



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE LICENCIATURA EN  
INGENIERÍA EN ENERGÍA Y SUSTENTABILIDAD

OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE MATERIAL  
LIGNOCELULÓSICO DE YACA PRETRATADO POR MÉTODO DE  
ÁCIDO DILUIDO, BAJO UN PROCESO DE SACARIFICACIÓN Y  
FERMENTACIÓN SECUENCIAL

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN:  
INGENIERA EN ENERGÍA Y SUSTENTABILIDAD

PRESENTA:

**ALEJANDRA SARAI GUTIÉRREZ CHÁVEZ**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. ANA ALEJANDRA VARGAS TAH**

Morelia, Mich., septiembre 2021



“Que nada nos limite,  
que nada nos defina,  
que nada nos sujete.  
Que la libertad sea nuestra propia sustancia”.

Simone de Beauvoir

## **Dedicatoria**

*A mi madre, que ha estado conmigo y para mí en todo momento,  
quien me ha enseñado el valor del esfuerzo,  
que me ha llenado de amor, que me inspira para día con día ser mejor,  
quien me lo ha dado todo sin pedir nada a cambio.*

## **Agradecimientos**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por acogerme durante estos años, permitirme adquirir los conocimientos que me ayudarán a desarrollarme como una profesionalista y ser sede de vivencias inolvidables.

Al Posgrado de Ingeniería Química por abrirme las puertas de sus instalaciones para realizar la investigación para realizar esta tesis.

A mis maestros de carrera quienes nos compartieron su conocimiento y enseñanzas.

Al Dr. Agustín Jaime Castro Montoya por su apoyo al proyecto y por permitirme utilizar el laboratorio beta.

A la Dra. Alejandra Vargas Tah por su dedicación y entusiasmo al trasmitirme un poco de sus conocimientos; por su paciencia, motivación y guía durante este proceso.

A mi mamá por su esfuerzo incesante para impulsarme a alcanzar mis sueños, por su amor y por siempre confiar en que lo puedo lograr.

A mi abuelita Sara por ser mi segunda mamá, apoyarme, cuidarme y guiarme.

A mi hermano Abraham, por ser mi cómplice, mi amigo y siempre estar para mí.

A mis sobrinos Isaac y Javat que han llenado mis días de alegría y ternura.

A mi cuñada Citalli por todo el apoyo durante los días pesados de estudio.

A mis tíos y primos quienes me han hecho sentir respaldada en cada paso que doy.

A mis amigos por darme ánimo y brindarme siempre compañía aun si hay kilómetros de distancia.

A Francisco Romero por estar pendiente, apoyarme y animarme a seguir adelante.

A mis compañeros por los momentos compartidos y las anécdotas, especialmente Diana, Ilse, Edwin, Paco, Vilchis e Iván quienes me ofrecieron su amistad.

A Diana, AmayrÍ y Luis, con quienes compartí días de risas y estrés en el laboratorio, haciendo todo más ameno.

A quien fue flor en mi camino y sin darse cuenta me animó cuando me sentí decaída.

A todos quienes hicieron posible que alcanzara esta meta.

## Índice de contenido

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
3.1. Biocombustibles.....	3
3.1.1. Regulación de biocombustibles en México.....	4
3.2. Contaminación en México.....	4
3.3. La yaca.....	5
4. Antecedentes.....	7
4.1. ¿Qué son los biocombustibles?.....	7
4.2. Clasificación de los biocombustibles.....	7
4.3. Bioetanol de segunda generación.....	8
4.3.1. El material.....	8
4.3.2. Pretratamiento.....	10
4.3.3. Hidrólisis enzimática o sacarificación.....	13
4.3.4. Fermentación.....	14
4.4. Estudios relacionados.....	16
5. Justificación.....	17
6. Hipótesis.....	18
7. Objetivos.....	18
7.1 Objetivo general.....	18
7.2 Objetivos particulares.....	18
8. Metodología.....	19
8.1. Caracterización.....	19
8.1.1. Determinación de humedad.....	19
8.1.2. Determinación de cenizas.....	20
8.1.3. Cuantificación de azúcares estructurales.....	21
8.1.4. Cuantificación de lignina insoluble.....	23
7.1.5. Lignina soluble.....	24
8.2. Pretratamiento por hidrólisis ácida.....	25
8.3. Sacarificación.....	26
8.4. Fermentación.....	27
8.4.1. Crecimiento del microorganismo fermentador.....	27

8.4.2. Hidrolizados simulados .....	28
8.4.3. Hidrolizados reales .....	32
8.5. Técnicas analíticas.....	34
8.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	34
8.5.2. Espectrofotometría .....	35
9. Resultados y discusión .....	37
9.1. Caracterizaciones .....	37
9.1.1. Material sin pretratar.....	37
9.1.2. Material después del pretratamiento.....	38
9.2. Sacarificación.....	40
9.3. Fermentación .....	45
9.3.1. Hidrolizados simulados .....	45
9.3.2. Hidrolizados de yaca.....	46
10. Conclusiones.....	49
11. Recomendaciones .....	50
12. Referencias bibliográficas .....	51

## Índice de figuras

Figura 1.	Árbol de <i>Artocarpus heterophyllus</i> (Jaca).....	5
Figura 2.	Pasos para la obtención de bioetanol de segunda generación.....	8
Figura 3.	Composición del material lignocelulósico.....	10
Figura 4.	Esquema del cambio en la estructura del material lignocelulósico debido al pretratamiento.....	10
Figura 5.	Esquema del cambio en el material pretratado después de la hidrólisis enzimática. ....	13
Figura 6.	Sacarificación en frascos de rosca para llevar a fermentación .....	32
Figura 7.	Cromatógrafo de líquidos Varían ProStar 410 .....	35
Figura 8.	Viales de vidrio para HPLC.....	35
Figura 9.	Carrusel del cromatógrafo .....	35
Figura 10.	Espectrofotómetro utilizado para medir densidad óptica y lignina soluble .....	36
Figura 11.	Celda traslucida para espectrofotómetro .....	36
Figura 12.	Composición del material lignocelulósico de yaca antes del pretratamiento .....	38
Figura 13.	Composición del material lignocelulósico de yaca después del pretratamiento.....	39
Figura 14.	Cinética de sacarificación en experimento con carga de enzimas por gramo de glucano. Concentración de Glucosa y Xilosa en g/l respecto al eje Y izquierdo; concentración de Arabinosa y Ácido acético en g/l respecto al eje Y derecho. ....	41
Figura 15.	Cinética de sacarificación en experimento con carga de enzimas por gramo de material lignocelulósico seco. Concentración de Glucosa y Xilosa en g/l respecto al eje Y izquierdo; concentración de Arabinosa y Ácido Acético en g/l respecto al eje Y derecho. ....	41
Figura 16.	Cinéticas de azúcares totales en los experimentos “carga de enzima por gramo de material” y “carga de enzima por gramo de glucano”. “Azúcares totales” es la suma de Glucosa, Xilosa y Arabinosa. 43	
Figura 17.	Cinética de fermentación en hidrolizados simulados. Concentración de Glucosa y Xilosa respecto al eje Y izquierdo; concentración de Etanol y Ácido Acético respecto al eje Y derecho.....	45
Figura 18.	Cinética de fermentación en hidrolizados de yaca. Concentración de glucosa y xilosa en el eje Y izquierdo; concentración de etanol y ácido acético en el eje Y derecho. ....	47

## Índice de tablas

Tabla 1.	Métodos de pretratamiento .....	11
Tabla 2.	Orden y cantidad de sales para 500ml de medio mineral AM1.....	29
Tabla 3.	Comparación de la composición del material antes y después del pretratamiento .....	40
Tabla 4.	Comparación de las concentraciones finales de azúcares en sacarificaciones con distintas cargas de enzimas .....	43
Tabla 5.	Caracterización del sólido residual después de la sacarificación .....	44
Tabla 6.	Comparación de parámetros cinéticos de los hidrolizados .....	48

## 1. Resumen

Para reducir el calentamiento global se han propuesto diferentes opciones, entre ellas la generación y uso de los biocombustibles. Los biocombustibles siguen en investigación para mejorar el proceso de elaboración, aumentar la calidad y para ampliar las materias primas para obtenerlos, cumpliendo con nuestras leyes vigentes.

En México, *Artocarpus heterophyllus*, o comúnmente llamada yaca, es un fruto no aprovechado en su totalidad pues el 75% se considera “desperdicio”, por lo cual, en este trabajo se estudia el potencial para generar bioetanol de segunda generación, hidrolizando enzimáticamente los residuos lignocelulósicos pretratados con el método de ácido diluido, para posteriormente fermentarse en forma secuencial empleando, *Escherichia coli* cepa MS04 como organismo fermentador.

Los resultados mostraron que con la hidrólisis enzimática se logró recuperar 105.6 g/L de azúcares contenidos en el material y con ellos se obtuvieron a nivel matraz 26.5 g/L de etanol, teniendo un rendimiento máximo teórico de 70.62%, sin la separación de sólidos y acondicionando el hidrolizado sólo con una tercera parte de las sales del medio mineral. Indicando que el hidrolizado de yaca puede ser fermentado a etanol.

Palabras clave: material lignocelulósico de yaca, bioetanol de segunda generación, sacarificación, fermentación, *E. coli* MS04.

## **2. Abstract.**

Different options have been proposed to reduce global warming, including the generation and use of biofuels. Biofuels are still been investigated to improve the production process, increase their quality and expand the raw materials options to obtain them, complying with our current laws.

In Mexico, *Artocarpus heterophyllus*, or commonly called jackfruit, is a fruit not fully exploited, since 75% is considered "waste". Therefore, in this work the potential to generate second generation bioethanol is studied, enzymatically hydrolyzing the lignocellulosic residues pretreated with the dilute acid method, to be sequentially fermented using *Escherichia coli* strain MS04 as a fermenting organism.

The results showed that with the enzymatic hydrolysis it was possible to recover 105.6 g/l of sugars contained in the material and with them 26.5 g/l of ethanol were obtained at the flask level, having a theoretical maximum yield of 70.62%, without separation of solids and conditioning the hydrolyzate with only one third of the salts of the mineral medium. This indicates that jackfruit hydrolyzate can be fermented to ethanol.

### **3. Introducción.**

Una de las grandes preocupaciones actuales a nivel global es la disminución de las reservas de petróleo. La inquietud surge principalmente por la dependencia del petróleo para realizar las actividades cotidianas, ya que gran parte de las cosas que se utilizan son producidas a partir del petróleo. Los servicios como la electricidad y el combustible para el transporte, dependen principalmente de este hidrocarburo.

Por otro lado, el uso de productos derivados del petróleo genera una gran cantidad de residuos y emisiones de gases contaminantes.

Por dichas razones se buscan e investigan alternativas para reducir el consumo de combustibles fósiles como el petróleo.

#### **3.1. Biocombustibles.**

A partir de biomasa se pueden obtener distintos combustibles, pueden ser sólidos, gaseosos o líquidos.

Los biocombustibles sólidos pueden ser: carbón vegetal, pellets, briquetas o utilizarse directamente como leña. Este tipo de combustible se utiliza principalmente para producir calor o electricidad mediante su previa combustión, gasificación o pirólisis. Los biocombustibles líquidos incluyen principalmente el bioetanol, el biodiesel, entre otros, que se usan como aditivos a los combustibles fósiles (diésel y gasolina) en motores de combustión interna (REMBIO, s.f.).

En los biocombustibles gaseosos se puede encontrar el gasógeno, biogás y el hidrógeno (Gasca Quezada & Salinas Callejas, 2009).

