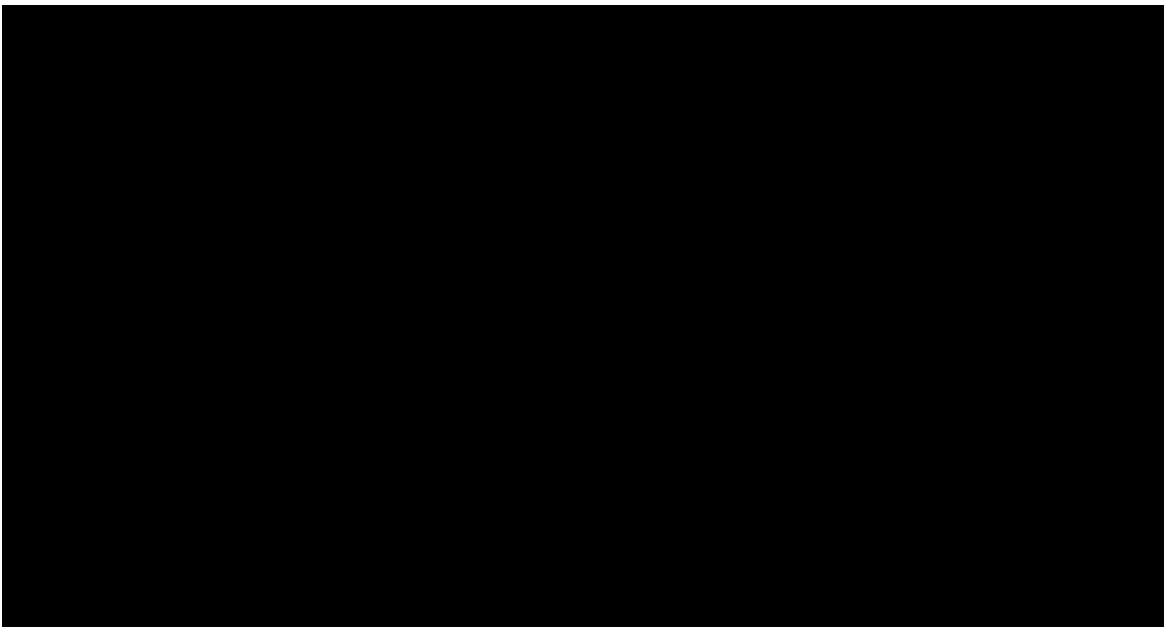
El comportamiento de los cultivos CsxA se observa en Figura 3.36 donde el lote experimental con carga de 1 g/L de extracto de levadura tiene una tendencia de minimización de la producción de etanol, la cual se ve limitada a concentraciones oscilantes de 57.5 g/L, mientras que cada sal inorgánica presenta un efecto contrario al sobrepasar una fracción de componente mayor al 0.5, elevando la concentración de producto. El incremento en la concentración de sales influye directamente en la formación de producto.



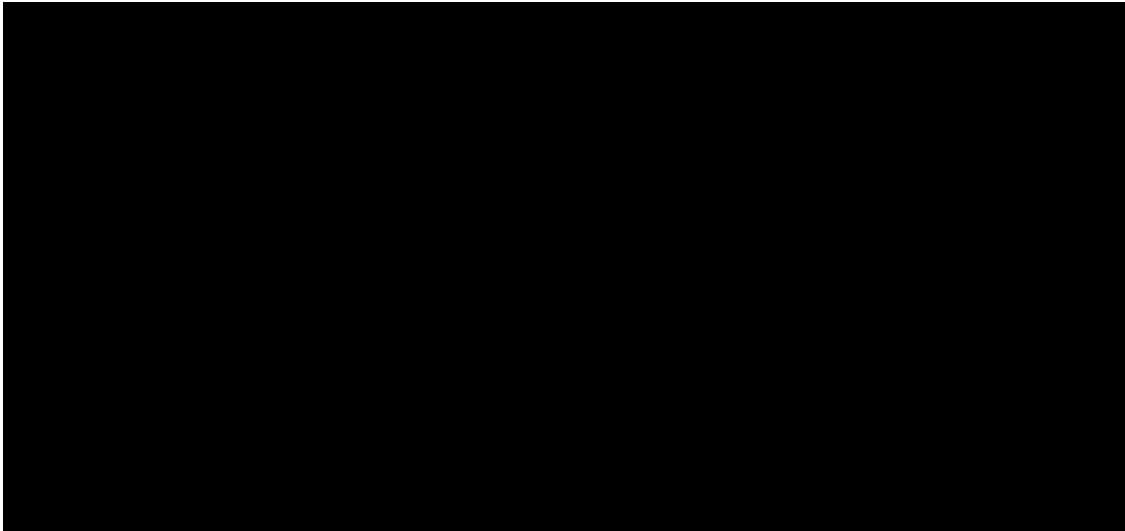
**Figura 3.35** Correlación de resultados experimentales vs datos predichos por el modelo cúbico especial de mezcla simplex centroide; a) CsxA y b) CsxB

El comportamiento del efecto de la sobre suplementación provista por la carga de 2 g/L de extracto de levadura (CsxB), se presenta en la Figura 3.37, donde se aprecia claramente que se alcanzaron concentraciones de etanol, mayor a 62 g/L, generando una maximización en el proceso como se aprecia en la GSR de la Figura 3.37a, operando en un rango de fraccionario de 0.333 para cada componente en una concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (g/L): 2.33, 1.66 y 0.499 respectivamente.

Mediante este estudio se demostró el efecto que tiene el extracto de levadura como un suplemento orgánico con la capacidad de ayudar a las levaduras a metabolizar el sustrato, aportando aminoácidos necesarios para dicho trabajo, además de facilitar la absorción de otros nutrientes presentes en el medio durante la fermentación ayudando a digerir los altos contenidos de hidratos de carbono en donde se encuentra sumergida.

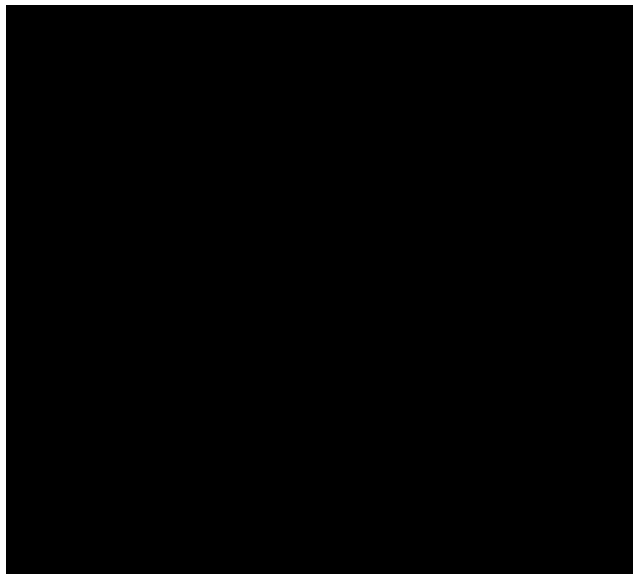


**Figura 3.36** Efecto de minimización de suplementación inorgánica a 1 g/L de extracto de levadura; a) gráfico de superficie de respuesta, b) gráfico de contornos a bajas concentraciones de producto



**Figura 3.37** Efecto de maximización de suplementación inorgánica a 2 g/L de extracto de levadura; a) gráfico de superficie de respuesta, b) gráfico de contornos a altas concentraciones de producto

Además del aporte bioquímico de la MSR-simplex en referencia a la carga de extracto de levadura se generó la gráfica de efectos combinados del diseño simplex (Figura 3.38) en relación a la suplementación inorgánica en los cultivos de JSD, en donde se observa una doble tendencia máxima sobre la fracción media de suplementación, puesto que el  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  se presenta como un factor ajeno a las sales restantes a concentraciones bajas, por lo que surge la necesidad de encontrar la formulación exacta que genere una única y máxima producción de etanol a partir de sales inorgánicas.



**Figura 3.38** Efecto combinado de la producción de etanol del CsxB en función del efecto de la composición y suplementación del medio de cultivo. Donde A;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , B;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y C;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

### 3.8 Optimización de enriquecimiento de minerales inorgánicos sobre la fuente carbono

#### 3.8.1 Maximización de la concentración de etanol mediante suplementación inorgánica en cultivos de JSD

El proceso de optimización de la suplementación de sales nutrientes sobre la fuente de carbono provista por el JSD se realizó mediante un diseño Box Behnken analizando el efecto de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , cuyas concentraciones de etanol obtenidas, se muestran en la Tabla 3.14, generando el gráfico de probabilidad normal con una dispersión de 8.51% (Anexo E) y el ANOVA (Anexo E2).

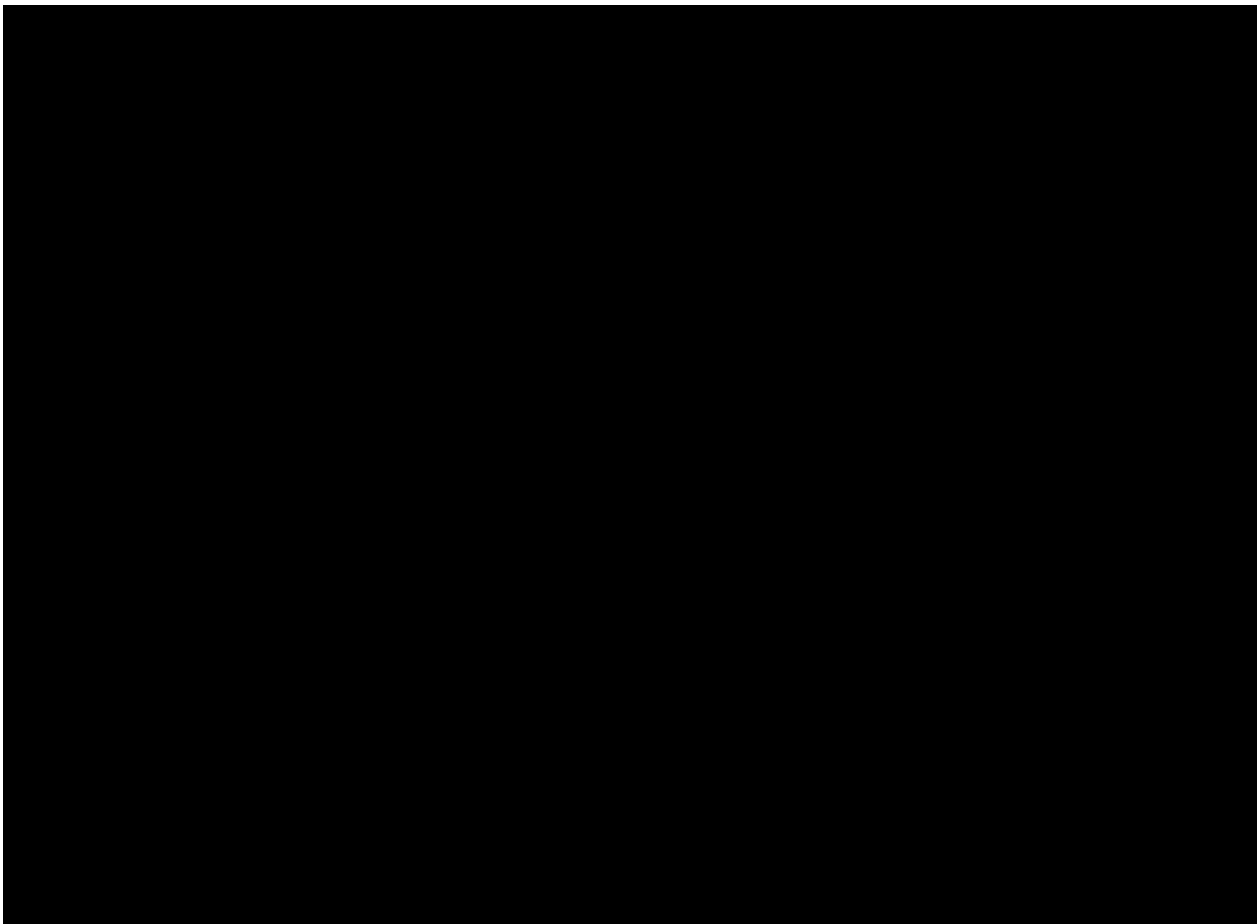
**Tabla 3.14** Concentraciones de etanol generadas a partir de diseño Box Behnken



El análisis estadístico de experimentación, se realizó mediante el software NCSS, siendo la variable de respuesta la mayor concentración de etanol expresada en (g/L), en donde se obtuvo una  $R^2$  de 91.49% la cual garantiza la fiabilidad de las correlaciones del modelo que se muestra en la Ec. 3.25.

$$\begin{aligned} Etanol(g/L)_{BBF} = & 112.73 - 17.63x_{1BBF} - 6.53x_{2BBF} - 2.80x_{3BBF} + 1.871x_{1BBF}^2 + 0.675x_{2BBF}^2 - \\ & 3.79x_{3BBF}^2 - 0.262x_{1BBF}x_{2BBF} - 0.78x_{1BBF}x_{3BBF} + 2.77x_{2BBF}x_{3BBF} \end{aligned} \quad (3.25)$$

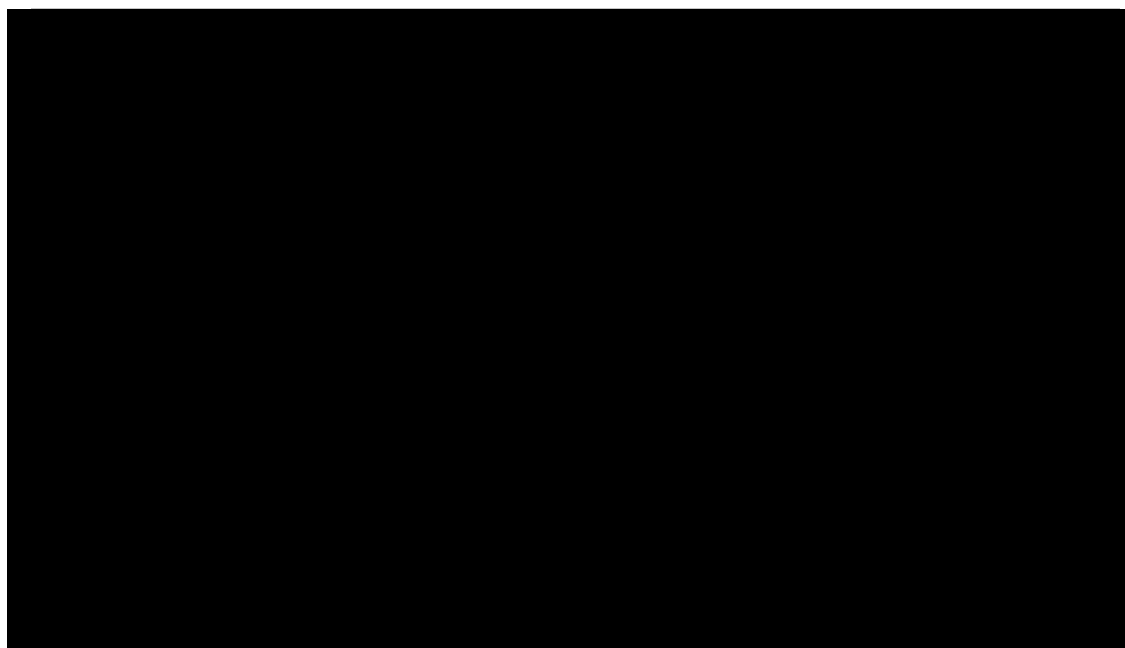
Analizando la GSR (Figura 3.39), se observa un comportamiento lineal en el efecto e influencia del enriquecimiento a la fuente de carbono a partir de sales minerales, evidenciando al proceso en un estado minimax, provocado por el efecto de cada componente mineral.



**Figura 3.39** GSR del proceso de maximización de la producción de etanol a partir de JSD mediante un diseño Box Behnken; a)  $(NH_4)_2SO_4$  vs  $KH_2PO_4$ , b)  $KH_2PO_4$  vs  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $(NH_4)_2SO_4$  vs  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

A partir de la Figura 3.39a el efecto dual proporcionado por el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tiende a elevar la concentración de producto en similar proporción como lo indica el área roja de la superficie provista por los niveles altos y bajos del proceso, mientras que en la Figura 3.39b y 3.39c, se observa que la fuente provista por nitrógeno opera a condiciones por debajo de un rango de entre 1.8 a 2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  suficientes para generar mayor producto en función con los demás factores como se muestra en la gráfica de efectos combinados (Figura 3.40), cuyo comportamiento es similar, por lo tanto preliminarmente se confirma al nitrógeno como una constante necesaria en el proceso celular debido a que este propicia la producción de ácido glutámico generando así otros aminoácidos necesarios para las levaduras.

Respecto a la fuente provista por magnesio (Figura 3.39b) se observa que a partir un exceso de concentración de 0.75 g/L de esta sal, la concentración de producto desciende rápidamente provocando una inhibición a la materia orgánica, es decir, a concentraciones de 1.5 g/L o superiores tal y como lo muestra la sección  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  vs  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de la Figura 3.40, el proceso se ve afectado generando una nula o mala digestión del magnesio en las células.



**Figura 3.40** Gráfico de efectos combinados del proceso de maximización óptima de la producción de etanol a partir de JSD mediante un diseño Box Behnken



A partir del el gráfico de efectos combinados (Figura 3.40), se observa una combinación con las fuentes de nitrógeno y magnesio en donde existe un efecto contrario al esperado, por lo tanto, en la sección  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  vs  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  vs  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  se confirma que a los puntos medios de operación reducen la concentración de etanol en los tres niveles provistos por el factor  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  siendo menos afectados en cuanto las concentraciones son más bajas, mientras que en las secciones de las intersecciones del modelo inverso;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se verificó que en las concentraciones que oscilan a 3 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  el proceso se mantiene constante elevando las concentraciones etanol, de igual forma se detectó claramente que el  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en la sección  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  que después de una concentración de 0.75 g/L de la fuente de magnesio; la concentración de etanol cae en picada con cualquier otro factor sin importar la concentración.

Mediante la determinación del análisis canónico para verificar la optimización del proceso Box Behnken para maximizar la producción de etanol, se utilizó el modelo de la Ec. 3.25, el cual mediante la denotación de los eigenvalores (Ec. 3.26) se detecta al proceso en un estado de punto de silla

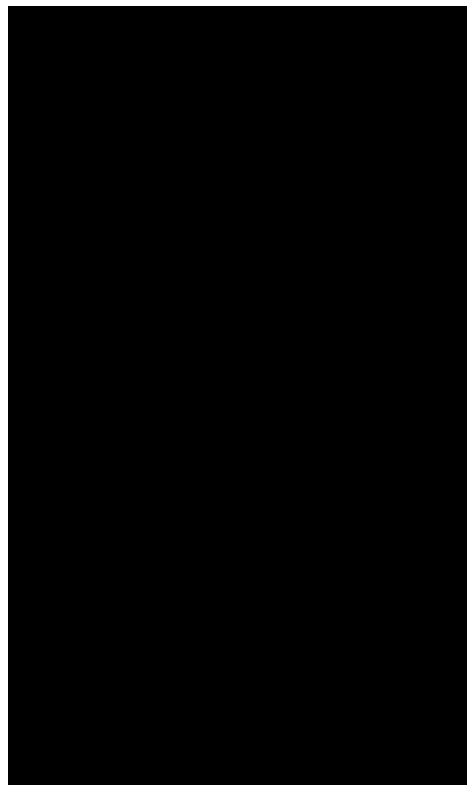
$$\hat{y}_{BBF} = 112.73 - 4.1616W_{1JSD}^2 + 1.8536W_{2JSD}^2 + 1.0640W_{3JSD}^2 \quad (3.26)$$

Por lo anterior, se realizó una segunda evaluación de cultivos suplementados mediante la implementación de nuevos rangos exploratorios, estableciéndose al  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en una concentración de 0.75 g/L, y extrapolando el rango operatorio de la concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mediante la rotabilidad y utilización de un  $\alpha = \pm\sqrt{2}$  en un CDC, como se presenta en la sección 3.8.2

### 3.8.2 Optimización global de cultivos a base de JSD para generación de etanol

A partir del análisis de factores y niveles resultantes de la sección 3.8.1, se estableció un CDC equirradial, con las condiciones mostradas en la sección 2.8.2. Los resultados de la evaluación de producción de etanol (g/L), se muestran en la Tabla 3.15, los cuales fueron analizados mediante el software NCSS obteniéndose una  $R^2$  de 90.84%, la cual garantiza la fiabilidad de las correlaciones del modelo que se muestra en la Ec. 3.27.

**Tabla 3.15** Concentraciones de etanol generadas a partir de diseño CDC equirradial de fermentación



$$Etanol\left(\frac{g}{L}\right)_{CDCF} = 8.7594 + 22.10x_{1CDCF} + 12.45x_{2CDCF} - 2.09x_{1CDCF}^2 - 1.49x_{2CDCF}^2 - 0.7809x_{1CDCF}x_{2CDCF} \quad (3.27)$$

Las concentraciones de etanol obtenidas durante el proceso generaron el ANOVA comprobando la estabilidad y el nivel de significancia de los factores durante el proceso, además del gráfico de probabilidad normal que se encuentran descritos en el Anexo E, con una dispersión provista de 9.16%.

El proceso óptimo de la generación máxima de etanol en cultivos por lotes a partir de JDS se evidencia mediante los puntos medios como se observa en la Figura 3.41a, actuando en combinación con una concentración constante de extracto de levadura en 2 g/L y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 0.75 g/L. Mediante el gráfico de contornos que se muestra en la Figura 3.41b se establece como el rango de operación óptima de concentraciones de nutrientes para el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de entre 2.45 a 3.48 g/L y para  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  entre 4.38 a 5.12 g/L.



**Figura 3.41** Proceso de maximización óptima de la producción de etanol a partir de la suplementación inorgánica mediante un CDC;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (g/L) vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L); (a) Gráfica de superficie de respuesta, (b) Gráfica de contornos

A partir de la Ec. 3.27, se determinaron los valores estacionarios del proceso fermentativo (Ec. 3.28) y se realizó el análisis canónico (Ec. 3.29) confirmándose la optimización del proceso validando los valores de los puntos estacionarios previamente obtenidos. Lo que permitió establecer concentraciones óptimas de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (g/L): 2.92 y 4.73 respectivamente.

$$\text{[Redacted Equation 3.28]}$$

(3.28)

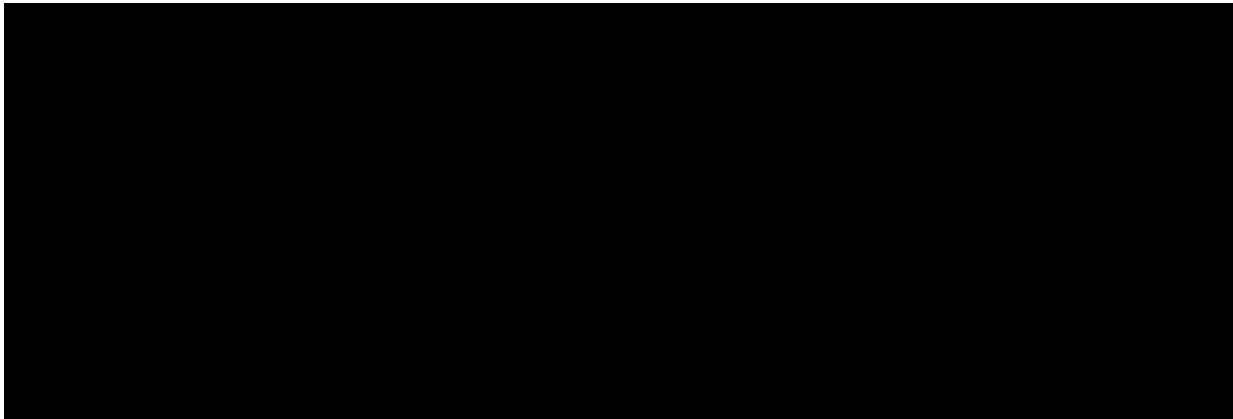
$$\text{[Redacted Equation 3.29]}$$

(3.29)

El efecto y asimilación de la carga nutrimental que se presentó en el estudio a partir de la suplementación sobre el JSD mediante el uso la *Saccharomyces cerevisiae*

ITV-01, se determinó en un rango operacional de entre 24 y 36 h, generando etanol como metabolito primario a las concentraciones expuestas en las secciones anteriores.

En la Figura 3.42 se observa el comportamiento de la producción de etanol, en función de la fuente de carbono, la concentración máxima alcanzada fue de 79.98 g/L comparadas contra los cultivos patrón A y B (61.93 y 63.61 g/L) (Figura 3.42a) presentando incrementos del 22.49% y 20.38% respectivamente a la producción del cultivo central del CDC. Analizando la variación de la concentración de sales a los niveles altos y bajos, se obtuvieron concentraciones de etanol de 75.52 g/L y 76.9 g/L, siendo 5.57% y 3.85% mayor el cultivo central como se observa en la Figura 3.42b. Finalmente comparando contra los resultados obtenidos del Box Behnken donde se inició la tendencia optima, el cultivo CDC central alcanzó concentraciones 34.04% mayores (Figura 3.42c).