### **3.1.1. Regulación de biocombustibles en México.**

En México se ha regulado el desarrollo de biocombustibles mediante distintas leyes, en las que se busca un uso sustentable de los recursos asociados a la generación, distribución y uso de la bioenergía. Una de las mayores regulaciones es proteger la seguridad alimentaria.

Lo anterior se deja claro en el artículo 1 de la *Ley de Promoción y Desarrollo de bioenergéticos*:

(Diario Oficial de la Federación, 2008)

*Promover la producción de insumos para Bioenergéticos, a partir de las actividades agropecuarias, forestales, algas, procesos biotecnológicos y enzimáticos del campo mexicano, sin poner en riesgo la seguridad y soberanía alimentaria del país de conformidad con lo establecido en el artículo 178 y 179 de la Ley de Desarrollo Rural Sustentable.*

Debido a dichas regulaciones, en este país se desarrollan principalmente los biocombustibles de segunda generación, de manera que no se compita por la materia prima, ni por los campos para cultivos energéticos.

### **3.2. Contaminación en México.**

El país no cuenta con un plan para la adecuada separación de residuos, por lo que en general se mezclan los desechos y se llevan a un depósito de basura, esto provoca acumulación de basura; aumento de la contaminación de suelos y aire; propicia la proliferación de fauna nociva y aumenta el riesgo de que la población humana contraiga enfermedades.

Por las razones anteriores es conveniente pensar en la utilización de los residuos de yaca para generar un producto de valor agregado. Una de las opciones por considerar es obtener un biocombustible, que permita, además, disminuir las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI), puesto que la contaminación es un problema que se busca combatir a nivel internacional.

Es pertinente mencionar que en México se emitieron 683 millones de toneladas de dióxido de carbono durante el 2015, de los cuales el 25.1% corresponde al sector del transporte (INECC, 2018).

### 3.3. La yaca

La yaca o jaca, cuyo nombre científico es *Artocarpus heterophyllus*, es una fruta originaria de Indonesia que fue introducida a México, en la década de 1960. Crece en árboles que pueden medir entre 8 y 25 metros de altura y tener un diámetro de copa de hasta 6.7 metros; el peso de la fruta varía entre 1.6 y 25 kg, sin embargo, se han encontrado ejemplares de hasta 50 kg.



Figura 1. *Árbol de Artocarpus heterophyllus* (Jaca).

Fuente: Autor desconocido, bajo licencia CC BY-SAEI

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) del gobierno de México, presenta sus datos abiertos en el archivo "*Estadística de la Producción Agrícola de 2019*" en el que se reúnen los datos de los cultivos a nivel nacional de dicho año. De acuerdo con este documento en 2019 se reportaron 1,684.7 toneladas cultivadas de Jaca, de las cuales solo 1,504.7 toneladas fueron cosechadas, representando un valor económico aproximado por el cultivo a nivel nacional de \$200,303,261.2 MXN (SIAP, 2019).

El principal productor de yaca en México es el estado de Nayarit, que produjo más del 90% de la cosecha total en el 2019; sin embargo, otros estados como Michoacán, Colima, Hidalgo, Jalisco y Veracruz comienzan a apostar por cultivar este fruto.

Es posible cosechar yaca durante casi todo el año en zonas tropicales, aunque en Nayarit, la temporada alta de floración se presenta en los meses entre mayo y septiembre. La maduración de la fruta tarda 2.5 meses la mayor parte del año y 4 meses durante el invierno (Luna Esquivel, Alejo Santiago, Ramírez Guerrero, & Arévalo Galarza, 2013).

Aproximadamente el 75% del peso de esta fruta se considera residuo, ya que comúnmente en México solo se consume la pulpa y en muy pocos lugares las semillas (Aguilar López, 2018). Adicionalmente, al ser un fruto de exportación, los frutos que no pasan el control de calidad son desechados, pues el consumo nacional de esta fruta es muy pobre.

## **4. Antecedentes.**

El material de estudio, la composición de este, los recursos y las leyes mexicanas, dan pauta para investigar más a fondo acerca de la elaboración de biocombustibles y la viabilidad de los residuos de la yaca para producirlo.

### **4.1. ¿Qué son los biocombustibles?**

El término “biocombustible” se refiere a los combustibles sólidos, líquidos o gaseosos que han sido obtenidos a partir de biomasa. Estos biocombustibles se utilizan principalmente en el sector del transporte y en una menor proporción para generación de energía eléctrica (Monteiro Machado, 2010).

Los biocombustibles pueden clasificarse por su estado físico, en sólidos, líquidos y gaseosos, o de acuerdo con la biomasa que fue utilizada para obtenerlos.

### **4.2. Clasificación de los biocombustibles.**

Cuando los biocombustibles se catalogan según la materia prima utilizada para su obtención se tienen las siguientes clases:

- *Primera Generación*, los que se obtienen de *azúcares* o aceites comestibles;
- *Segunda Generación*, los que se elaboran de residuos agrícolas o forestales no comestibles;
- *Tercera Generación*, los que se fabrican a partir de materiales de rápido crecimiento;
- *Cuarta Generación*, aquellos para los que se emplean en su totalidad bacterias y materias primas genéticamente modificadas para aumentar su eficiencia (Álvarez Maciel, 2009).

Al ser residuos de yaca lo que se tiene como materia prima, cualquier biocombustible que se obtenga a partir de ellos se clasificaría como un biocombustible de segunda generación. En este caso se estudia la posibilidad de obtener bioetanol.

### 4.3. Bioetanol de segunda generación.

Los años de investigación sobre bioetanol de segunda generación indican que la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica sigue un procedimiento general en la mayoría de los casos.

En la figura 2 se muestra un diagrama en el que se presentan los pasos generales para la obtención de bioetanol lignocelulósico:

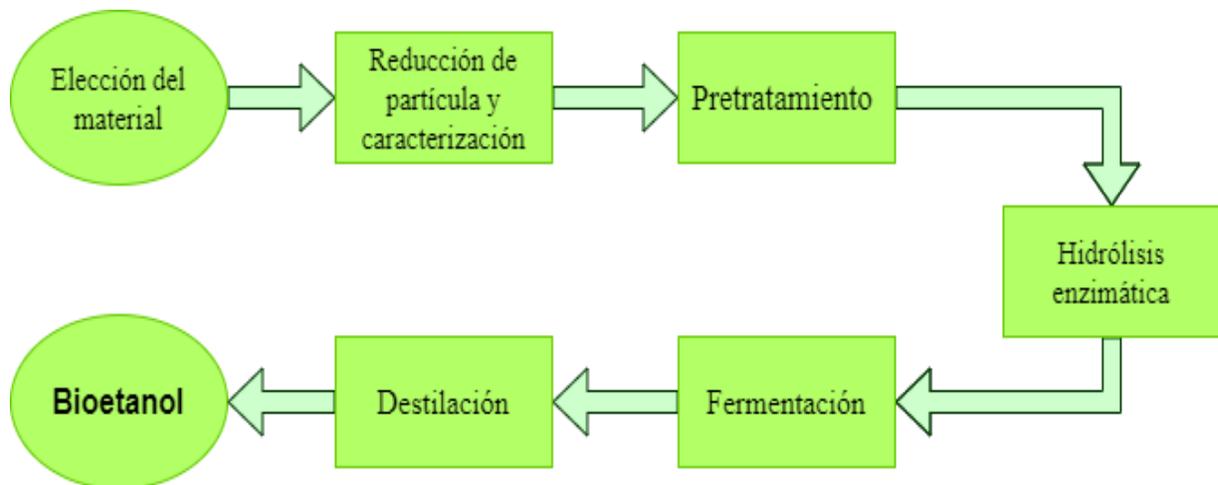


Figura 2. Pasos para la obtención de bioetanol de segunda generación.

#### 4.3.1. El material.

Una vez que el material fue elegido es necesario saber de qué está constituido para aprovechar al máximo los carbohidratos disponibles.

Los residuos lignocelulósicos están conformados principalmente por polisacáridos en diferente proporción, según la planta de la que se trate. En general la biomasa lignocelulósica tiene un bajo contenido de minerales y humedad (Haghighi, y otros, 2013).

En varios artículos (Haghighi *et al.*, 2013; Hu & Ragauskas, 2012), se presenta la composición general de los materiales lignocelulósicos, siendo características importantes de los principales componentes, las siguientes:

**La celulosa** es el carbohidrato más abundante en plantas terrestres, es insoluble en agua, está compuesta por cadenas lineales que tienden a unirse para formar fibrillas por medio de puentes de hidrógeno.

**La hemicelulosa** es el segundo polisacárido más común en la naturaleza; es flexible, de forma irregular; está formada por una combinación de pentosas, como xilosa y arabinosa y de hexosas, como manosa, galactosa y glucosa.

**La lignina** es un polímero aromático sintetizado de precursores fenólicos; es relativamente hidrofóbica y está unida a la hemicelulosa mediante enlaces covalentes. Tiene una función estructural, forma parte de la pared celular y da rigidez a la misma, lo que actúa como una protección contra algunos insectos y previene el acceso de las enzimas hacia los carbohidratos contenidos dentro de la planta.

La figura 3 muestra los componentes del material lignocelulósico.

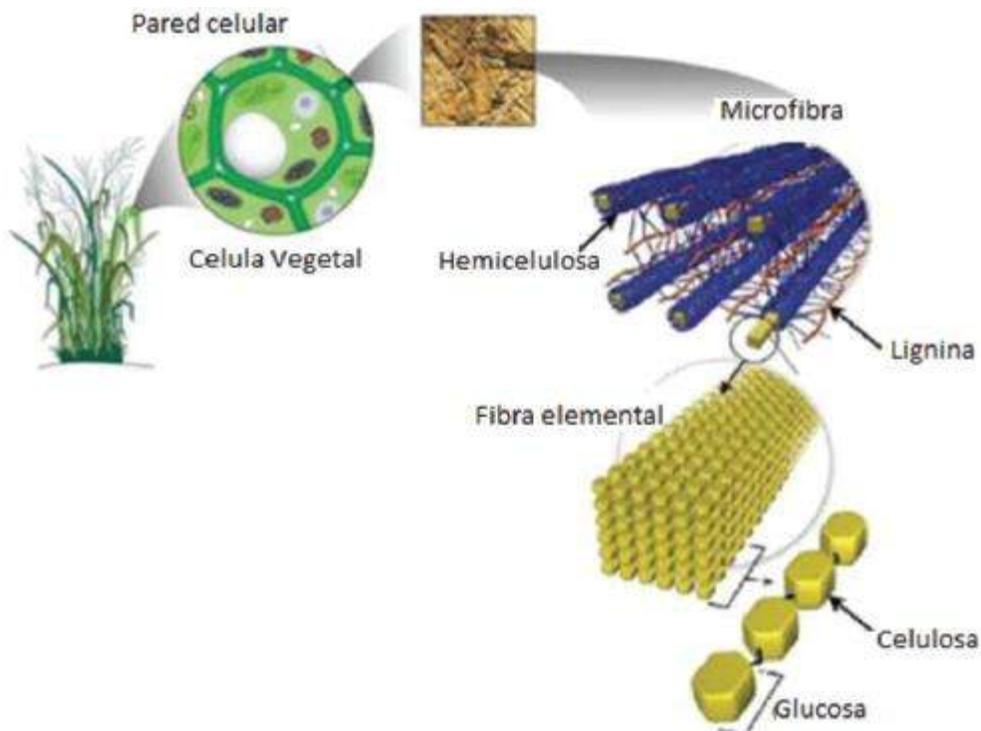


Figura 3. Composición del material lignocelulósico  
Fuente: Autor desconocido. Tomado de <http://dx.doi.org/10.15332/iteckne.v16i1.2158>

#### 4.3.2. Pretratamiento.

Es necesario someter el material a un pretratamiento para romper la estructura de la lignina y facilitar la exposición de la celulosa y hemicelulosa a las enzimas durante la hidrólisis (Hu & Ragauskas, 2012), como se observa en la figura 4.