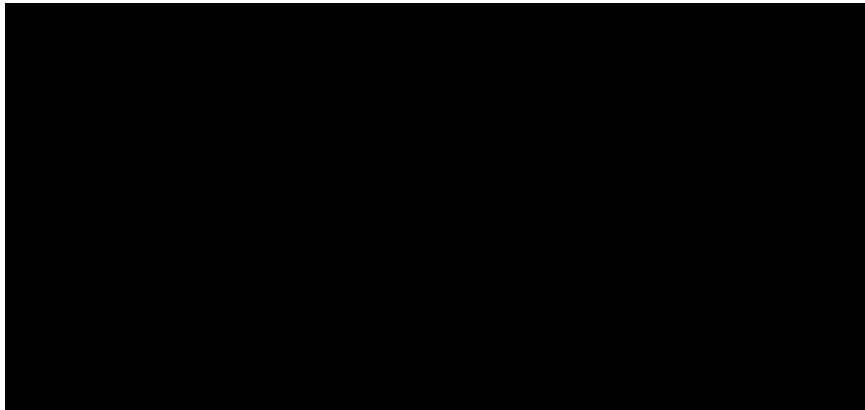
**Figura 3.42** Efecto de la composición de sales nutrientes sobre la producción de etanol; (a) tiempo (h) vs cultivo central CDC [O], cultivo patrón A [□] y cultivo patrón B [Δ]; (b) tiempo (h) vs cultivo central CDC, cultivo alto CDC [□] y cultivo bajo CDC [Δ]; (c) tiempo (h) vs cultivo central CDC [O], cultivo Box Behneken [Δ]

De acuerdo a la Figura 3.43a, el consumo de sustrato se ve mejorado para el cultivo suplementando bajo las condiciones del CDC debido a que este tuvo un consumo del 100% a diferencia de los cultivos patrón A, B (Figura 3.43b) y Box Behnken (Figura 3.43c) que presentaron un pequeño remanente de sustrato de 2.55, 2.50 y 0.68% respectivamente.

En la Figura 3.44a se puede observar la mayor afinidad de las células por glucosa al ser este el azúcar consumido en mayor proporción a las 12 h del proceso fermentativo. Analizando la Figura 3.44b se observa la formación de glicerol como metabolito secundario con una concentración máxima de 5.23 g/L a las 16.2 h, tiempo a partir del cual decayó bruscamente, debido que las células comenzaron a utilizarlo como fuente de carbono, también se observa la reproducción y comportamiento a través del tiempo del complejo celular, debido a que en base a la concentración de levaduras del cultivo central del diseño (cultivo de mayor producción de etanol).



**Figura 3.43** Efecto de la composición de sales nutrientes sobre el consumo de sustrato; (a) tiempo (h) vs cultivo central CDC [O], cultivo patrón A [□] y cultivo patrón B [Δ]; (b) tiempo (h) vs cultivo central CDC [O], cultivo alto CDC [□] y cultivo bajo CDC [Δ]; (c) tiempo (h) vs cultivo central CDC [O], cultivo Box Behneken [Δ]



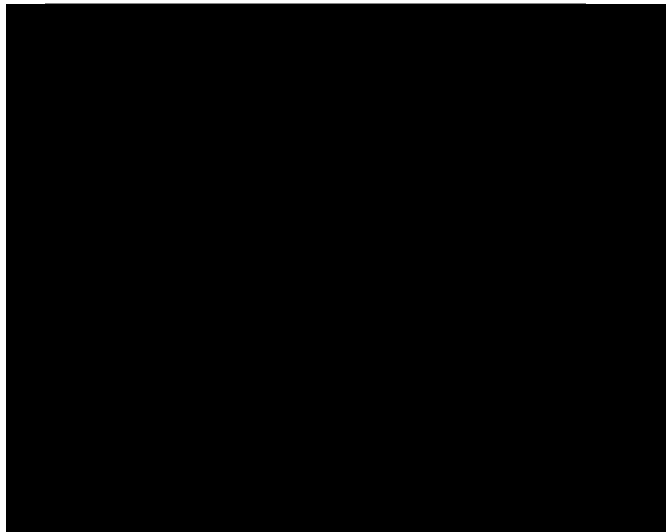
**Figura 3.44** Efecto de la composición de sales nutrientes sobre el consumo de sustrato; (a) tiempo (h) vs Glucosa [O] y xilosa [Δ]; (b) tiempo (h) vs glicerol [o] y células [Δ]

El máximo crecimiento celular determinado a partir del modelo de Monod (Ec. 1.11 y 2.5 para  $\mu$ ), donde se muestra una  $\mu_{\max}=0.43 \text{ h}^{-1}$ , generada a partir de una suplementación de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 5 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 3 g/L y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 0.75 g/L

con una concentración de extracto de levadura de 2g/L para 5 réplicas realizadas, uno de los cultivos presenta un comportamiento inferior que no afectó al modelo y confiabilidad de los datos al estar dentro de la probabilidad normal.

Ariyajaroenwong *et al.* (2016) reportaron un rango de velocidad específica de 0.259 a 0.463 h<sup>-1</sup> para el jugo de sorgo dulce como sustrato en una fermentación discontinua, encontrándose el valor de esta investigación, dentro de dicho rango.

Además de la variación progresiva de las concentraciones de etanol generadas mediante los diseños experimentales explorados, el proceso redujo los tiempos de aparición de la máxima concentración de producto en un rango de tiempo de entre 16 a 20 h, generando productividades de 2.99 a 3.99 g/Lh como se observa en la Figura 3.45, determinandas por la Ec. 2.1. En la la Tabla 3.16, se observa el incremento que tuvo el cultivo central del CDC contra los cultivos anteriores (diseño simplex y Box Benhken) en función a productividad obtenida.

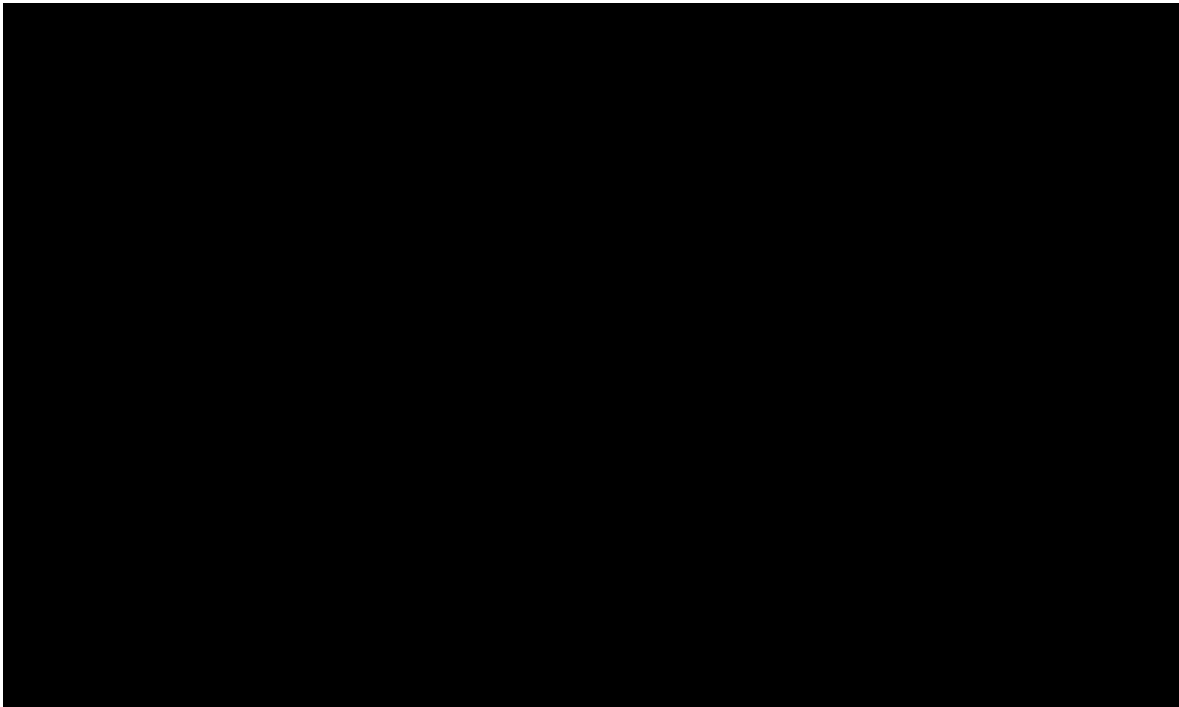


**Figura 3.45** Productividades obtenidas a partir del CDC óptimo para producción de etanol a mediante suplementación inorgánica

**Tabla 3.16.** Evaluación y comparación de productividades generadas a partir de diferentes suplementaciones de cultivo vs productividad del cultivo óptimo

La mejoría provista por una suplementación a la fuente de carbono se observa en los rendimientos mejorando significativamente en función de los diseños previos cuyo incremento porcentual se observa en la Tabla 3.17 (determinados por la Ec. 2.2), que se compararon contra el valor del rendimiento central del diseño CDC el cual presentó un rendimiento producto sustrato de  $Y_{P/S}=0.508$  g/g como se observa en la Figura 3.46.

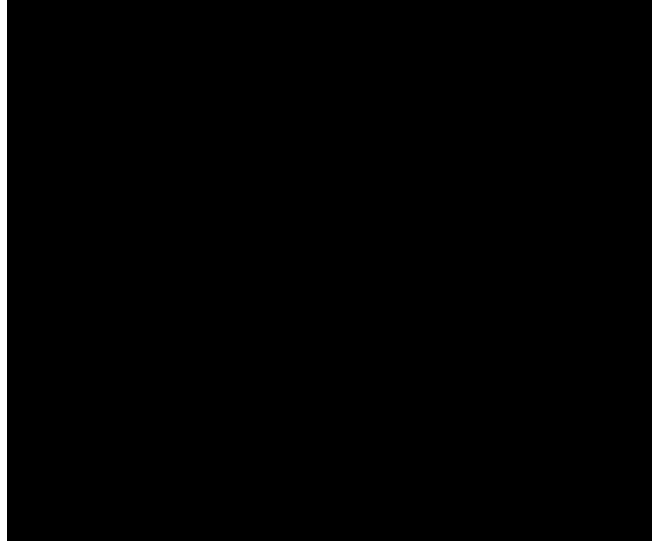
**Tabla 3.17.** Evaluación de rendimientos generados a partir de diferentes suplementaciones de cultivo



**Figura 3.46** Rendimientos ( $Y_{P/S}$ ) obtenidos a partir del CDC óptimo para producción de etanol a mediante suplementación inorgánica

La evaluación general de los procesos fermentativos se puede realizar mediante la Figura 3.47, donde se muestran las eficiencias del proceso de los mejores cultivos de cada etapa de análisis de generación de etanol calculados a partir de la Ec. 2.3, donde el cultivo central del CDC alcanzo una eficiencia promedio al 98% seguida del cultivo patrón B con el 88.67%, estos procesos son característicos de una carga de extracto de levadura de 2 g/L y un contenido de sales cuyas concentraciones se acercan a las propuestas por los puntos estacionarios de la Ec. 3.26, seguido por el cultivo patrón A y el cultivo Box Behnken, que fueron cultivos con una

suplementación no adecuada, de tal forma que propiciaron que la producción de etanol no fuera significativa dentro de las primeras 24 horas de haber iniciado la fermentación, alcanzando eficiencias de 86.37% y 77.12% respectivamente



**Figura 3.47** Rendimientos ( $Y_{P/S}$ ) obtenidos a partir del CDC óptimo para producción de etanol a mediante suplementación inorgánica

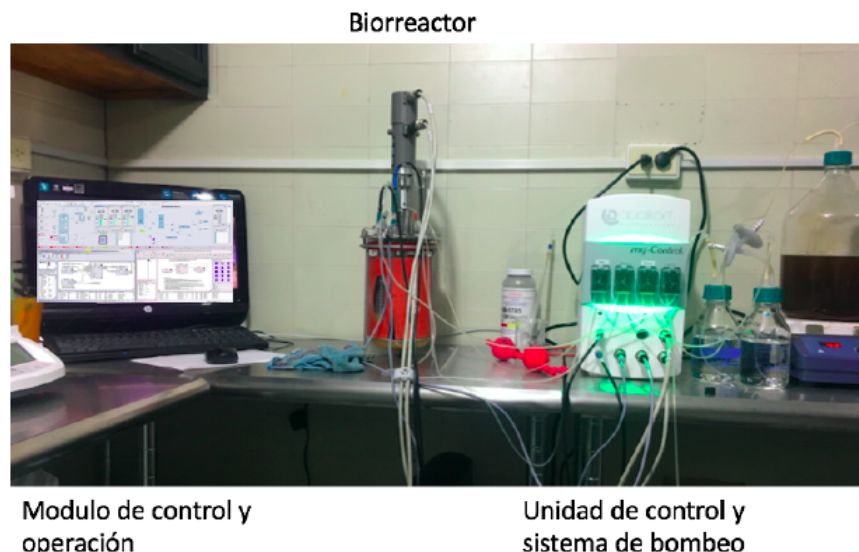
### 3.9 Estudio del cultivo continuo a partir de JSD para la producción de etanol

La fermentación en cultivo en continuo (Figura 3.48) se realizó a un volumen de operación constante de 1000 mL a diferentes flujos de operación en función de las tasas de dilución estudiadas; 0.15, 0.20 y 0.25 h<sup>-1</sup>.

La operación del quimiostato se mantuvo durante  $2\tau$  similar al tiempo de fermentación operado por Partida, (2017) para cultivos continuos de JSD.

En los resultados obtenidos durante el cultivo continuo se observa que el montaje del quimiostato no alcanzo el estado estacionario durante el estudio de las tasas de dilución realizadas, encontrando una producción de etanol no ideal al modelo de continuidad.



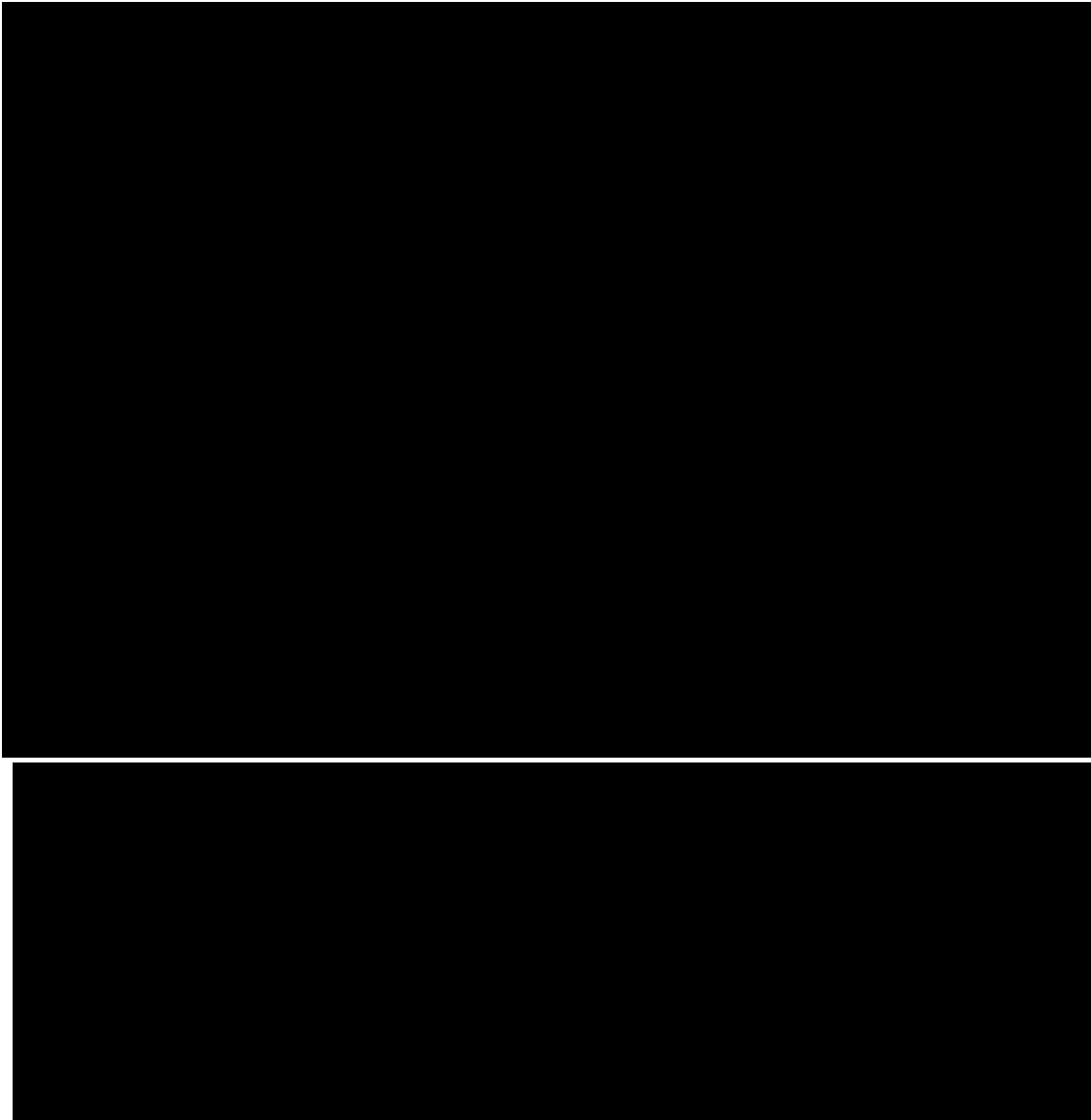


**Figura 3.48** Montaje del sistema de producción de etanol mediante cultivo continuo

Para la tasa de dilución  $0.15 \text{ h}^{-1}$  el flujo empleado fue de  $150 \text{ mL/h}$  determinado a partir de la Ec. 1.12. El cultivo fue evaluado durante  $2\tau$  ( $13.33 \text{ h}$ ) en donde los parametros  $S$ ,  $\text{EtOH}$  y  $X$  en el sistema se mostraron estables (Figura 3.49a) alcanzando una producción promedio de etanol de  $23.44 \text{ g/L}$ , generando una productividad etanolica para el sistema continuo ( $Q_E$ ) de  $3.51 \text{ g/Lh}$  (Ec.3.30).

La tasa de dilución de  $0.20 \text{ h}^{-1}$  se operó a un flujo de  $200 \text{ mL/h}$  manteniendo la estabilidad del cultivo durante los dos tiempos de residencias estudiados (Figura 3.49b) generando una concentración de etanol promedio en la cosecha de  $19.21 \text{ g/L}$  lo cual representa una  $Q_E=3.84 \text{ g/Lh}$  (Ec. 3.30).

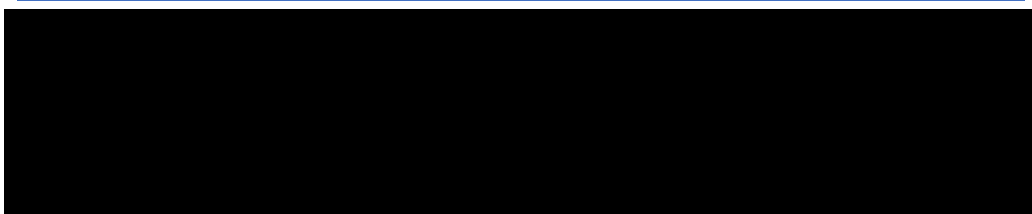
La operación del cultivo continuo se llevo a un flujo de  $250 \text{ mL/h}$  obtenido a partir una tasa de dilución de  $0.25 \text{ h}^{-1}$ , alcanzando una producción de etanol de  $16.29 \text{ g/L}$  con una produccitividad etanolica de  $4.07 \text{ g/Lh}$  (Ec. 3.30), mostrando una estabilidad de  $S$ ,  $\text{EtOH}$  y  $X$  (Figura 3.49c) durante la operación del cultivo a  $2\tau$ .



**Figura 3.49** Cinéticas de continuidad de la producción de etanol, consumo de sustrato y estado de biomasa a partir del cultivo continuo de JSD. Tasas de dilución; a)  $0.15 \text{ h}^{-1}$ , b)  $0.20 \text{ h}^{-1}$ , c)  $0.25 \text{ h}^{-1}$

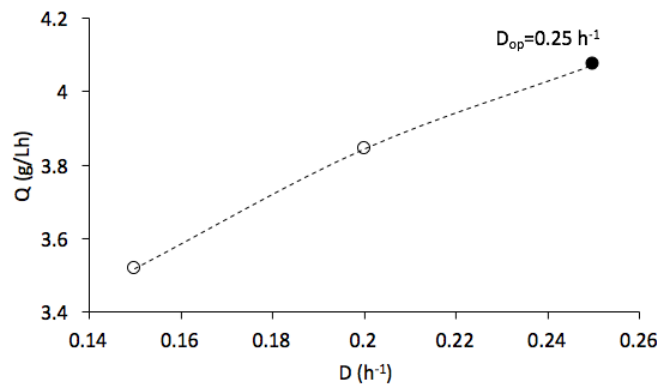
El estudio de la producción de etanol en cultivo continuo se realizó mediante la operación de diferentes tasas de dilución, donde se obtuvieron concentraciones promedio de producto y biomasa (Tabla 3.18) a dos tiempos de residencia.

**Tabla 3.18** Parametros cinéticos evaluados durante la evaluación del cultivo continuo



La Figura 3.50 muestra la tasa de dilución óptima encontrada para la fermentación de JSD de entre los tres flujos de alimentación estudiados, donde el cultivo a una tasa de  $0.25 \text{ h}^{-1}$  fue el cultivo de mejor productividad etanolica ( $Q_E=4.07 \text{ g/Lh}$ ) generada a partir de la Ec. 3.30.

$$Q_E(\text{g/Lh}) = D \cdot \overline{EtOH} \quad (3.30)$$



**Figura 3.50** Tasa de dilución óptima ( $D_{OP}$ ) en la fermentación continua del jugo de sorgo dulce

El estudio de la producción de etanol en cultivo continuo, aparentemente muestra un incremento de la productividad etanolica en función del aumento de la tasa de dilución y esto se debe al enriquecimiento del JSD contenido en el reservorio por lo consecuente en el flujo de entrada se tenía una concentración constante de sales nutrientes.

Al analizar los rendimientos producto/sustrato de las tasas de dilución estudiadas;  $0.15$ ,  $0.20$  y  $0.25 \text{ h}^{-1}$ , se obtuvieron valores ( $Y_{E/S}$ ) de  $0.22$ ,  $0.20$  y  $0.19 \text{ g/g}$  respectivamente, debido a que los flujos son tan altos que no se alcanza a metabolizar todo el sustrato disponible.

La comparación de la producción de etanol estudiada en este trabajo (Tabla 3.19), mostro un incremento del  $3.03\%$  del cultivo continuo contra el cultivo por lotes, mientras que comparado las productividades de otros autores se observa un

aumento promedio de 59.91% del proceso por lotes mientras que el cultivo continuo de este trabajo obtuvo una productividad mayor (71.72%) a la reportada por Rattanapan *et al.*, (2011) de 2.37 g/Lh.

**Tabla 3.19** Comparación de productividades reportado en este trabajo y otros autores

Autor	Sustrato	Operación	Q <sub>E</sub> (g/Lh)
Laopaiboon <i>et al.</i> (2007)	JSD	Lotes	2.04
Yuvraj <i>et al.</i> , (2013)	JSD	Lotes	2.47
Rattanapan <i>et al.</i> (2011)	Melaza de caña de azúcar	Continua	2.37
Laopaiboon <i>et al.</i> (2007)	JSD	Lote alimentado	1.08
Este trabajo	JSD	Lotes	3.95
Este trabajo	JSD	Continuo	4.07

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

La optimización de pretratamiento a partir de hidrólisis ácida diluida, permitió remover más del 50% del contenido de hemicelulosa en ambos materiales, donde la madera fue el sustrato que generó mayor concentración de xilosa, considerado como un metabolito secundario de alto valor agregado, utilizando menos recursos, requiriendo de volúmenes a concentraciones bajas de  $H_2SO_4$  y menores tiempos de reacción que el proceso ácido de café.

Durante la hidrólisis ácida el incremento de la concentración de xilosa como metabolito secundario de interés es inversamente proporcional a la disminución del contenido de hemicelulosa del material lignocelulósico.

El proceso de deslignificación de las fibras de café y madera presentaron mejor respuesta a los tratamientos ácido-alkalino, además de requerir concentraciones menores de  $H_2O_2$  (50% menos), reduciendo costos de reactivos, puesto que ambos tratamientos reducen la cantidad de lignina presente en los materiales en un rango de 50 a 60%.

El estudio de la cinética de producción de glucosa a partir de café y madera del tratamiento ácido alcalino a nivel matraz, tuvo como resultado concentraciones 98.54 y 47.67 g/L respectivamente, mientras que la prueba a nivel reactor aplicando un sistema de control, mejoro la producción de glucosa en un 14.75 % y 32.82 % para café y madera respectivamente.