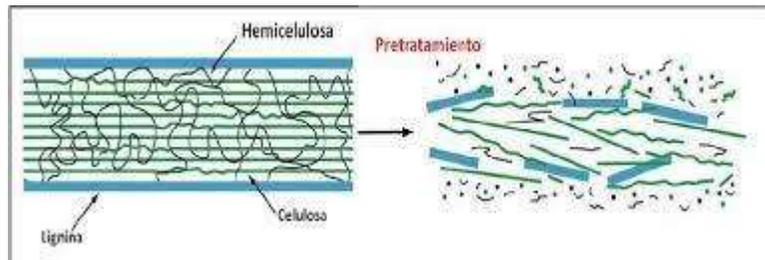


Figura 4. Esquema del cambio en la estructura del material lignocelulósico debido al pretratamiento.  
Fuente: S. Juri (2011)

Existen distintos pretratamientos que permiten la exposición de la celulosa y hemicelulosa para continuar el proceso de obtención de bioetanol. Dichos

pretratamientos son clasificados, según (Haghighi, y otros, 2013), de la siguiente manera:

- **Pretratamientos físicos**, consisten en maximizar el área de contacto de la biomasa por medio de la molienda o trituración para obtener partículas pequeñas.
- **Pretratamientos químicos**, rompe los enlaces internos de la biomasa permitiendo el paso de las enzimas hacia los carbohidratos.
- **Pretratamientos biológicos**, utiliza microorganismos degradadores de lignina, posibilitando el paso de las enzimas.
- **Pretratamientos fisicoquímicos**, son una combinación de los pretratamientos físicos y químicos. Son muy comunes ya que presentan diferentes ventajas frente a los pretratamientos puros.

Usualmente se utilizan pretratamientos combinados ya que suelen tener una alta eficiencia, al disminuir costos o tiempo.

En la siguiente tabla se mencionan y describen superficialmente algunos de los pretratamientos para biomasa lignocelulósica.

**Tabla 1. Métodos de pretratamiento**

<b>Método</b>	<b>Descripción</b>
Conminución	Trituración o molienda del material lignocelulósico por medio de molinos.
Pirólisis	Degradación de la biomasa por medio de la elevación de la temperatura en ausencia de oxígeno.
Extrusión	Sometimiento del material a altas temperaturas, mezclado y cizallamiento.
Microondas	Se sumerge el material en reactivos químicos y se somete a microondas durante un tiempo determinado.
Ozonólisis	Consiste en aplicar ozono que burbujea a través del material, normalmente este pretratamiento se lleva a cabo a temperatura y

	presión ambiente.
Ácido diluido	Se agrega ácido diluido (de 0.75 a 5%) a la biomasa y se somete a alta temperatura (desde 120°C hasta 200°C) y presión. Puede utilizarse H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl o HNO <sub>3</sub> .
Ácido concentrado	Se agrega ácido concentrado (de 10 a 30% aproximadamente) al material lignocelulósico y se somete a temperaturas entre 170°C a 190°C.
Hidrólisis alcalina	Se utilizan soluciones alcalinas comúnmente hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio. El tiempo de la reacción puede variar según la presión y temperatura que sean implementadas.
Delignificación oxidativa	Se trata el material con Peróxido de Hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), la meta es reducir la cristalinidad celulósica. Los resultados pueden variar según la concentración y tiempo de residencia. Usualmente se utiliza H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 2% a 20°C durante 8 horas.
Oxidación húmeda	Es necesario un catalizador, que puede ser oxígeno o aire, comúnmente se inyecta a presiones entre 10 y 12 bar a temperaturas de 170°C a 200°C por un tiempo de 10 o 15 minutos. Se pueden adicionar cantidades pequeñas de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> para acelerar el proceso.
Proceso organosolv	Para solubilizar la lignina este proceso requiere de un solvente orgánico (metanol, etanol, acetona, etileno glicol o alcohol tetrahidrofurfural) y comúnmente la adición de un catalizador ácido inorgánico como HCl o H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a temperaturas alrededor de los 180°C.
Líquidos iónicos	Los líquidos iónicos son utilizados como solventes para disolver carbohidratos y lignina.
Explosión a vapor	Es un pretratamiento común en el cual el material lignocelulósico es sometido a vapor saturado a una temperatura entre 160 y 260°C, seguido de una súbita disminución de la presión, provocando una despresurización explosiva. El tiempo durante el cual es sometido varía de algunos segundos hasta algunos minutos. La explosión provoca una ruptura en las fibras del material además de que hay indicios de que sucede una autohidrólisis por las pequeñas cantidades de ácido contenido en el material y el vapor.
Agua caliente	Este pretratamiento se utiliza para despolimerizar la hemicelulosa de la biomasa lignocelulósica, mediante agua líquida entre 160 y 240°C en periodos de 1 hasta 46 minutos aproximadamente. Esto se logra debido a una hidrólisis ya que al agua actúa como un ácido débil.
Explosión con amoníaco diluido (AFEX)	Se asemeja a la explosión de vapor, sin embargo, el catalizador utilizado es amonio líquido (2 kg de amonio/ kg de biomasa seca), a alta presión (aproximadamente 3 MPa) a temperaturas entre 60 y 100°C para posteriormente ser despresurizado súbitamente. Este proceso provoca la ruptura física en la estructura del material lignocelulósico. Es necesaria la recuperación del amonio.
Explosión de CO <sub>2</sub>	El proceso de delignificación del material se lleva a cabo utilizando CO <sub>2</sub> en solución acuosa como catalizador, se eleva la presión para después liberarla rápidamente. Se utiliza de forma gaseosa como un fluido supercrítico,

	promoviendo la remoción de lignina. Se utilizan, usualmente, 4 kg de CO <sub>2</sub> / kg de biomasa seca.
Hongos o también llamado biopulpeo en la industria papelera	Los hongos son agentes de descomposición de materia y gran variedad de estos son capaces de producir enzimas degradantes de lignina, hemicelulosa y algunos tipos de azúcares.

Fuente: Elaboración propia

### 4.3.3. Hidrólisis enzimática o sacarificación.

La sacarificación fracciona la celulosa por medio de enzimas (figura 5), simplificando los carbohidratos para mejorar el rendimiento de la fermentación (Villar, 2012).

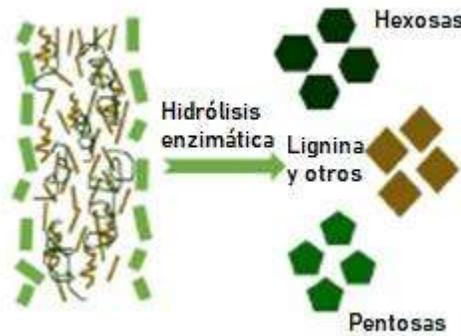


Figura 5. Esquema del cambio en el material pretratado después de la hidrólisis enzimática.

Fuente: A. Navarrete (2016)

Materiales tan complejos como los residuos lignocelulósicos no pueden ser hidrolizados por una sola enzima. Se requiere al menos de tres enzimas (Monteiro Machado, 2010). Existen empresas que han desarrollado cocteles enzimáticos comerciales que se han modificado para aumentar la eficiencia de conversión de carbohidratos, disminuyendo el costo de la obtención del bioetanol, el consumo de reactivos químicos y la contaminación ambiental (Novozymes, 2017).

La hidrólisis enzimática ha sido investigada y utilizada en la producción de bioetanol de segunda generación u otros bioproductos usando distintos tipos de biomasa lignocelulósica, por ejemplo el bagazo de agave, (Vargas-Tah, y otros, 2017);

residuos de palma datilera, (Alrumman, 2016); paja de trigo, (Bellido, 2013); hoja y cogollos de caña de azúcar, (Salcedo, López, & Flórez, 2011); entre otros.

#### **4.3.4. Fermentación.**

La fermentación es un paso insustituible para la obtención de bioetanol. Es el proceso en el que los azúcares son degradados en alcohol y dióxido de carbono mediante la inoculación de microorganismos (Vázquez & Dacosta, 2007).

Algunos de los microorganismos y bacterias más conocidos y utilizados al momento de la fermentación son *Saccharomyces cerevisiae* y *Zimomonas mobilis* que son capaces de fermentar la fracción celulósica conformada de hexosas; sin embargo, la hemicelulosa está formada por hexosas y pentosas. Para aumentar la viabilidad de la producción de bioetanol es necesario utilizar todos los azúcares producidos en la hidrólisis (Monteiro Machado, 2010).

Es común que se separen la fracción celulósica de la hemicelulósica al momento de la fermentación, para así utilizar dos microorganismos distintos, pero esto compromete la viabilidad económica.

Existen varios obstáculos para fermentar las pentosas como la xilosa, ya que muchas de las bacterias capaces de fermentar son muy sensibles a los compuestos inhibidores que se producen durante los procesos anteriores a la fermentación, o tienen un bajo rendimiento debido a la alta cantidad de subproductos. Por esta razón se han buscado distintas opciones como:

**Fermentación en Co-cultivo**, en donde se utilizan dos microorganismos distintos para fermentar glucosa y xilosa, sin embargo, la velocidad de fermentación de la glucosa es más rápida, por lo que el etanol producido

puede inhibir al microorganismo más lento y la fermentación de xilosa termina teniendo un rendimiento muy bajo o incluso nulo.

**Fermentación Secuencial**, en la que se utiliza una cepa que es capaz de fermentar xilosas en la primera fase seguida de la fermentación de la glucosa con otro microorganismo, comúnmente *S. cerevisiae* (Monteiro Machado, 2010).

Distintas investigaciones se han centrado a desarrollar cepas de microorganismos que sean capaces de fermentar tanto las hexosas como las pentosas y que sean cada vez más resistentes a las condiciones dentro del reactor, como los componentes inhibidores. Como se cita en (Fernandez-Sandoval, y otros, 2012).

Uno de estos microorganismos modificados por ingeniería genética es *Escherichia coli* MS04, en cuyo diseño se interrumpieron algunas rutas metabólicas redireccionando el carbón hacia la producción de etanol por medio de rutas etanológicas de *Zymomonas mobilis* (Fernandez-Sandoval, y otros, 2012).

En un estudio relativamente antiguo, llamado *Ethanol production from Jackfruit seed*, se investigó la posibilidad de obtener bioetanol a partir de las semillas frescas de yaca. En este trabajo la biomasa fue molida y pretratada con ácido clorhídrico. Se agitaron y calentaron las muestras durante 2 y 4 horas, posteriormente fueron neutralizadas, filtradas y analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC por sus siglas en inglés. Para la fermentación se utilizaron *Saccharomyces cerevisiae* (Samah, Siais, & Tapsir, 1998).