La evaluación y estudio de cultivos por lotes de sustratos lignocelulósicos de café evidenció que este tipo de fuente de carbono requiere la adicción de nutrientes inorgánicos para la correcta metabolización del complejo celular, puesto que el cultivo enriquecido obtuvo una eficiencia de fermentación de 81.74% y un

rendimiento producto-sustrato de 0.416 g/g, valores superiores al cultivo no enriquecido con una eficiencia de 21.99% y un rendimiento de 0.112 g/g.

La evaluación y estudio de los cultivos de glucosa generada a partir de madera evidenció que se requiere de mayores investigaciones dirigidas a mejorar el proceso de sacarificación puesto que se obtuvieron bajas concentraciones de glucosa lo que ocasionó que durante la etapa fermentativa la producción de etanol redujera a 22.56 y 18.70 g/L para cultivos enriquecido y no enriquecido respectivamente, generando deficientes rendimientos (0.011 y 0.029 g/g), en donde el cultivo enriquecido tuvo una presencia de glicerol de 9.74 g/L.

El efecto del  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , cada una, como única fuente nutrimental en los lotes con un 1 y 2 g/L de extracto de levadura no presentaron un efecto significativo sobre la producción de etanol, debido a que las concentraciones alcanzadas son semejantes al promedio de 58.56 g/L con una dispersión de  $\pm 1.5$  g/L para los cultivos con 1 g/L de extracto de levadura, mientras que para las cinéticas con 2 g/L, alcanzó concentraciones de 52.56 g/L con una dispersión de  $\pm 2.7$  g/L por lo que el efecto de generación de producto estuvo sustentado preferentemente en el alto contenido de azúcares en el JSD.

El efecto del enriquecimiento del JSD por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  se vio mejorado por el segundo grupo al alcanzar una  $E_f = 88.05\%$  y un  $Y_{E/S} = 0.449$  g/g, contra el primer grupo de  $E_f = 69.67\%$  y un  $Y_{E/S} = 0.356$  g/g, confirmado el efecto de maximización que presentó el diseño simplex donde al evaluar la producción de etanol el grupo dos presentó una tendencia a mayor generación de alcohol.

El efecto de maximización del proceso se logró alcanzando una concentración de etanol de 52.67 g/L a partir de concentraciones nutrimentales de 5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 1 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , mediante el análisis de varianza se determinó que el efecto de las fuentes inorgánicas, presentaban un efecto diferente y significativo durante el proceso de fermentación detectando al  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  como

un nutriente con capacidad limite (0.75 g/L) al efecto de maximización de producción de etanol.

Se optimizó el enriquecimiento del JSD para la producción de etanol con concentraciones de 78.98 g/L, a partir de 2.9 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.7 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 0.75 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  con una carga de 2 g/L de extracto de levadura, caracterizando el máximo crecimiento celular del cultivo por lotes con una  $\mu_{\text{max}}=0.43 \text{ h}^{-1}$ .

Se realizó el estudio cinético de la producción de etanol mediante cultivo continuo evaluando un rango de tasas de dilución de 0.15 a  $0.25 \text{ h}^{-1}$ , donde se obtuvo una  $D_{\text{op}}=0.25 \text{ h}^{-1}$ , generando una concentración de etanol alrededor de 16.29 g/L recolectado de la cosecha, con una productividad de proceso de  $P=4.07 \text{ g/Lh}$ , a partir de JSD suplementado por la optimización del cultivo por lotes.

## RECOMENDACIONES

Evaluar el proceso de hidrólisis alcalina mediante la adición de temperatura y agitación a diferentes niveles de operación.

Estudiar grupos de diferentes tipos de madera puras para verificar la influencia de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a menores concentraciones

Realizar un diseño de optimización al proceso de sacarificación de café y madera deslignificada, para maximizar la producción de azúcares fermentables.

Realizar un estudio de producción de xilosa a partir de los sustratos de café y madera deslignificada mediante enzimas xilanasas.

Realizar un diseño de optimización de enriquecimiento de la fuente de carbono a los sustratos de origen lignocelulósico, debido a que esta investigación solo probó



la influencia de sales a potasio, de amonio y magnesio y su respuesta a la adición de nutrientes.

Realizar un estudio del máximo crecimiento celular para caracterizar el cultivo por lotes y realizar un cultivo continuo a partir de una fuente lignocelulósica.

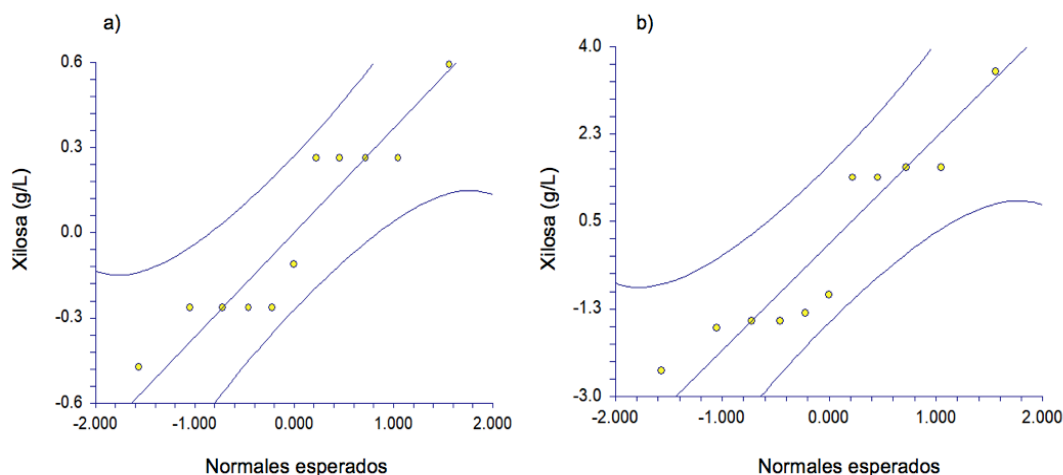
Evaluar el mayor tiempo de residencia de las tasas de dilución estudiadas en este trabajo.

# **ANEXOS**

## ANEXOS

### Anexo A1 Análisis y puntos de dispersión del proceso HA mediante un diseño híbrido de optimización para CC y RMR

Se puede observar mediante la Figura A1 que todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos aleatoriamente con una dispersión de 0.70% y 15.74% respectivamente para CC y RMR, los cuales no se ajustan a la recta de tendencia propuestas por los modelos de regresión, pero se encuentran dentro de una tendencia de normalidad. Por lo tanto, las diferencias entre los valores de la variable dependiente observados y los valores predichos a partir de la recta de regresión muestran una confiabilidad aceptable en la reproducción experimental.



**Figura A1** Gráfica de probabilidad normal representativa de los modelos de regresión experimental de diseños DHO: a) CC y b) RMR

### Anexo A2 ANOVA de hidrólisis ácida de CC y comprobación de hipótesis experimentales

En base las variables representativas que intervienen en la la experimentación propuesta por la sección 2.2.1, se comprobó la hipótesis nula donde  $H_0$ : Las variables  $X_{1ha}$ =Tiempo,  $X_{2ha}$ =Concentración de ácido y  $X_{3ha}$ =RSL tengan el mismo efecto y este dentro de la probabilidad estadística del proceso y  $H_1$ : El efecto de las variables que intervienen el proceso de HA de café mediante un DHO sea diferentes, es decir: ( $H_0: \mu_1 = \mu_2$  ó  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ ).

La Tabla A1, muestra el análisis de varianza, verificando la influencia de cada factor mediante un análisis de valores F (puntos porcentuales de una distribución Fisher), se obtiene un valor  $F_{ctrl}=6.39$ , que rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Estadísticamente se verifica que la RSL ( $F=2.83$ ) no presenta un efecto significativo durante el proceso ácido y realizando un análisis de medias se establece una relación fija de 1:6 (g:mL), relativa al promedio constante experimental de 1:5.58 (g:mL). El tiempo y la concentración de ácido presentaron efectos significativos, lo cual implicó una búsqueda de niveles de operación que incremente las concentraciones de xilosa a valores superiores a los 13.02 g/L siendo la variable de respuesta el contenido de hemicelulosa en el material lignocelulósico.

**Tabla A1** ANOVA de diseño híbrido de hidrólisis ácida de CC y producción de xilosa

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad	Términos de $R^2$
Regresión	9	161.8486	17.9831	15.97	0.1919	0.9930
Lineal	3	125.4915	41.8304	37.15	0.1198	0.7700
$X_{1ha}$	4	66.1663	16.5415	14.69	0.1929	0.4059
$X_{2ha}$	4	105.7916	26.4479	23.49	0.1533	0.6491
$X_{3ha}$	4	12.7374	3.1843	2.83	0.4159	0.0781
Cuadrático	3	11.8120	3.9373	3.50	0.3701	0.0724
Lineal	3	24.5450	8.1816	7.27	0.2647	0.1506
Error total	1	1.1260	1.1260			0.0069

### Anexo A3 ANOVA de hidrólisis ácida de RMR y comprobación de hipótesis experimentales

En base las variables representativas que intervienen en la la experimentación propuesta por la sección 2.2.1, se comprobó la hipótesis nula donde  $H_0$ : Las variables  $X_{1ha}$ =Tiempo,  $X_{2ha}$ =Concentración de ácido y  $X_{3ha}$ =RSL tengan el mismo efecto y este dentro de la probabilidad estadística del proceso y  $H_1$ : El efecto de las variables que intervienen el proceso de HA de madera mediante un DHO sea diferentes, es decir: ( $H_0: \mu_1 = \mu_2$  ó  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ ).

El proceso de HA para la madera se analizó bajo un DHO con las condiciones generadas en la Tabla 3.2 en donde se obtuvo el ANOVA que se muestra en la Tabla A2, al igual que la HA del café no se encontró la optimización del proceso, por lo que se evaluó la influencia de cada factor que interviene en el proceso y con

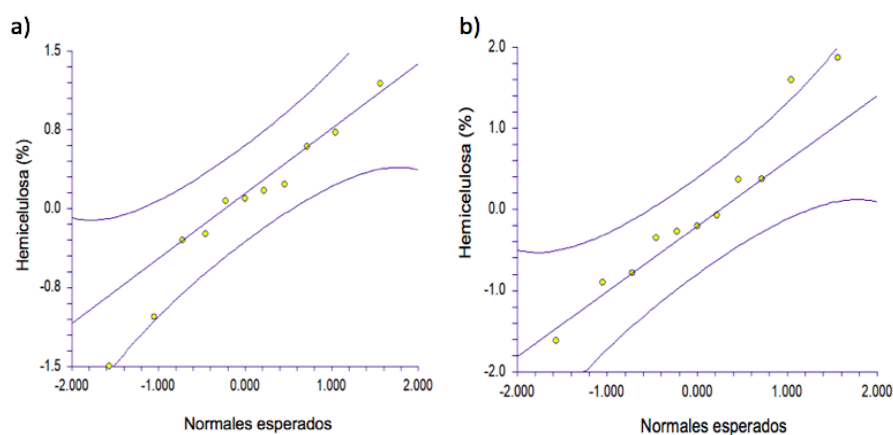
una  $F_{\text{ctrl}}=6.39$  se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa puesto que estadísticamente ningún factor se encuentra fuera de control al encontrar valores F por debajo del estadístico de control.

**Tabla A2** ANOVA de diseño híbrido de HA de RMR y producción de xilosa

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad	Términos de $R^2$
Regresión	9	189.9328	21.1036	0.60	0.7728	0.8426
Lineal	3	137.2666	45.7555	1.29	0.5564	0.6090
X <sub>1ha</sub>	4	55.9721	13.9930	0.39	0.8133	0.2483
X <sub>2ha</sub>	4	72.8761	18.2190	0.51	0.7645	0.3233
X <sub>3ha</sub>	4	70.6483	17.6622	0.50	0.7705	0.3134
Cuadrático	3	31.9236	10.6412	0.30	0.8345	0.1416
Lineal	3	20.7425	6.9141	0.20	0.8915	0.0920
Error total	1	35.4554	35.4554			0.1573

### Anexo B1 Análisis y puntos de dispersión del proceso de optimización de HA mediante un CDC equiradial para CC y RMR

La Figura B1 muestra la gráfica de residuos del modelo obtenido en la experimentación de hidrólisis ácida para CC y RMR, donde se puede observar que todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos aleatoriamente donde las diferencias entre los valores de la variable dependiente observados y los valores predichos a partir de la recta de regresión aplica para el modelo con un ajuste del 82.28% y 84.53 para CC y RMR respectivamente, con lo cual garantiza la fiabilidad de las correlaciones del modelo que se muestra en las Ecs. 3.3 y 3.6.



**Figura B1** Gráfica de probabilidad normal representativa de los modelos de regresión experimental de diseños CDC de optimización de HA: a) CC y b) RMR

### Anexo B2 ANOVA del proceso de optimización de HA de CC y comprobación de hipótesis experimentales

En base las variables representativas que intervienen en la la experimentación propuesta por la sección 2.2.2, se comprobó la hipótesis nula donde  $H_0$ : Las variables  $X_{1C}$ =Tiempo y  $X_{2C}$ =Concentración de ácido y tengan el mismo efecto y este dentro de la probabilidad estadística del proceso y  $H_1$ : El efecto de las variables que intervienen el proceso optimización de hidrólisis ácida alcalina de CC para la reducción de hemicelulosa mediante un CDC equiradial sea diferentes es decir: ( $H_0$ :  $\mu_1 = \mu_2$  ó  $H_1$ :  $\mu_1 \neq \mu_2$ ).

A partir del análisis estadístico sobre el ANOVA ( $F_{\text{ctrl}}=18.5$ ) de este proceso se puede verificar el efecto del factor tiempo ( $F=6.28$ ) y concentración de ácido ( $F=4.32$ ), se acepta la hipótesis nula y rechaza la hipótesis alternativa; siendo ambas variables no significativas al proceso, en base a los datos obtenido de la Tabla B1.

**Tabla B1** ANOVA de CDC para optimización de minimización de hemicelulosa en HA de CC

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad	Términos de $R^2$
Regresión	5	27.5014	5.5002	65.07	0.0152	0.8228
Lineal	2	2.8133	1.4066	16.64	0.0566	0.0841
$X_{1C}$	3	22.3176	7.4392	6.28	0.0378	0.6677
$X_{2C}$	2	15.3509	5.1169	4.32	0.0745	0.4592
Cuadrático	2	22.3427	11.1727	132.18	0.0075	0.6685
Lineal	1	2.3427	2.3427	27.72	0.0342	0.0700
Error total	5	5.9216	1.1843			0.1771

### Anexo B3 ANOVA del proceso de optimización de HA de RMR y comprobación de hipótesis experimentales

En base las variables representativas que intervienen en la la experimentación propuesta por la sección 2.2.2, se comprobó la hipótesis nula donde  $H_0$ : Las variables  $X_{1M}$ = Concentración de ácido y  $X_{2M}$ = RSL y tengan el mismo efecto y este dentro de la probabilidad estadística del proceso y  $H_1$ : El efecto de las variables que intervienen el proceso optimización de HA de RMR para la reducción de hemicelulosa mediante un CDC equiradial sea diferentes, es decir: ( $H_0$ :  $\mu_1 = \mu_2$  ó  $H_1$ :  $\mu_1 \neq \mu_2$ ).

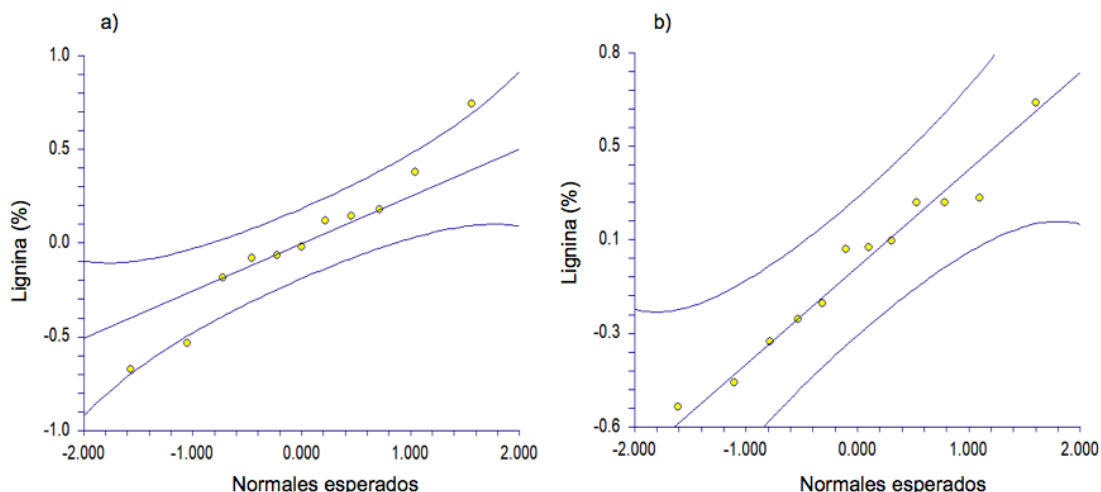
En base al control estadístico de la distribución Fisher ( $F_{\text{ctrl}}=18.5$ ) se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa debido a que el factor tiempo ( $F=38.28$ ) no se encuentra dentro de un control estadístico y esto se puede verificar debido a la capacidad absorbente que tiene el RMR con respecto al tiempo de proceso son diferentes (Tabla B2), es decir, en los puntos experimentales que contienen los niveles  $-1$  y  $-\sqrt{2}$  no se presentó una tendencia de remoción de hemicelulosa al no quedar totalmente permeable las fibras debido a niveles de RSL bajas, sin embargo matemáticamente se encontró los puntos estacionarios y se validaron sobre la región experimental explorada.

**Tabla B2** ANOVA de CDC para optimización de minimización de hemicelulosa en HA de RMR

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad	Términos de $R^2$
Regresión	5	57.6099	11.5220	80.82	0.0122	0.8453
Lineal	2	33.5397	1.4066	117.63	0.0084	0.4921
$X_{1M}$	3	16.3735	16.7698	38.28	0.1656	0.2402
$X_{2M}$	3	50.6186	16.8728	8.00	0.0235	0.7427
Cuadrático	2	24.0378	12.0189	84.31	0.0117	0.3527
Lineal	1	0.0324	0.0324	0.23	0.6824	0.0004
Error total	5	10.5399	2.1079			0.0041

### **Anexo C1 Análisis y puntos de dispersión del proceso hidrólisis de carácter básico: ácida alcalina y alcalino directo en fibras lignocelulosicas de CC.**

La Figura C1a muestra la gráfica de los residuos, donde se puede observar que, aunque la mayoría de los datos experimentales se encuentran dentro de la normalidad y están distribuidos uniformemente, existen dos datos inusitados, debido a posibles errores experimentales, ambientales, de tipo humano, variaciones de tiempo, sin embargo, los puntos centrales absorbieron los errores estándares generando la confiabilidad de la regresión propuesta, mientras que en la Figura C1b se observa que todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos aleatoriamente, por lo tanto, las diferencias entre los valores de la variable dependiente observados y los valores predichos a partir de la recta de regresión aplica para el modelo de regresión de las Ecs. 3.9 y 3.12.



**Figura C1** Gráfica de probabilidad normal representativa de los modelos de regresión experimental de los CDC de optimización de los procesos de hidrólisis alcalina sobre CC; a) HAcAl y b)HAlCr

## Anexo C2 ANOVA de hidrólisis ácida alcalina de CC y comprobación de hipótesis experimentales

En base las variables representativas que intervienen en la la experimentación propuesta por la sección 2.3.1, se comprobó la hipótesis nula donde  $H_0$ : Las variables  $X_{1\text{HAcAl-C}} = \text{Tiempo}$  y  $X_{2\text{HAcAl-C}} = \text{RSL}$  y tengan el mismo efecto y este dentro de la probabilidad estadística del proceso y  $H_1$ : El efecto de las variables que intervienen el proceso optimización de hidrólisis ácida alcalina de CC para la reducción de lignina mediante un CDC equiradial sea diferentes, es decir: ( $H_0: \mu_1 = \mu_2$  ó  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ ).

A partir del análisis estadístico sobre el ANOVA de este proceso (Tabla C1) se puede verificar el efecto del factor tiempo ( $F=7.63$ ) y RSL ( $F=5.08$ ), el cual acepta la hipótesis nula y rechaza la hipótesis alternativa; en que alguno de los tratamientos sea diferentes y significativo debido a que los valores de F de los factores unitarios son menores a la  $F_{\text{ctrl}}=18.5$ .



**Tabla C1** ANOVA de CDC para optimización de minimización de lignina en HAcAl de CC

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad	Términos de R <sup>2</sup>
Regresión	5	8.9056	1.7811	112.18	0.0088	0.8518
Lineal	2	0.7510	0.3755	23.65	0.0405	0.0718
X <sub>1HAcAl-C</sub>	3	7.0899	2.3633	7.63	0.0559	0.4521
X <sub>2HAcAl-C</sub>	2	4.7271	1.5757	5.08	0.0745	0.4592
Cuadrático	2	7.2418	3.6209	228.06	0.0043	0.6926
Lineal	1	0.9126	0.9126	57.48	0.0169	0.0872
Error total	5	1.5494	0.3098			0.1481

### Anexo C3 ANOVA de hidrólisis alcalina cruda de CC y comprobación de hipótesis experimentales

En base las variables representativas que intervienen en la la experimentación propuesta por la sección 2.3.1, se comprobó la hipótesis nula donde  $H_0$ : Las variables  $X_{1\text{HAICr-C}} = \text{H}_2\text{O}_2$  y  $X_{2\text{HAICr-C}} = \text{RSL}$  y tengan el mismo efecto y este dentro de la probabilidad estadística del proceso y  $H_1$ : El efecto de las variables que intervienen el proceso optimización de hidrólisis alcalina cruda de RMR para la reducción de lignina mediante un CDC equiradial sea diferentes, es decir: ( $H_0: \mu_1 = \mu_2$  ó  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ ).

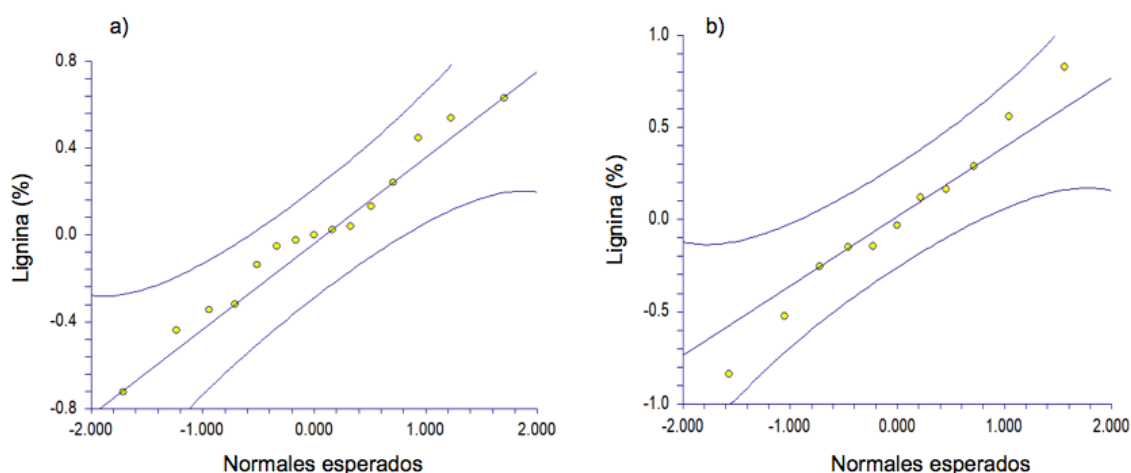
A partir del análisis estadístico sobre el ANOVA (Tabla C2) de este proceso se puede verificar el efecto del factor  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  ( $F=37.83$ ) y RSL ( $F=17.86$ ), el cual rechaza la hipótesis nula y acepta la hipótesis alternativa; debido a que alguno de los tratamientos sea diferentes y significativo debido a que los valores de F de los factores unitarios son menores a la  $F_{\text{ctrl}}=18.5$ , siendo en este caso la  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  como una variable no estable.

**Tabla C2** ANOVA de CDC para optimización de minimización de lignina en HAICr de CC

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad	Términos de R <sup>2</sup>
Regresión	5	27.7278	5.5455	132.51	0.0010	0.9593
Lineal	2	0.0514	0.0257	0.61	0.5975	0.0017
X <sub>1HAICr-C</sub>	3	22.2267	7.4089	37.83	0.0002	0.7690
X <sub>2HAICr-C</sub>	2	10.4961	3.4987	17.86	0.0021	0.3631
Cuadrático	2	27.6746	13.8373	3.3064	0.0003	0.9575
Lineal	1	0.0074	0.0074	0.04	0.8513	0.0000
Error total	5	1.1751	0.1958			0.0506

## Anexo D1 Análisis y puntos de dispersión del proceso hidrólisis de carácter básico: ácido alcalina y alcalino directo en fibras lignocelulosicas de RMR

Las Figuras D1a y D1b muestran los residuos del modelo obtenido en la experimentación, donde se puede observar que todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos aleatoriamente, por lo que las diferencias entre los valores de la variable dependiente observados y los valores predichos a partir de la recta de regresión aplica para el modelo de regresión de las Ecs. 3.15 y 3.18.