#### 4.4. Estudios relacionados.

Existen muy pocos estudios reportados en donde se utilicen los residuos de yaca como material lignocelulósico para la producción de biocombustibles de segunda generación. Uno de ellos es la investigación de (Bandari, Panchapakesan, Shankar, & Kumar, 2013) llamado *Production of bioethanol from fruit rinds by saccharification and fermentation* en el cual se recuperan los azúcares presentes en las cáscaras secas y pulverizadas de melón, sandía, piña y yaca mediante un proceso de sacarificación utilizando *Trichoderma viride*, a temperatura ambiente por 144 h. Este estudio reportó que tras la sacarificación se obtuvieron 10.28 mg/ml en los hidrolizados de las cáscaras de Yaca, ligeramente mayor que en los hidrolizados de las cáscaras de piña, melón y sandía de cuyas concentraciones fueron 10.18 mg/ml, 7.43 mg/ml y 4.16 mg/ml, respectivamente. Los hidrólizados fueron filtrados y llevados a fermentación mediante *Saccharomyces cerevisiae* a temperatura ambiente por 96 h tras lo cuál se obtuvieron 4.64 g/l de la fermentación de yaca y 4.38 g/l, 3.08g/l y 1.89 g/l de las fermentaciones de piña, melón y sandía, respectivamente.

La investigación de (Ginting, Irvan, Misran, & Maulina , 2020) llamada *Potential of durian, avocado, and jackfruit seed as raw material of bioethanol: A review*. Presenta la producción de bioetanol a partir de semillas de jaca y aguacate, extrayendo el almidón de las semillas frescas que posteriormente es sacarificado mediante enzimas  $\alpha$ -amilasa y fermentada usando *Saccharomyces cerevisiae* y se reporta haber obtenido 18.98% de nivel de alcohol después de 144 horas.

No hay artículos que reporten el uso de los residuos de yaca juntos (cáscara, pétalos y semillas) como biomasa para la generación de bioetanol de segunda generación.

## **5. Justificación.**

Actualmente una de las mayores preocupaciones a nivel global es la contaminación ambiental y el impacto que tienen las actividades humanas en el medio ambiente. Se han estudiado y propuesto maneras de reducir ese impacto: una de ellas es el desarrollo sostenible, que se define como “la satisfacción de las necesidades de la generación presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades”; como se cita por la Organización de las Naciones Unidas (ONU, s.f.).

El paso de energías convencionales a energías renovables, mejor conocida como “transición energética”, es una de las estrategias para lograr un desarrollo sostenible y mitigar la contaminación generada por el sector energético.

Aunque cada día es más común escuchar acerca de *energías limpias*, en muchas ocasiones dicho término solo se relaciona con la generación de electricidad, dejando de lado o dándole menor difusión a los biocombustibles.

Es necesario que la generación de biocombustibles sea adaptada a la región, por lo que es importante estudiar distintos materiales como materia prima, considerando la disponibilidad de material, si se compite con otro sector por el producto primario, si es viable económicamente, entre otras cosas.

La yaca es una fruta que no se aprovecha al 100%, puesto que solo se consume la pulpa, que representa aproximadamente el 25% del peso total del fruto (Aguilar

López, 2018), por lo que el 75% desechado puede utilizarse para generar productos de valor agregado como el bioetanol de segunda generación.

Un estudio anterior del equipo de investigación (Aguilar López, 2018), encontró las condiciones de pretratamiento que permiten la recuperación de azúcares presentes en la fracción hemicelulósica de la biomasa lignocelulósica de yaca. Sin embargo, el material todavía tiene azúcares en su estructura que pueden ser recuperados mediante una sacarificación, para posteriormente realizar una fermentación y obtener bioetanol de segunda generación.

## **6. Hipótesis**

La hidrólisis enzimática del material lignocelulósico de yaca pretratado por el método de ácido diluido con  $H_2SO_4$ , permitirá recuperar los azúcares monoméricos como la glucosa presente en la celulosa y una pequeña cantidad de xilosa de la fracción hemicelulósica que no fue hidrolizada durante el pretratamiento termoquímico. Secuencialmente, los azúcares recuperados pueden llevarse a fermentación para obtener bioetanol de segunda generación.

## **7. Objetivos**

### **7.1 Objetivo general**

Producir bioetanol de segunda generación a partir de los residuos lignocelulósicos de yaca (*Artocarpus heterophyllus*) pretratados bajo el método de ácido diluido.

### **7.2 Objetivos particulares**

- Caracterizar el material después del pretratamiento.
- Someter el material pretratado a sacarificación.

- 
- Caracterizar el material después de la hidrólisis enzimática.
- Fermentar con la cepa de *E. coli* MS04 el hidrolizado del material lignocelulósico de yaca, obtenido por un proceso de pretratamiento por ácido diluido y sacarificación en forma secuencial.
- Cuantificar el etanol producido y calcular los parámetros cinéticos.

## 8. Metodología

### 8.1. Caracterización

En este trabajo se utilizó el protocolo *Laboratory Analytical Procedure* para la “Determinación de Carbohidratos Estructurales y Lignina de la Biomasa” sugerido por el *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) como guía para la caracterización del material.

Los pasos por seguir son los siguientes:

#### 8.1.1. Determinación de humedad

- 1) Se secaron 3 charolas de aluminio en la estufa durante 24 horas a una temperatura de 65°C.
- 2) Se retiraron las charolas directamente en un desecador y se dejaron enfriar al vacío.
- 3) Se pesaron las charolas en una báscula granataria y se registró el peso con una precisión de 0.1 mg.
- 4) Se pesaron  $500 \pm 10$  mg de muestra en cada charola.
- 5) Se dejaron secar las muestras durante 24 horas en la estufa a 65°C.

- 6) Se retiraron las muestras directamente en el desecador y se dejó enfriar al vacío.
- 7) Se pesaron las muestras en una báscula granataria y se registró el peso con una precisión de 0.1 mg.
- 8) Se obtuvo el porcentaje de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \left( \frac{\text{PCMC} - \text{PCCH}}{\text{PM}} \right) 100$$

En donde:

PCMC: es el peso constante de la muestra y charola.

PCCH: es el peso constante de la charola

PM: es el peso de la muestra húmeda

#### **8.1.2. Determinación de cenizas**

- 1) Se pusieron a secar 3 crisoles en la mufla por un mínimo de 4 horas a una temperatura de 575°C.
- 2) Se retiraron los crisoles directamente en un desecador y se dejaron enfriar al vacío.
- 3) Se pesaron los crisoles y registró el peso en una báscula granataria con precisión de 0.1 mg.
- 4) Se pesaron 300 ± 10 mg de muestra en cada uno de los crisoles y se dejaron calcinar en la mufla durante 24 ± 6 horas a una temperatura de 575°C.

- 5) Se retiraron los crisoles directamente en un desecador y se dejaron enfriar al vacío.
- 6) Se registró el peso de los crisoles con las cenizas y se determinó el porcentaje de cenizas con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Cenizas} = \left( \frac{\text{PCCC} - \text{PCC}}{\text{ODW}} \right) 100$$

En donde:

PCCC: es el peso constante del crisol y las cenizas.

PCC: es el peso constante del crisol.

ODW: es el peso seco de la muestra.

### **8.1.3. Cuantificación de azúcares estructurales**

1. Se pesaron  $300 \pm 10$  mg de muestra, considerando el porcentaje de humedad, en un tubo rosca.
2. Se agregaron 3 ml de ácido sulfúrico a una concentración del 72% a la muestra y se agitó el tubo durante 1 minuto por medio de un Vortex.
3. Se colocó el tubo en un baño de agua a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora y se agitó el tubo cada 5 minutos en el Vortex para garantizar que la muestra este bien mezclada.
4. Al retirar del baño de agua, se cambió la muestra a un frasco con rosca y se agregaron 84 ml de agua destilada para diluir la concentración hasta un 4%.

5. Se colocó el frasco con la muestra en la autoclave a 121°C durante una hora.
6. Una vez que la muestra se enfrió y alcanzó la temperatura ambiente, se filtró al vacío.
7. Se tomó una alícuota de 3 ml del líquido filtrado y se agregó carbonato de calcio hasta alcanzar un pH entre 4 y 5.
8. Se preparó la muestra para analizarse por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) filtrando a 0.2 µm. La muestra neutralizada puede guardarse en refrigeración durante un máximo de 2 semanas.

Las caracterizaciones se llevaron a cabo con el protocolo que sugiere la NREL, de igual manera, en la cuantificación de carbohidratos estructurales se utilizaron las ecuaciones presentes en dicho protocolo.

Para determinar el porcentaje de pentosas, xilanos y arabinanos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{Azúcares} = \frac{(C_{\text{HPLC}}) \left(\frac{132}{150}\right) (V_{\text{fil}}) \left(\frac{1}{1000}\right)}{\text{ODW}} \times 100$$

Donde:

% Azúcares: es el porcentaje de arabinanos o xilanos en el material.

$C_{\text{HPLC}}$ : es la concentración obtenida del cromatógrafo.

132/150: es una corrección para pentosas.

$V_{\text{fil}}$ : es el volumen filtrado= 86.73

ODW: es el peso seco del material.

Para determinar glucanos, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Glucanos} = \frac{(C_{\text{HPLC}}) \left(\frac{162}{180}\right) (V_{\text{fil}}) \left(\frac{1}{1000}\right)}{\text{ODW}} \times 100$$

Donde:

% Glucanos: es el porcentaje de glucanos en el material.

C<sub>HPLC</sub>: es la concentración obtenida del cromatógrafo.

162/180: es una corrección para hexosas.

V<sub>fil</sub>: es el volumen filtrado= 86.73.

ODW: es el peso seco del material.

Nota: se realizó triplicado de la cuantificación de azúcares estructurales al igual que de la determinación de humedad y porcentaje de cenizas.

#### **8.1.4. Cuantificación de lignina insoluble**

- 1) Se cortó papel filtro del tamaño del embudo Büchner de porcelana, se secó en una estufa y se registró el peso constante.
- 2) Una vez que se sacó la muestra del autoclave se filtró, sobre el papel filtro, para retener los sólidos insolubles en ácido.
- 3) Se tomó muestra del líquido para ser analizada posteriormente.
- 4) Con ayuda de agua destilada se pasaron al papel filtro todos los sólidos restantes en el frasco.
- 5) Se neutralizó el papel filtro y el sólido de la muestra con agua destilada, hasta tener el mismo pH del agua.
- 6) Se llevó a peso constante en una estufa a 105°C durante al menos cuatro horas.

- 7) Se retiró el filtro directamente en un desecador y se dejó enfriar al vacío.
- 8) Se pesó en una báscula granataria y se registró el peso.
- 9) El porcentaje de lignina insoluble se determinó por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lignina insoluble} = \left( \frac{\text{PFMC} - \text{PFC}}{\text{ODW}} \right) 100$$

En donde:

PFMC: es el peso constante del filtro y la muestra.

PFC: es el peso constante del filtro.

ODW: es el peso seco de la muestra.

Nota: se determinó lignina insoluble en cada una de las muestras.

#### **8.1.5. Lignina soluble**

- 1) Se tomó una alícuota del líquido filtrado para cuantificación de azúcares estructurales.
- 2) En un espectrofotómetro UV se midió la absorbancia de la muestra en la longitud de onda de 320 nm.
- 3) Se diluyó la muestra hasta obtener una lectura de absorbancia entre 0.7 y 1.0 y se registró la dilución y la absorbancia con tres decimales.
- 4) Se calculó la cantidad de lignina soluble con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ASL} = \left( \frac{(\text{UV}_{\text{abs}})(\text{Volúmen})(\text{Dilución})}{\epsilon (\text{ODW})(\text{grosor de celda})} \right) 100$$

Donde:

%ASL: es el porcentaje de lignina soluble en ácido.

$UV_{abs}$ : es Absorbancia de la muestra a 320 nm.

Volúmen: es el volumen filtrado= 86.73 ml.

Dilución: es la dilución hecha a la muestra para que la lectura quede dentro de rango.

$\epsilon$ : es la absorbancia de la biomasa (25) a una longitud de onda específica.

ODW: es el peso seco de la muestra.

## **8.2. Pretratamiento por hidrólisis ácida**

Para el pretratamiento realizado en este trabajo tomó la propuesta de las condiciones y procedimiento, que presenta el M.C. Emmanuel Alejandro Aguilar López en su investigación titulada *Uso integral de la yaca para la producción de licores y bioetanol de segunda generación*. El cual se describe a continuación:

1. Se pesaron 6 g de biomasa seca (sin humedad) y molida en un frasco de rosca.
2. Se agregaron 34 g de ácido sulfúrico, diluido al 2%, para obtener una relación de sólido/líquido de 15% w/w.
3. Se metieron las muestras a la autoclave a una temperatura de 127°C durante 10 minutos.
4. Se dejaron enfriar, hasta alcanzar la temperatura ambiente.
5. Se separó el sólido por medio de un filtro de tela y se neutralizó con agua destilada.
6. Se caracterizó el material sólido y se preparó el líquido para un análisis en cromatografía.

### 8.3. Sacarificación

Para comenzar la hidrólisis enzimática, se repitió la hidrólisis termoquímica hasta el paso 4 y posteriormente se siguieron los pasos descritos a continuación.

- 1) Una vez teniendo los frascos de material pretratado se ajustó el pH a 4.8-5.0 con hidróxido de potasio 4N, en la campana de esterilidad para evitar que las muestras se contaminaran.
- 2) Se trasvasaron las muestras a matraces de 250 ml.
- 3) Se adicionó citrato de sodio hasta tener una concentración de 50 mMol, que actúa como buffer para mantener estable el pH durante la sacarificación.
- 4) Se agregaron los cocteles enzimáticos CTec3 y HTec3 en cada una de las muestras. El distribuidor de dichos cocteles recomienda una carga de enzimas de 0.1 g de HTec3 y 6 g de CTec3 por cada 100 g de células (Novozymes, 2017).

Se realizó un triplicado de enzima por gramo de glucano y adicionalmente se analizó un triplicado en donde se aplicó enzima por gramo de material sólido.

- 5) Los matraces fueron puestos en un baño de agua a 50°C en un agitador orbital marca polyscience, a una velocidad de agitación de 150 rpm, durante 48 horas.
- 6) Se tomaron muestras cada 0, 4, 8, 12, 24, 30, 34 y 48 de la siguiente manera:
  - a) En el área de esterilidad, detrás del mechero, con una micropipeta y puntas cortadas estériles, se tomó aproximadamente 1 ml de muestra y se depositó en un tubo Eppendorf.
  - b) El matraz se regresó inmediatamente al baño de agua.
  - c) Los tubos Eppendorf con la muestra, se llevan a agua hirviendo durante 10 minutos para inactivar la enzima.

- a) Después de retirarlos del agua son centrifugados por 6 minutos a 13,300 rpm.
  - d) Se trasvasó el líquido a un Eppendorf limpio y se llevó a congelación.
  - e) Una vez teniendo todas las tomas de muestra, se descongelaron, se agitaron por medio de vortex y se centrifugaron nuevamente.
  - f) Se realizaron las diluciones correspondientes.
  - g) Se filtró cada muestra con un filtro milipore de 0.2  $\mu\text{m}$  directamente en viales de cristal para cromatografía.
- 7) Se traspasaron los hidrolizados a tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron para separar la fase sólida de la líquida.
- 8) La fase sólida fue neutralizada con agua destilada y se realizó una caracterización del material.

## **8.4. Fermentación**

Para la fermentación fue necesario replantar el microorganismo fermentador para que creciera y así inocularlo en los experimentos de fermentación, de los cuales se hicieron 2 diferentes, cada uno por triplicado.

El primero consistió en hacer la fermentación en un hidrolizado simulado, con una concentración de azúcares iniciales comparable a los hidrolizados reales y el segundo experimento se basa en acondicionar los hidrolizados de yaca y fermentarlos con *E. coli* MS04.

### **8.4.1. Crecimiento del microorganismo fermentador**

El microorganismo fermentador utilizado en este trabajo fue *E. coli* MS04 el cual se encontraba en refrigeración en medio LB, por lo que fue necesario crecer la cepa.

- 1) En esterilidad, con un asa se resembró la cepa en cajas Petri con medio LB y se incubó a 37°C.
- 2) Una vez que creció la cepa se inoculó en un matraz con medio LB y se puso en un baño de agua a 37°C en un agitador orbital marca *polyscience* por un tiempo aproximado de 7 horas.
- 3) Se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro a 600 nm y con un blanco de medio LB sin inocular.
- 4) Se realizó el preinóculo de las bacterias en un matraz con medio mineral MA1 para adaptarlas al medio.
- 5) Se midió densidad óptica en un espectrofotómetro a 600 nm y se calculó cuantos mililitros serían necesarios para inocular los hidrolizados con una carga de células de 0.1 DO de la siguiente manera:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{V_2C_2}{C_1} = \frac{(0.1DO)(160ml)}{2.38DO} = 6.72ml$$

- 6) En tubos Falcon de 50 ml se centrifugaron 7 mililitros del medio AM1 con la bacteria *E. coli* MS04 con una densidad óptica de 2.38.
- 7) Se separó el líquido y se dejaron en los tubos solo las células sólidas.

#### **8.4.2. Hidrolizados simulados**

Se realizó una prueba en la cual se prepararon y fermentaron hidrolizados simulados en medio mineral AM1 y carbohidratos a la concentración de azúcares obtenidos en la primera hidrólisis enzimática siguiendo los pasos a continuación:

- 1) Se preparó medio AM1.

Este medio mineral se realizó de la siguiente manera:

- Se taró con agua destilada un frasco de vidrio con tapa de rosca al volumen deseado (500 ml).
- Se agregaron los azúcares correspondientes para igualar la concentración de azúcares en los hidrolizados reales (31.8 g de glucosa y 20.53 g de xilosa).
- Se agregaron aproximadamente 100 ml de agua destilada, para disolver los azúcares.
- Se esterilizó el frasco con el agua y los azúcares, en autoclave a 121°C por 20 minutos.
- En campana de esterilidad y mecheros de alcohol se agregaron las sales en la cantidad y orden que se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Orden y cantidad de sales para 500ml de medio mineral AM1

<b>Sal</b>	<b>Volumen</b>
Fosfatos (10x)	50 ml
Citrato (50 g/l)	0.5 ml
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (1M)	750 µl
Elemento traza	750 µl
KCl (2M)	0.5 ml
Betaína HCl (1M)	0.5 ml
Kanamicina 30	0.5 ml

- 2) Se transfirieron a 3 matraces con tapa.
- 3) Se agregó *E. coli* MS04 suficiente para obtener una carga de células de 0.1 DO, para ello se utilizaron las células del paso 7 de la sección *Crecimiento del microorganismo fermentador*.

- 4) Se pusieron los matraces en un baño de agua a 37°C en un agitador orbital marca polyscience con una velocidad de agitación de 130 rpm.
- 5) Se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 30, 36 y 48 horas de la siguiente manera:
  - i) En el área de esterilidad, detrás del mechero, con una micropipeta, se tomaron aproximadamente 750 µl de muestra y se depositaron en un tubo Eppendorf.
  - ii) El matraz se regresó inmediatamente al baño de agua.
  - iii) Los tubos Eppendorf con la muestra fueron centrifugados por 6 minutos a 13,300 rpm, tan pronto como fue posible.
  - iv) Se transfirió el líquido a tubos Eppendorf limpios y se pusieron en congelación para ser analizados por HPLC posteriormente.
  - v) Cuando se tuvieron todas las tomas de muestra, se descongelaron y centrifugaron nuevamente.
  - vi) Se realizaron las diluciones correspondientes.
  - vii) Se filtraron las muestras con un filtro milipore de 0.2 µm directamente en viales de vidrio para cromatografía.

Al mismo tiempo se tomaron muestras para determinar densidad óptica en la muestra de la siguiente manera:

- En el área de esterilidad, detrás del mechero, con una micropipeta, se tomaron los microlitros necesarios de muestra y se depositaron en una celda para espectrofotómetro con el agua destilada necesaria para que la muestra quedara dentro del rango.

- El matraz se regresó inmediatamente al baño de agua.
  - Se agitó la muestra por medio de un agitador vortex.
  - Se midió la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro a 600 nm y con un blanco de agua destilada.
  - Se multiplicó el resultado por el factor de dilución y se obtuvo la densidad óptica de los hidrolizados simulados.
6. Se calcularon los parámetros cinéticos de la fermentación de los hidrolizados simulados con las fórmulas que se presentan a continuación.

**Rendimiento de la fermentación:**

$$Y = \frac{\text{Conc. producto}_{\text{final}} - \text{Conc. producto}_{\text{inicial}}}{\text{Azucares}_{\text{iniciales}} - \text{Azucares}_{\text{finales}}}$$

**Velocidad de producción:**

$$Q = \frac{\text{Conc. producto}_{\text{final}} - \text{Conc. producto}_{\text{inicial}}}{t_{\text{final}} - t_{\text{inicial}}}$$

**Rendimiento por gramo de bacterias:**

$$Y_{P/B} = \frac{\text{Conc producto}_{\text{final}} - \text{Conc producto}_{\text{inicial}}}{\text{Bio}_{\text{final}} - \text{Bio}_{\text{inicial}}}$$

**Velocidad específica de producción:**

$$q = \frac{\text{Conc producto}_{\text{final}} - \text{Conc producto}_{\text{inicial}}}{(\text{Conc MSO4}_{\text{final}} - \text{Conc MSO4}_{\text{inicial}})(t_{\text{final}} - t_{\text{inicial}})}$$

### 8.4.3. Hidrolizados reales

Para la fermentación de los hidrolizados de yaca se repitieron la hidrólisis termoquímica y la hidrólisis enzimática, respectivamente, para contar con el material necesario, sin embargo, la sacarificación fue llevada a cabo en un agitador marca *Julabo* modelo *SW22* y en los mismos frascos de rosca en los cuales se realizó el pretratamiento como se puede apreciar en la figura 6.



Figura 6. Sacarificación en frascos de rosca para llevar a fermentación

Una vez teniendo el material hidrolizado se siguieron los siguientes pasos para tener un triplicado:

- 2) Se neutralizaron los hidrolizados con hidróxido de amonio  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta alcanzar un pH de 7.
- 3) Se transfirieron 4 hidrolizados a cada matraz y se agregaron:
  - 4 ml de fosfatos.
  - 40  $\mu\text{l}$  de citrato.
  - 60  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
  - 60  $\mu\text{l}$  de elemento traza.
  - 40  $\mu\text{l}$  de cloruro de potasio.