**Figura D1** Gráfica de probabilidad normal representativa de los modelos de regresión experimental de los CDC de optimización de los procesos de hidrólisis alcalina sobre RMR; a) HAcAl y b) HAICr

## Anexo D2 ANOVA del proceso de hidrólisis ácido alcalina de fibras lignocelulósicas de RMR

En base las variables representativas que intervienen en la experimentación propuesta por la sección 2.3.1, se comprobó la hipótesis nula donde  $H_0$ : Las variables  $X_{1\text{HacAl-M}}=\text{Tiempo}$ ,  $X_{2\text{HacAl-M}}=\text{Concentración de H}_2\text{O}_2$  y  $X_{3\text{HacAl-M}}=\text{RSL}$  tengan el mismo efecto y este dentro de la probabilidad estadística del proceso y  $H_1$ : El efecto de las variables que intervienen el proceso de hidrólisis ácido alcalina mediante un Bon Behnken sea diferentes, es decir: ( $H_0: \mu_1 = \mu_2$  ó  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ ).

A partir del análisis estadístico sobre el ANOVA (Tabla D1) de este proceso se puede verificar el efecto del factor tiempo ( $F=20.43$ ),  $[H_2O_2]$  ( $F=56.06$ ) y RSL ( $F=51.76$ ), el cual rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa; los factores durante el tratamiento alcalino son diferentes y significativos debido a que los valores de  $F$  de los factores unitarios sobrepasan a la  $F_{\text{ctrl}}=6.39$ .

**Tabla D1** ANOVA de diseño Box Behnken para optimización de minimización de lignina en HAAl de RMR

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad	Términos de $R^2$
Regresión	9	64.8510	7.2056	49.29	0.0002	0.9888
Lineal	3	0.2099	0.0699	0.48	0.7111	0.0033
$X_{1\text{HAAl-M}}$	4	11.9483	2.9870	20.43	0.0026	0.1821
$X_{2\text{HAAl-M}}$	4	32.7822	8.1955	56.06	0.0002	0.4998
$X_{3\text{HAAl-M}}$	4	30.2669	7.5667	51.76	0.0002	0.4615
Cuadrático	3	63.4485	21.1495	144.67	0.0000	0.9674
Lineal	3	1.1925	0.3975	2.72	0.1545	0.0181
Error total	1	0.7309	0.7309			0.0111

### Anexo D3 ANOVA del proceso de hidrólisis alcalina cruda de fibras lignocelulósicas de RMR

En base las variables representativas que intervienen en la la experimentación propuesta por la sección 2.3,1, se comprobó la hipótesis nula donde  $H_0$ : Las variables  $X_{1\text{HAICr-M}}=H_2O_2$  y  $X_{1\text{HAICr-M}}=\text{Tiempo}$  y tengan el mismo efecto y este dentro de la probabilidad estadística del proceso y  $H_1$ : El efecto de las variables que intervienen el proceso optimización de hidrólisis alcalina cruda para la reducción de lignina mediante un CDC equiradial sea diferentes, es decir: ( $H_0: \mu_1 = \mu_2$  ó  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ ).

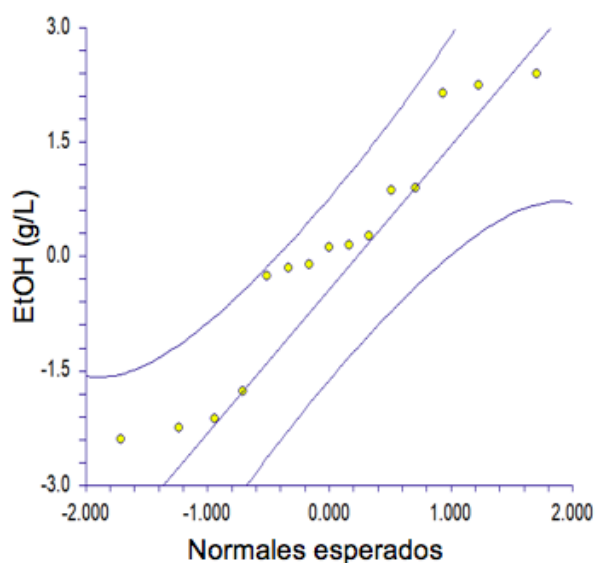
A partir del análisis estadístico sobre el ANOVA (Tabla D2) de este proceso se puede verificar el efecto del factor  $[H_2O_2]$  ( $F=22.57$ ) y tiempo ( $F=19.04$ ), el cual rechaza la hipótesis nula y acepta la hipótesis alternativa; debido a que los tratamientos a esos niveles son diferentes y significativos debido a que el valor de  $F$  de los factores unitarios sobrepasa a la  $F_{\text{ctrl}}=18.5$ .

**Tabla D2** ANOVA de CDC para optimización de minimización de lignina en HAICr de RMR

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad	Términos de R <sup>2</sup>
Regresión	5	42.2360	8.4472	113.37	0.0087	0.9504
Lineal	2	0.8453	0.4226	5.67	0.1498	0.0190
X <sub>1HAICr-M</sub>	3	29.7603	9.9201	22.57	0.0024	0.6697
X <sub>2HAICr-M</sub>	3	25.1583	8.3861	19.04	0.0036	0.5661
Cuadrático	2	40.5451	20.2725	272.09	0.0036	0.9123
Lineal	1	0.8455	0.8455	11.35	0.0779	0.0190
Error total	5	2.2021	2.2021			0.0033

### Anexo E1 Análisis y puntos de dispersión del proceso de fermentación de JSD en cultivo por lotes

A partir de los datos de la de experimentación de fermentación en cultivo por lotes se generó el gráfico de probabilidad normal (Figura E1) donde todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos aleatoriamente con una ligera dispersión de 8.51% de los datos, los cuales ajustan uniformemente sobre la línea recta la cual presenta el modelo propuesto. Por lo tanto, las diferencias entre los valores de la variable dependiente observados y los valores predichos a partir de la recta de regresión son confiables y representativos de la experimentación.



**Figura E1** Grafica de probabilidad normal representativa del modelo de regresión experimental del diseño Box Behnken para maximización del proceso de generación de etanol

## Anexo E2 ANOVA de fermentaciones en cultivo por lotes de JSD y comprobación de hipótesis experimentales

En base las variables representativas que intervienen en la la experimentación propuesta por la sección 2.8.1, se comprobó la hipótesis nula donde  $H_0$ : Las variables  $X_{1BBF} = \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $X_{2BBF} = (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $X_{3BBF} = \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  tengan el mismo efecto y este dentro de la probabilidad estadística del proceso y  $H_1$ : El efecto de las variables que intervienen el proceso de fermentación por lotes mediante un diseño Box Behnken sea diferentes, es decir: ( $H_0: \mu_1 = \mu_2$  ó  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ ).

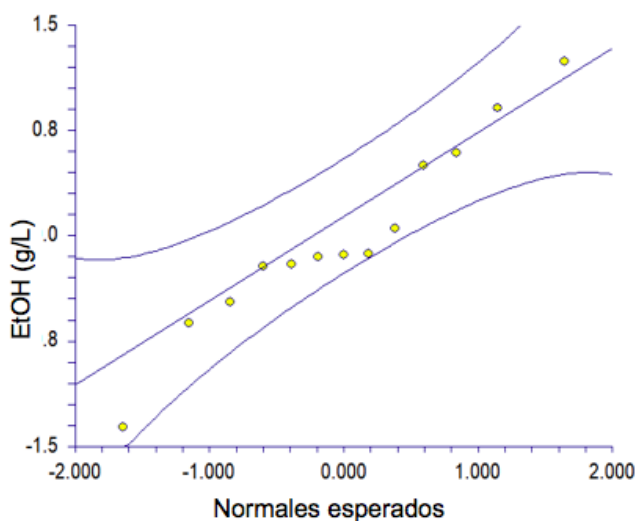
En el análisis de varianza mostrado en la Tabla E1, se puede verificar la influencia de cada factor sobre la experimentación ( $F_{\text{ctrl}}=6.39$ ) donde se observa que  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  presenta un efecto significativo en el proceso de enriquecimiento de la fuente de carbono, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, debido a que los efectos de las sales actúan de forma diferente sobre el proceso de generación de producto.

**Tabla E1** ANOVA de diseño Box Behnken para maximización de la concentración de etanol

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad	Términos de $R^2$
Regresión	9	381.8650	42.4294	18.12	0.0533	0.9149
Lineal	3	110.4060	36.8019	15.72	0.0604	0.2645
$X_{1BBF}$	4	221.0564	55.2641	7.78	0.0224	0.5296
$X_{2BBF}$	4	95.3068	23.8267	3.35	0.1083	0.2283
$X_{3BBF}$	4	106.0289	26.5072	3.73	0.0929	0.5604
Cuadrático	3	233.9266	77.9755	10.98	0.0122	0.5604
Lineal	3	37.5324	12.5108	5.34	0.1616	0.0899
Error total	5	35.5168	7.1033			0.0850

## Anexo F1 Análisis y puntos de dispersión del proceso de optimización de suplementación inorgánica de JSD en cultivo por lotes

Las concentraciones de etanol obtenidas durante el proceso generaron el gráfico de probabilidad normal como se observa en la Figura F1.



**Figura F1** Gráfica de probabilidad normal representativa del modelo de regresión experimental del CDC para optimización del proceso de generación de etanol

Dicha imagen muestra que todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos aleatoriamente con una ligera dispersión de 9.16% de los datos, los cuales ajustan uniformemente sobre la línea recta la cual presenta el modelo propuesto. Por lo tanto, las diferencias entre los valores de la variable dependiente observados y los valores predichos a partir de la recta de regresión son confiables y representativos de la experimentación.

### **Anexo F2 ANOVA del proceso de optimización de suplementación inorgánica de JSD en cultivo por lotes para la producción de alcohol a partir de un CDC equirradial**

En base las variables representativas que intervienen en la la experimentación propuesta por la sección 2.8.2, se comprobó la hipótesis nula donde  $H_0$ : Las variables  $X_{1\text{CDCF}}=\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $X_{2\text{CDCF}}=(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y tengan el mismo efecto y este dentro de la probabilidad estadística del proceso y  $H_1$ : El efecto de las variables que intervienen el proceso optimización de enriquecimientos de cultivo de JSD de café para la reducción de lignina mediante un CDC equirradial sea diferentes, es decir: ( $H_0: \mu_1 = \mu_2$  ó  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ ).

El análisis de varianza mostrado en la Tabla F1 se puede verificar la influencia de cada factor sobre la experimentación ( $F_{\text{ctrl}}=18.5$ ), se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa debido a que ninguno de los nutrientes inorgánicos son diferentes entre si y durante el desarrollo de los cultivos de optimización.

**Tabla F1** ANOVA de CDC para la optimización del proceso de generación de etanol

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad	Términos de R <sup>2</sup>
Regresión	5	55.3182	11.0636	124.46	0.0001	0.9084
Lineal	2	11.9072	5.9536	66.98	0.0008	0.1955
X <sub>1CDCF</sub>	3	43.3370	14.4457	18.13	0.0011	0.3184
X <sub>2CDCF</sub>	2	19.3941	0.7965	8.12	0.0111	0.3631
Cuadrático	2	40.9715	20.4857	230.46	0.0000	0.6728
Lineal	1	2.4395	2.4395	27.44	0.0063	0.0400
Error total	5	5.5760	0.7965			0.0915

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril A., Navaro E. A. 2012. Etanol a partir de biomasa lignocelulosica. La Habana, Cuba.
- Agbor V.B., Cicek N., Sparling R., Berlin A., Levin D.B. 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application, *Biotechnology Advances* **29**(1):675–685.
- Aguilar, M.G. 1998. Caractérisation cinétique et métabolique d'une souche de *Brettanomyces*. Tesis Doctoral, I.P.N. Toulouse, France.
- Álvarez C.M. 2009. Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional, *Economía Informa*, **359**(1):63-89.
- AOCS 2017. Free Fatty Acids in Crude and Refined Fats and Oils. AOCS Official Method Ca 5a-40.
- Ariyajaroenwong P., Laopaiboon P., Salakkam A., Srinophakun P., Laopaiboon L. 2016. Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. **66**(1):210-216.
- Arora R., Behera S., Sharma N.K., Kumar S., 2017. Augmentation of ethanol production through statistically designed growth and fermentation medium using novel thermotolerant yeast isolates. *Renewable Energy* **109**(1):406-421.
- Bajpai P. 2013. Advances in Bioethanol. Springer New Delhi Heidelberg, New York., USA.
- Balat M., Balat H., Oz C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. **34**(1):551-573.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. 2009. *Food Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Garching, Germany.
- Chuck H. C., Carrillo P. E., Olea H. E., y Serna S. 2011. Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: tecnologías, avances y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. **10**(3):529-549.
- Corro Herrera, V.A. 2010. Producción de ácido acético por *Brettanomyces bruxellensis* en cultivo continuo. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz. México.