- 40 µl de betaína.
  - 160 µl de kanamicina.
- 4) Se comenzó la fermentación con una concentración de azúcares totales aproximada de 74 g/l, después de agregar el hidróxido de amonio y las sales en solución.
  - 5) Se agregó *E. coli* MS04 suficiente para obtener una carga de células de 0.1 DO, para ello se utilizaron las células del paso 7 de la sección *Crecimiento del microorganismo fermentador*.
  - 6) Se pusieron los matraces en un baño de agua a 37°C en un agitador orbital marca *polyscience* a una velocidad de agitación de 130 rpm.
  - 7) Se monitoreó el pH de los hidrolizados cada toma de muestra, y se ajusta el pH a 7 con KOH a 4N cada que sea necesario.
  - 8) Se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 30, 36 y 48 horas de la siguiente manera:
    - a) En el área de esterilidad, detrás del mechero y con una micropipeta, se tomó aproximadamente 1 ml de muestra y se depositó en un tubo Eppendorf.
    - b) El matraz se regresó inmediatamente al baño de agua.
    - c) Los tubos Eppendorf con la muestra fueron centrifugados por 6 minutos a 13,300 rpm. Tan pronto como fue posible.
    - d) Se transfirió el líquido a tubos Eppendorf limpios y se pusieron en congelación para ser analizados por HPLC posteriormente.
    - e) Cuando se tuvieron todas las tomas de muestra, se descongelaron, agitaron mediante vortex y centrifugaron nuevamente.
    - f) Se realizaron las diluciones correspondientes.

- g) Se filtraron las muestras con un filtro milipore de 0.2  $\mu\text{m}$  directamente a viales de vidrio para cromatografía.
- 9) Los parámetros cinéticos fueron calculados a partir de las fórmulas siguientes.

#### **Rendimiento de la fermentación:**

$$Y = \frac{\text{Conc. producto}_{\text{final}} - \text{Conc. producto}_{\text{inicial}}}{\text{Azucares}_{\text{iniciales}} - \text{Azucares}_{\text{finales}}}$$

#### **Velocidad de producción:**

$$Q = \frac{\text{Conc. producto}_{\text{final}} - \text{Conc. producto}_{\text{inicial}}}{t_{\text{final}} - t_{\text{inicial}}}$$

### **8.5. Técnicas analíticas**

Para medir las concentraciones de los diferentes compuestos de las muestras se utilizaron diferentes técnicas analíticas, las que fueron usadas con mayor regularidad fueron cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrofotometría.

#### **8.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

La cromatografía líquida de alta resolución permite separar los componentes de una muestra para que sean cuantificados.

El cromatógrafo utilizado en esta investigación es de la marca “Varían” modelo ProStar 410 (figura 7) con una columna Rezex ROA-Organic Acid H+ de 300 x 7.80 mm. La fase móvil utilizada fue  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 0.5 mN, con un flujo de 0.5 ml/min.



Figura 7. Cromatógrafo de líquidos Varían ProStar 410

Las muestras tienen que ser neutralizadas, centrifugadas, filtradas con un filtro milipore de 0.2  $\mu\text{m}$  y depositados en viales de vidrio (figura 8), para posteriormente acomodarlos en el carrusel (figura 9) y correr las muestras.

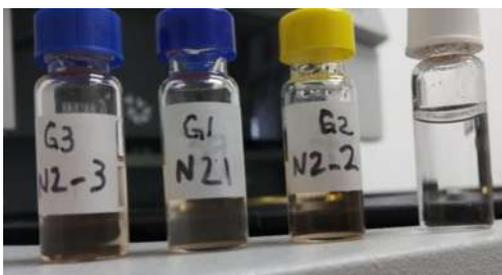


Figura 8. Viales de vidrio para HPLC



Figura 9. Carrusel del cromatógrafo

Una vez que las muestras están puestas en el carrusel, el cromatógrafo, por medio de una jeringa y con ayuda de la fase móvil, lleva la muestra a través de la columna.

Los compuestos son identificados con relación al tiempo de retención y las concentraciones se determinan de acuerdo con una curva estándar realizada con muestras de compuestos con concentraciones conocidas.

### 8.5.2. Espectrofotometría

La espectrofotometría permite medir la concentración de un compuesto, mediante la absorbancia de las ondas electromagnéticas a una determinada longitud de onda que presente la muestra.

El espectrofotómetro utilizado en esta investigación es de la marca JENWAY modelo 7305 (Figura 10).



Figura 10. Espectrofotómetro utilizado para medir densidad óptica y lignina soluble

Para determinar la concentración de los compuestos, la muestra es puesta en una celda especial (figura 11) y se configura el espectrofotómetro a los nanómetros adecuados para leer el compuesto.



Figura 11. Celda traslucida para espectrofotómetro

La densidad óptica, para determinar el crecimiento bacteriano, fue medida por medio de este espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm y utilizando un blanco de agua destilada.

Las muestras fueron diluidas con agua destilada cuando estaban muy concentradas para que quedaran dentro del rango.

## **9. Resultados y discusión**

En esta sección se presentan y discuten los resultados de los experimentos realizados.

### **9.1. Caracterizaciones**

La caracterización del material es muy importante, ya que de un inicio indica el potencial que tiene el material de interés para obtener compuestos y al realizar caracterizaciones después de cada fase experimental permite entender qué sucede durante cada proceso en el material y saber si se está logrando el objetivo.

#### **9.1.1. Material sin pretratar**

Se analizó el material sin pretratar y sin ningún procedimiento químico previo, lo que permite obtener una relación de aprovechamiento de los azúcares al final del proceso.

La caracterización del material sin pretratar se presenta en la gráfica (Figura 12), en la que se observa que hay una alta concentración de glucanos y xilanos, siendo estos los principales carbohidratos presentes en el material y como se esperaba, también está constituido por una alta cantidad de lignina.

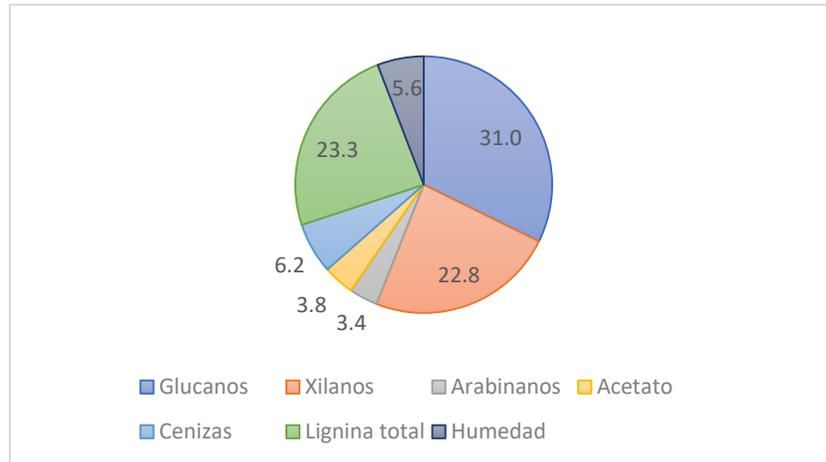


Figura 12. Composición del material lignocelulósico de yuca antes del pretratamiento

Debido a la composición del material, es posible decir, que hay un alto potencial para producir bioetanol al hidrolizar y fermentar los azúcares.

Más del 50% del material lignocelulósico de yuca son azúcares recuperables de la celulosa y hemicelulosa, que es una concentración alta si se compara con el 29.07% de la celulosa y 2.97% de hemicelulosa presentes en la cáscara de cacao (Loayza, 2020), y que está cerca de los parámetros de la hoja de caña de azúcar con un porcentaje entre 34 y 40 de celulosa y 23-26% de hemicelulosa o con el 33-34% de celulosa y 20-25% de hemicelulosa en las hojas de arroz como se cita en (Vergara, 2020). Esto indica que es un material con alto potencial para la producción de etanol.

### 9.1.2. Material después del pretratamiento

Para recuperar los azúcares fermentables es necesario realizar el pretratamiento, en este caso se pretrató el material con ácido diluido, después se realizó otra caracterización para conocer la composición del material sólido restante, que es presentado en la figura 13.

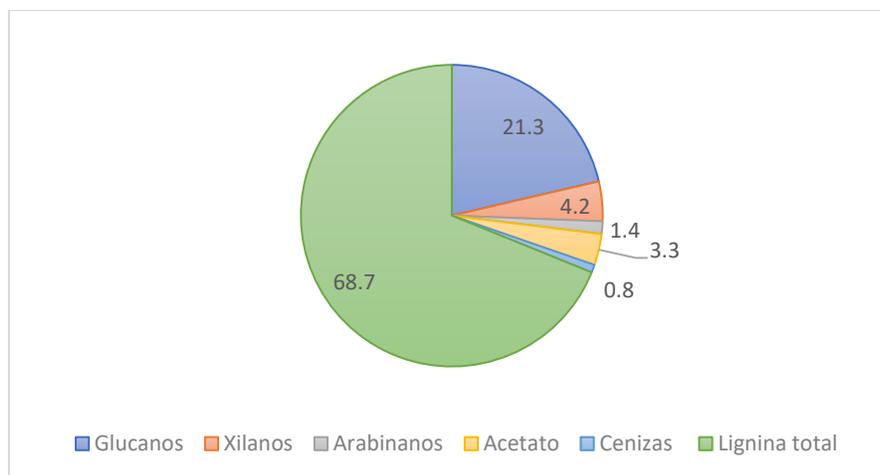


Figura 13. Composición del material lignocelulósico de yuca después del pretratamiento

De acuerdo con la concentración de glucanos (21.3%) y de xilanos (4.2%) que se observan en la figura 13, se puede determinar que los resultados son muy cercanos a los reportados en la investigación de la que se obtuvieron las condiciones para el pretratamiento (Aguilar López, 2018), confirmando que el procedimiento recomendado se realizó de manera correcta.

La tabla 3, permite comparar con mayor facilidad la diferencia en la composición del material antes y después del pretratamiento. Los glucanos disminuyeron casi un 10%, quedando 21.3% sin hidrolizar. Por otra parte, solo quedó 4.2% de xilanos sin hidrolizarse, con lo cual se determina que se eliminó la porción hemicelulósica del material que está compuesta principalmente por pentosas como la xilosa, dejando expuesta la celulosa y permitiendo el acceso de las enzimas, como se menciona en el artículo *Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry* (Hu & Ragauskas, 2012).

Tabla 3. Comparación de la composición del material antes y después del pretratamiento

	Material sin pretratamiento		Material pretratado	
	Promedio %	Desviación estándar ( $\sigma$ )	Promedio %	Desviación estándar ( $\sigma$ )
<b>Glucanos</b>	31.0	2.1401	21.3	0.7927
<b>Xilanos</b>	22.8	1.0245	4.2	0.6677
<b>Arabinanos</b>	3.4	0.1005	1.4	0.9576
<b>Acetato</b>	3.8	0.6372	3.3	0.1316
<b>Cenizas</b>	6.2	0.5407	0.8	0.0791
<b>Lignina total</b>	23.3	0.5736	68.7	1.0505
<b>Humedad</b>	5.6	0.1831	0.0	0.0000

Fuente: Elaboración propia

## 9.2. Sacarificación

Con base en los datos obtenidos durante las caracterizaciones del material, se advierte que es apropiado realizar una sacarificación para hidrolizar mediante enzimas la celulosa y la hemicelulosa remanente.

Si con la sacarificación se recuperaran el 100% de los azúcares que aún quedan en el material, se podrían obtener una concentración aproximada de 34.4 g/l de glucosa, 7.2 g/l de xilosa y 2.4 g/l de arabinosa, adicionales a los recuperados durante el pretratamiento termoquímico.

La hidrólisis enzimática se realizó con diferentes cargas de enzimas, una con carga de enzima por gramo de glucano y otra con carga de enzimas por gramo de material seco, reportándose las cinéticas de ambas en las figuras 14 y 15 respectivamente.

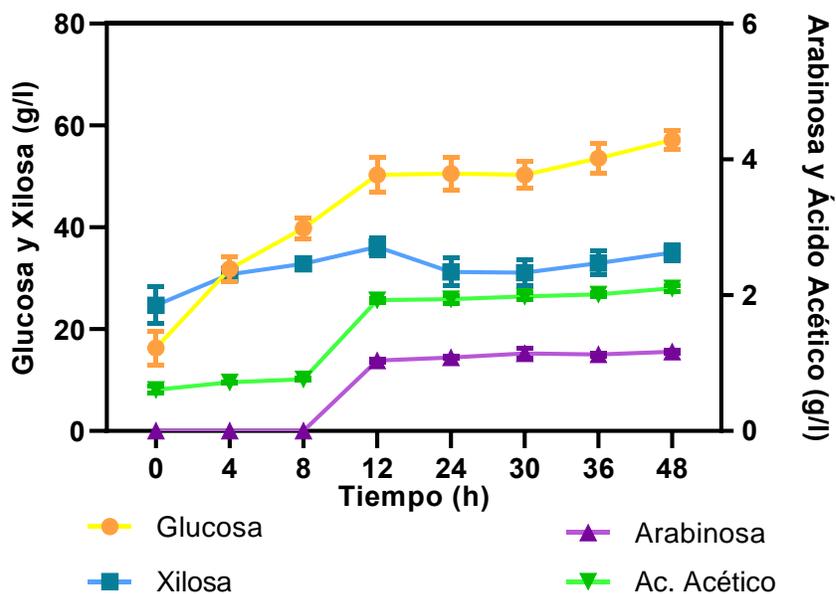


Figura 14. Cinética de sacarificación en experimento con carga de enzimas por gramo de glucano. Concentración de Glucosa y Xilosa en g/l respecto al eje Y izquierdo; concentración de Arabinosa y Ácido acético en g/l respecto al eje Y derecho.

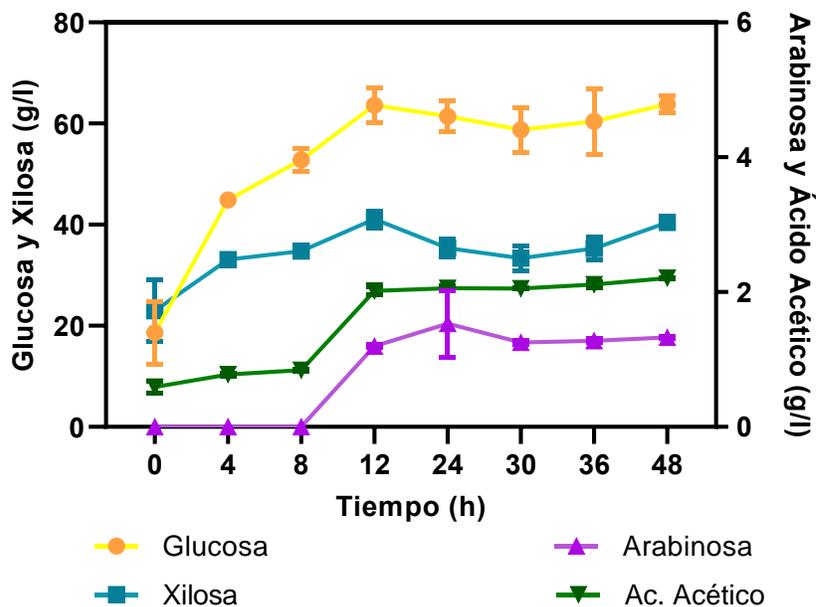


Figura 15. Cinética de sacarificación en experimento con carga de enzimas por gramo de material lignocelulósico seco. Concentración de Glucosa y Xilosa en g/l respecto al eje Y izquierdo; concentración de Arabinosa y Ácido Acético en g/l respecto al eje Y derecho.

Se puede observar que en ambos experimentos la concentración de carbohidratos aumentó conforme fue avanzando el tiempo, lo que indica que efectivamente el material se hidrolizó. Adicionalmente, el hecho de que haya una alta concentración de glucosa y xilosa (asociados al eje Y izquierdo) señala que tuvo una buena eficiencia.

Por otro lado, la concentración de ácido acético es muy baja (asociado al eje Y derecho), lo cual es beneficioso para la fermentación a continuación, ya que este compuesto es antagonista en el crecimiento de la bacteria *E. coli* MS04, que es el microorganismo fermentador en este trabajo.

De acuerdo con las gráficas, es posible determinar que, a partir de las 12 horas, ya no hay un aumento significativo en la concentración de azúcares fermentables, lo cual ayuda a establecer el tiempo adecuado para realizar la hidrólisis enzimática, en futuros experimentos, reduciendo así el consumo de energía.

La Tabla 4 facilita la comparación de ambos experimentos y se puede apreciar que en el experimento en el cual se aplicó enzima por cada gramo de glucano se obtuvo una concentración menor tanto de glucosa como de xilosa a comparación del experimento en el que se aplicó enzima por gramo de material, la diferencia del total de azúcares es de poco más de 10 g/l o también podría decirse que se tiene 10% más de azúcares en la sacarificación que tiene carga de enzima por gramo de material.

**Tabla 4. Comparación de las concentraciones finales de azúcares en sacarificaciones con distintas cargas de enzimas**

	Concentración final de azúcares en experimento de carga de enzima por gramo de glucano	Concentración final de azúcares en experimento de carga de enzima por gramo de material seco
Glucosa	57.13 g/l	63.8 g/l
Xilosa	35 g/l	40.4 g/l
Arabinosa	1.16 g/l	1.3 g/l
Total	93.29 g/l	105.5 g/l

Si se comparan las cinéticas de ambos experimentos en un gráfico (figura 16), se puede observar que a las 12 horas se alcanza el máximo de azúcares, después de dicho tiempo sigue aumentando la concentración, incluso la concentración total de azúcares en el experimento de carga enzimática por gramo de glucano a las 48 horas casi iguala la concentración del experimento de carga enzimática por gramo de material a las 12 horas, sin embargo, es necesario considerar el gasto energético para mantener la sacarificación durante 36 horas más, ya que prácticamente se cuadruplica el consumo eléctrico.

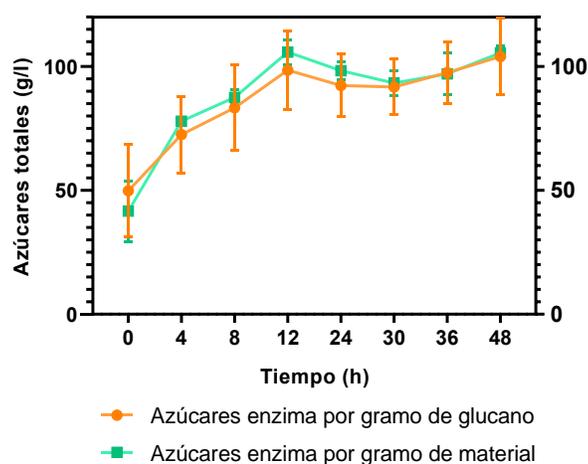


Figura 16. Cinéticas de azúcares totales en los experimentos “carga de enzima por gramo de material” y “carga de enzima por gramo de glucano”. “Azúcares totales” es la suma de Glucosa, Xilosa y Arabinosa.

También se realizó la caracterización del material sólido restante de los experimentos de sacarificación cuyos resultados se muestran en la tabla 5 y al analizarlos es posible observar que la sacarificación fue exitosa, ya que en el sólido quedaron muy pocos glucanos y xilanos, lo que indica que se hidrolizaron la mayoría de los azúcares.

**Tabla 5. Caracterización del sólido residual después de la sacarificación**

	Sólido residual de sacarificación con carga enzimática por gramo de glucano		Sólido residual de sacarificación con carga enzimática por gramo de material	
	%	$\sigma$	%	$\sigma$
Glucanos	3.7	0.27	0.4	0.13
Xilanos	2.1	0.27	0.6	0.53
Arabinanos	2.5	0.09	2.4	0.02
Acetato	2.4	0.08	2.3	0.11
Ceniza	3.3	0.28	3.7	0.10
Lignina	81.3	0.16	85.2	0.11

Durante la sacarificación con carga enzimática por gramo de glucano se hidrolizaron 90.8% de xilosa y 88.1% de glucosa máxima esperada, mientras que en la sacarificación con carga enzimática por gramo de material seco se hidrolizaron 98.7% de xilosa y 97.4% de glucosa máxima esperada, claramente el rendimiento de la hidrólisis enzimática en la que se aplicó el coctel enzimático por gramo de material seco fue más alta y es comparable, incluso ligeramente mayor, que el obtenido en un estudio en el cual se hidrolizó enzimáticamente rastrojo de maíz blanco pretratado con ácido diluido mediante el coctel NS22086 de la empresa Novozymes, en donde se recuperaron 98.2% de la xilosa y 92.2% de la glucosa presente en el material (Vargas-Tah, y otros, 2015).

### 9.3. Fermentación

Después de la sacarificación y conocer que hay una alta concentración de azúcares, se llevó el hidrolizado a fermentación y se realizó un hidrolizado simulado con medio mineral AM1 y azúcares.

#### 9.3.1. Hidrolizados simulados

Se realizaron los hidrolizados simulados como control y para determinar el crecimiento bacteriano. Para dicho fin se monitoreó la fermentación durante las 48 horas que se mantuvo el experimento y se neutralizó con hidróxido de potasio KOH a 4N cada que fue necesario para mantener el pH lo más cercano posible a 7.

La concentración de azúcares, etanol y ácido acético fueron analizados por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), obteniendo los resultados presentes en la Figura 17.

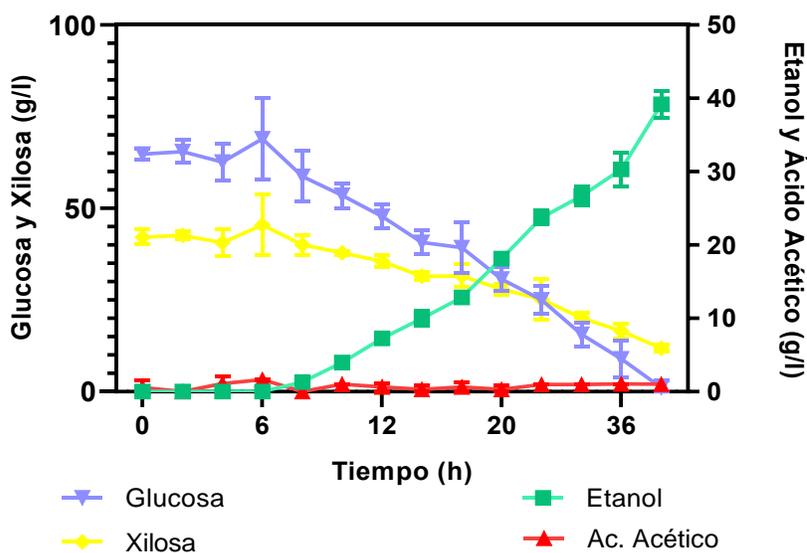


Figura 17. Cinética de fermentación en hidrolizados simulados. Concentración de Glucosa y Xilosa respecto al eje Y izquierdo; concentración de Etanol y Ácido Acético respecto al eje Y derecho.

El consumo de azúcares y producción de etanol comienza aproximadamente a las 6 horas, en la gráfica es posible observar que la glucosa es consumida con mayor velocidad que la xilosa y que incluso al final del experimento aún queda un poco de xilosa.

El rendimiento en los hidrolizados simulados fue de 41.7% sobre los azúcares fermentables, que corresponde al 82.35% del máximo teórico de etanol (Liscano, 2014).