Cuervo L., Folch L. J. y Quiroz E. R. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol, *BioTecnología* **13**(3):11-25.

De Lucas H. A. I., Del Peso C.T., Rodríguez E. G., Prieto P.P., Sanz E.G., Sánchez M.M. 2012. Biomasa, Biocombustibles y Sostenibilidad. Centro Tecnológico Agrario y Agroalimentario. ITAGRA.CT. Barcelona.

De Souza R.B., de Menezes J.A.S., de Souza R.F.R.m Dutra E.D., de Moras Jr M.A. 2015. Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **175**(1): 209-222.

Dessie W., Zhu J., Xin F., Zhang W., Jlang Y., Wu H., Ma H., Jlang M. 2018. Bio-succinic acid production from coffee husk treated with thermochemical and fungal hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **41**(10):1461–1470.

Dopico D.H., Bordallo E.Y., León V. 2014. Estudio preliminar sobre la influencia de las microondas en la hidrólisis alcalina del bagazo. *Centro Azucar*, **41**(4):1-8.

Du R., Yan J., Feng Q., Li P., Zhang L., Chang S., Li S. 2014. A Novel Wild-Type *Saccharomyces cerevisiae* Strain TSH1 in Scaling-Up of Solid State Fermentation of Ethanol from Sweet Sorghum Stalks. *PLoS ONE*. **9**(4):e94480.

Gallina G., Cabeza A., Gréman H., Biasi P., García-Serna J., Salmi T. 2018. Hemicellulose extraction by hot pressurized water pretreatment at 160 °C for 10 different woods: Yield and molecular weight *The Journal of Supercritical Fluids*. **133**(1):716-725.

García Camús J. M., García Laborda J.A. 2006. Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol. Circulo de Investigación en Tecnologías Medioambientales y Energía (CITME), Madrid España.

González R. S. M., Cruz S. N. O., Quiñonez R. O. M., Roldan M. H., Quiñonez R. J. G. y López 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**(1):17-28.

Govumoni S.P., Koti S., Kothagouni S.Y. Venkateshwar S., Linga V.R. 2013. Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production. *Carbohydrate Polymers*. **91**(1):646-650.

Hernández A. 2003. Microbiología Industrial, Madrid España.

Hosgun E.F., Bozan B. 2014. Comparison of high temperature alkali and acid pretreatment for the enzymatic saccharification of Poppy stalks. *Chemical Engineering Transactions*. **37**(1):373-378.

Hinojosa-Valsero M., Garita-Cambroner J., Panigua-García A.I., Díez-Antolínez. 2018. Biobutanol production from coffee silverskin. *Microbial Cell Factories*. **17**(1):154-162.

Jeevan P., Nelson R. y Rena E. A. 2011. Optimization studies on acid hydrolysis of corn cob hemicellulosic hydrolysate for microbial production of xylitol. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. **4**(1):114-123.

Jin H., Liu R. He Y. 2012. Kinetics of Batch Fermentations for Ethanol Production with Immobilized *Saccharomyces Cerevisiae* Growing on Sweet Sorghum Stalk Juice. *Procedia Environmental Sciences*. **12**(A): 137-145.

Kleingesinds E.K., Jose H.M.A., Brumano L.P., Silva-Fernandes T., Rodrigues D.J., Rodrigues R.C.L.B. 2018. Intensification of bioethanol production by using Tween 80 to enhance dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of corncob. *Industrial Crops & Products*. **124**(1):166-176.

Ko, J.K., Um, Y., Woo, H.M., Kim, K.H., Lee, S-M. 2016. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. *Bioresource Technology*. **209**(1):290-296.

Kocková-Kratochvílová A. 1990. Taxonomy of yeast and yeast-like microorganisms. Federal Republic of Germany.

Laopaiboon, L., Thanonkeo, P., Jaisil, P., Laopaiboon, P. 2007. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* **23**(10): 1497-1501.

Levelspiel O., Conesa J.A. 2004. Chemical reaction engineering, New York, USA.

Liu C., Wyman, C.E. 2003. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Industrial and Engineering ChemistryRes*, **42**(21):5409–5416.

Lynd L. R. 1996. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy. *Annu Rev Energy Environ* **21**(1):403-465.

Menezes G.T.E., Do Carmo R.J., Alves L.F.J.G., Menezes G.T.A., Guimaraes C.I., Queiroz F., Pimenta C.J. 2013. Optimization of Alkaline Pretreatment of Coffee Pulp for Production of Bioethanol. *Biotechnology Progress*. **30**(2):451-462.

Mei X., Liu R., Shen F., Wu H. 2009. Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Ethanol from Stalk Juice of Sweet Sorghum by Immobilized Yeast Using Response Surface Methodology. *Energy & Fuels*. **23**(1): 487-491.

Montes G. N., García S. J., Jiménez G. A., Pérez L. R. y Padilla D. G. 2010. Guía técnica de producción de sorgo dulce [sorghum bicolor (L.) Moench] en Tamaulipas. Folleto Técnico 49. ISBN 978-607-425-468-6.

Montgomery C.D. 2004. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Ed. Iberoamericana México. ISBN: 968-18-6156-63.2.

Mussatto S.I., Machado E.M.S., Carneiro L.M., Teixeira J.A. 2012. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*. **92**(1):763-768.

Mussatto S.I., Machado E.M.S., Martins S., Teixeira J.A. 2011. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*. **4**(1):661-672.

Niglio S., Procentese A., Russo M.E., Sannia G., Marzocchella. 2017. Ultrasound-assisted Dilute Acid Pretreatment of Coffee Silverskin for Biorefinery Applications. *Chemical Engineering Transactions*. **57**(1):109-114.

Nuanpenga S., Thanonkeo S., Klanrit P., Thanonkeo P. 2018. Ethanol production from sweet sorghum by *Saccharomyces cerevisiae* DBKKUY-53 immobilized on alginate-loofah matrices. *Brazilian Journal of Microbiology*. **49**(1): 140-150.

Ortíz Muñiz, B. 2010. Estudio de la fisiología de *S. cerevisiae* ITV01 y su deficiencia respiratoria para la producción de etanol. Tesis doctoral. I.T. de Veracruz.

Ovando S.L.C, Waliszewski K.N. 2005. Commercial cellulases preparations and their applications in extractives processes. *Universidad y Ciencia*. **21**(42):111-120.

Parajó, J. C.; Domínguez, H.; Domínguez, J. M. (1998). Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*., **66**(1):25-40.

Partida S. G. 2017. Producción de etanol a partir de jugo y bagazo de sorgo dulce (*Sorghum bicolor (L.) Moench*) mejorado genéticamente. Tesis doctoral. I.T. de Veracruz.

Pérez-Sariñana B., Saldaña-Trinidad S. 2014. Chemistry and biotransformation of coffee by products to biofuels. IntechOpen. Pennsylvania. USA.

Quintero R. 1981. Ingeniería bioquímica, teoría y aplicaciones. Ciudad de México, México.

Rafiqul I.S.M., Sakinah M.A.M. 2012. Design of process parameters for the production of xylose from wood sawdust. *Chemical Engineering Research and Design*. **90**(1):1307-1312.

- Rattanapan A., Limtong S., Phisalaphong M., 2011. Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations of blackstrap molasses using immobilized yeast cells on thin-shell silk cocoons. *Applied Energy*. **88**(1): 4400-4404.
- Raven P.H., Ever R.F., Eichhorn. 1992. Biología de las plantas. Reverte. Barcelona.
- Rincón J.M.M., Silva E.E.L. 2014. Bioenergía: Fuentes, conversión y sustentabilidad. Bogotá, Colombia.
- Rodríguez M.D., Castrillo M. L., Velázquez J.E., Kramer G.R., Sedler C., Zapata P.D., Villalba L. 2017. Obtención de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino pretratado secuencialmente con ácido-base. *Contaminación Ambiental*. **33**(2):317-324.
- Rodríguez N.V., Zambrano A.F. 2010. Los subproductos del café: fuente de energía renovable. Folleto Técnico 393. ISSN-0120-0178.
- Salcedo M. J. G., Galán L. J. E. y Flores L. M. 2011. Evaluation of enzymes for the hydrolysis of waste (leaves and top cane) from the harvest of sugar cane. *DYNA*. **78**(169):182-190.
- Salinas E.C., Gasca V.Q. 2009. Los biocombustibles. *El Cotidiano*. **157**(1):75-82.
- Sánchez-Riaño A.M. 2009. Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts, Tumbaga, **5**(1):61-91.
- Santos L.D., Del Bianco M. S., Zanella C. G., De Resende M.M., Cardoso V. L., Julio E.R. 2015. Continuous ethanol fermentation in tower reactors with cell recycling using flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* **50**(11):1725-1729.
- Sathendra E.R., Baskar G., Praveenkumar., Gnansounou E. 2019. Bioethanol production from palm wood using *Trichoderma reesei* and *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*. **271**(1):345-352.
- Scully D.S., Jaiswal A.K. Abu-Ghannam N. 2016. An investigation into spent coffee waste as a renewable source of bioactive compounds and industrially important sugars. *Bioengineering*. *Bioengineering (Basel)*. **21**(3):1-13.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D., 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure. Colorado. USA.
- Soto C.E.A., Miranda J.L. Castro M.R., Pérez G.V., Rodríguez M. A. P., Chairez I.H. 2013. Alkaline pretreatment of Mexican pine residues for bioethanol production. *African Journal of Biotechnology*. **12**(31):4956-4965.

Soyuduru D., Ergun M., Tosun A. 2009. Application of a Statistical Technique to Investigate Calcium, Sodium, and Magnesium Ion Effect in Yeast Fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology* **152**(2): 326-33.

Suárez C.M., Garrido C.N.A., Guevara R.C.A. 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *ICIDCA*. **50**(1):20-28.

Taiz L., Zeiger E. 2006. *Fisiología vegetal*. Castellón de la Plana, España.

Tan L., Zhao-Yong S., Okamoto S., Takaki M., Yue-Quin T., Morimura S., Kida K. 2015. Production of ethanol from raw juice and thick juice of sugar beet by continuous ethanol fermentation with flocculating yeast strain KF-7. *Biomass and Bioenergy*. **81**(15):265-272.

Thani A., Laopaiboon P., Laopaiboon L. 2017. Improvement of a continuous ethanol fermentation from sweet sorghum stem juice using a cell recycling system. *Journal Biotechnology*. **251**(10):21-29.

Thani A., Lin Y.H., Laopaiboon P., Laopaiboon L. 2016. Variation of fermentation redox potential during cell-recycling continuous ethanol operation. *Journal of Biotechnology*. **239**(1):68-75.

Vázquez H. J., Dacosta O. 2007. Alcoholic fermentation: An option for renewable energy production from agricultural residues. *Ingeniería, investigación y tecnología*. **7**(4):249-259.

Viñals M.V., Bell A.G., Muchelena G.A., Ramil M.M. 2012. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, *ICIDCA*. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, **46**(1):7-12.

Walker, G.M. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley. Escocia.

Wang H.M.D., Cheng Y.S., Huang C.H., Huang C.W. 2016. Optimization of High Solids Dilute Acid Hydrolysis of Spent Coffee Ground at Mild Temperature for Enzymatic Saccharification and Microbial Oil Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **180**(4):753-765.

Wang Q.W.Z., Shen F., Hu J. Sun F., Lin L., Yang G., Zhang Y., Deng S. 2014. Pretreating lignocellulosic biomass by the concentrated phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) for enzymatic hydrolysis: Evaluating the pretreatment flexibility on feedstocks and particle sizes. *Bioresource Technology*. **166**(1): 420-428.

Yamada R., Nakashima K., Asai-Nakashima N., Tokuhara W., Ishida N., Katahira S., Kamiya N., Ogino C., Kondo A. 2016. Direct ethanol production from ionic liquid-

pretreated lignocellulosic biomass by cellulase-displaying yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **182**(1):229-237.

Yuvraj, Kaur R., Uppal S.K., Sharma P., Oberoi H.S. 2013. Chemical Composition of Sweet Sorghum Juice and its Comparative Potential of Different Fermentation Processes for Enhanced Ethanol Production. *Sugar Tech*. **15**(3): 305-310.