La velocidad del volumen de producción fue determinada con la fórmula de la sección de metodología obteniendo que  $Q = 0.816 \text{ g/l h}$ , es decir que, en promedio, se obtuvieron 0.816 g/l de etanol cada hora durante la fermentación.

Durante el monitoreo de la fermentación de los hidrolizados simulados también se midió la densidad óptica, por medio de espectrofotometría, para determinar el crecimiento de la bacteria *E. coli* MS04 y calcular así el rendimiento por gramo de bacterias, el cual fue de 29.633, por lo tanto, por cada gramo de *E. coli* MS04 se obtuvieron 29.633 g de bioetanol.

También fue posible determinar la velocidad específica de producción. Obteniendo  $q = 0.617 \text{ g producidos/g de células h}$ .

### **9.3.2. Hidrolizados de yaca**

La fermentación de los hidrolizados de yaca comenzó con un promedio de 74.07 g/l de azúcares totales, debido a que se diluyó el hidrolizado cuando se agregó hidróxido de amonio para neutralizar.

Durante la fermentación de los hidrolizados de yaca igualmente se realizó una cinética para conocer las concentraciones de azúcares, etanol y ácido acético

mediante HPLC (Figura 18). De igual manera se monitoreó el pH en cada toma de muestra y se neutralizó con KOH a 4N cada que fue necesario para mantener un pH lo más cercano a 7, para asegurar que continuara el crecimiento de las bacterias *E. coli* MS04.

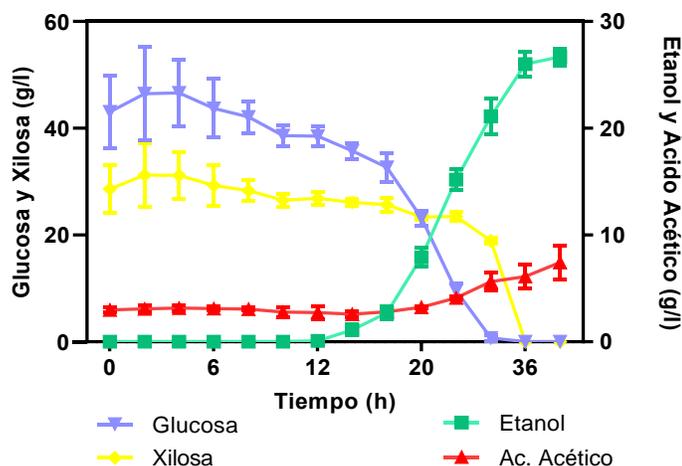


Figura 18. Cinética de fermentación en hidrolizados de yuca. Concentración de glucosa y xilosa en el eje Y izquierdo; concentración de etanol y ácido acético en el eje Y derecho.

El rendimiento de la fermentación “Y”, obtenido por medio de la fórmula que se presenta en el procedimiento fue de 0.3602 g/g o bien, 36.02% sobre el total de azúcares fermentables y 70.62% del máximo teórico de etanol, que es un rendimiento bajo comparado con el 94% de rendimiento teórico obtenido de la fermentación de la fase líquida de la hidrólisis de los tallos de yuca con la cepa *E. coli* MS04 (Liscano, 2014) e incluso sigue siendo un rendimiento bajo frente a la fermentación de 96 horas de cáscara de yuca con *S. cerevisiae* que tuvo un rendimiento de 88.2% (Bandari, Panchapakesan, Shankar, & Kumar, 2013). Esto sugiere que hubo formación de subproductos además del ácido acético, a pesar de que durante el análisis cromatográfico no se detectaron HMF ni furfural.

De igual manera se utilizó la fórmula presentada en la sección de procedimiento para determinar la velocidad volumétrica de producción  $Q = 0.7410$  g/lh, es decir que, en promedio, se produjeron 0.7410 g/l cada hora durante la fermentación.

En los hidrolizados de yaca, a diferencia de los hidrolizados simulados, no es posible obtener la velocidad específica de producción, ni el rendimiento por gramo de bacterias, puesto que sería necesario medir el crecimiento de los microorganismos mediante densidad óptica y el color de los hidrolizados lo imposibilita.

**Tabla 6. Comparación de parámetros cinéticos de los hidrolizados**

	<b>Hidrolizados simulados</b>	<b>Hidrolizados de yaca</b>
$Y$	0.417	0.3601
$Q$	0.816 g/lh	0.7225 g/lh
$Y_{P/B}$	29.633	N/A
$q$	0.617 g <sub>prod</sub> /g <sub>cel</sub> h	N/A

En la Tabla 6 se pueden comparar los parámetros cinéticos de ambos experimentos. El hidrolizado simulado tuvo una mayor eficiencia y velocidad de volumen de producción, es decir, que la mayor parte de los azúcares se fermentaron hacia etanol y en menor tiempo en los hidrolizados simulados. Esto puede deberse a los minerales del medio que eran óptimos para el crecimiento de la cepa de *E. coli* MS04.

Ya que se consumieron todos los azúcares en la fermentación se comprueba que no es necesaria la separación de sólidos ni la detoxificación si se utiliza la cepa *E. coli* MS04, a diferencia de otros estudios en los que utilizan otros microorganismos como se cita en (Vargas-Tah, y otros, 2015). Es posible observar que después de las 20 horas de la fermentación de los hidrolizados de yaca aumenta considerablemente la

concentración de ácido acético, sin embargo, esto no inhibió el crecimiento de la cepa como se menciona en (Fernandez-Sandoval, y otros, 2012).

## **10. Conclusiones**

Existen distintos métodos para la elaboración de bioetanol de segunda generación ya que de acuerdo al material y recursos con los que se cuentan se puede elegir el pretratamiento, siendo posible utilizar un tratamiento químico, físico, biológico, mecánico o una combinación de ellos. También se puede decidir entre que microorganismo utilizar para la sacarificación y fermentación o incluso si se desea que cada etapa del proceso sea secuencial o si se realiza sacarificación y fermentación simultánea.

La sacarificación del material lignocelulósico de yaca pretratado mediante el método de ácido diluido tiene mayor rendimiento cuando se aplican los cocteles enzimáticos CTec y HTec de acuerdo con los gramos de material seco frente a la sacarificación con los mismos cocteles enzimáticos por gramos de glucano.

La fermentación de los hidrolizados de yaca por medio de la bacteria *E. coli* MS04 dio como resultado la producción de bioetanol, aunque con un rendimiento bajo (70%), lo cual indica que hay variables en la fermentación que deben monitorearse y optimizarse para buscar aumentar el rendimiento teórico de alcohol.

## **11. Recomendaciones**

De acuerdo con la cinética se aconseja mantener la sacarificación solo por 12 horas, para disminuir el consumo de energía eléctrica, ya que, a partir de ese tiempo, la concentración de azúcares no aumenta significativamente.

Realizar variaciones en las condiciones de sacarificación y fermentación para realizar una optimización de los procesos por medio de un software estadístico y monitorear estrictamente el pH dentro de los matraces puede aumentar considerablemente la concentración de alcohol, mejorando la eficiencia del proceso.

Mejorar el proceso para escalarlo a planta piloto y realizar un balance energético para estudiar la viabilidad de realizarlo a nivel industrial.

## 12. Referencias bibliográficas

- Aguilar López, E. A. (2018). Uso Integral de la Yaca para la producción de licores y Bioetanol de segunda generación. *Universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo*.
- Alrumman, S. (2016). Enzymatic saccharification and fermentation of lignocellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 110-119.
- Álvarez Maciel, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía informa*, 359, 63-89. Obtenido de <http://www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/359/04carlosalvarez.pdf>
- Bandari, S., Panchapakesan, A., Shankar, N., & Kumar, H. (2013). Production of Bioethanol From Fruit Rinds by Saccharification and Fermentation. *International Journal of Scientific Research Engineering & Technology*, 2(6), 362-365.
- Bellido, C. (2013). Obtención de bioetanol de 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*. *Universidad de Valladolid*, 222.
- Diario Oficial de la Federación. (01 de 02 de 2008). Ley 085. Obtenido de [diputados.gob.mx](http://diputados.gob.mx)
- Fernandez-Sandoval, M. T., Huerta-Beristain, G., Trujillo-Martínez, B., Bustos, P., González, V., Bolivar, F., . . . Martines, A. (2012). Laboratory metabolic

evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanogenic *Echerichia colie* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5), 1291-1300.

Gasca Quezada, V., & Salinas Callejas, E. (2009). Los biocombustibles. *El cotidiano*(157), 75-82. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/325/32512739009.pdf>

Ginting, M., Irvan, Misran, E., & Maulina , S. (2020). Potential of durian, avocado and jackfruit seed as raw material of bioethanol: A review. *OP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 801(1). doi:10.1088/1757-899X/801/1/012045

Haghighi, S., Hossein, A., Tabatabaei, M., Salehi, G., Hassan, G., Gholami, M., & Ardjmand, G. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with focus on pretreatment. *Renewable and sustainable energy reviews*, 27, 77-93.

Hu, F., & Ragauskas, A. (2012). Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *BioEnergy Research*, 5, 1043-1066.

INECC. (18 de Mayo de 2018). *Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático*. Obtenido de Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Cambio Climático: <https://www.gob.mx/inecc/acciones-y-programas/inventario-nacional-de-emisiones-de-gases-y-compuestos-de-efecto-invernadero>

Liscano, Y. (2014). Producción de bioetanol de tallos de yuca. *Universidad nacional de Colombia*.

Loayza, K. (2020). Determinación de las condiciones óptimas de fermentación para la obtención de bioetanol a partir del hidrolizado ácido de la corteza del cacao (*Theobroma cacao*) proveniente de la industria cacaotera del Ecuador. *Universidad Politécnica Salesiana*.

Luna Esquivel, G., Alejo Santiago, G., Ramírez Guerrero, L. G., & Arévalo Galarza, M. C. (2013). La yaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) un fruto de exportación. *Agro productividad*, 6(5), 65-70.

Monteiro Machado, C. (2010). *Situación de los biocombustibles de 2° y 3° Generación en América Latina y Caribe*. (OLADE, & IICA, Editores) Obtenido de olade: <http://biblioteca.olade.org/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=4095>

Novozymes. (2017). *Cellic CTec3 HS*. Obtenido de Novozymes: [https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/advance-your-business/05\\_L2\\_Bioenergy/Benefit-sheets/Cellic-CTec3-HS-application-sheet-NA.pdf](https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/advance-your-business/05_L2_Bioenergy/Benefit-sheets/Cellic-CTec3-HS-application-sheet-NA.pdf)

ONU. (s.f.). *un.org*. Obtenido de <https://www.un.org/es/ga/president/65/issues/sustdev.shtml#:~:text=Consta%20de%20tres%20pilares%2C%20el,la%20protecci%C3%B3n%20del%20medio%20ambiente.&text=Esto%20fue%20seguido%20en%202002,Plan%20de%20Aplicaci%C3%B3n%20de%20Johannesburgo>.

REMBIO. (s.f.). *Red Mexicana de Bioenergía a.c.* Obtenido de Biocombustibles sólidos: <https://rembio.org.mx/areas-tematicas/biocombustibles->



Vergara, M. (2020). Sacarificación de residuos lignocelulosicos pretratados con peroxido de hidrógeno para la obtención de azúcares fermentables. *Universidad Santo Tomás*.

Villar, J. C. (2012). Consideraciones sobre la producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica. *ICIDCA. Instituto cubano de investigaciones de los derivados de la caña de azúcar*, 42(1-3), 8-17. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223123848002>