



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“PRODUCCIÓN DE ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN A PARTIR DE
RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE AGAVE TEQUILANA”**

TESIS presentada por:

ULISES VELÁZQUEZ VALADEZ

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad
de Ingeniería Química como requisito parcial
para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS

EN

INGENIERÍA QUÍMICA

Asesor: Doctor Agustín Jaime Castro Montoya

Morelia, Michoacán

Agosto 2015



Asunto: Aprobación de Impresión de Tesis

Oficio número 031 /2015/2015.

Lic. Ulises Gutiérrez Vazquez
Jefe del Departamento de Titulación de la
U.M.S.N.H.
Presente.-

Por este medio nos dirigimos a usted de la manera más atenta para notificarle que después de haberle dado seguimiento al desarrollo de la tesis: "PRODUCCIÓN DE ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE AGAVE TEQUILANA". Después de haber revisado el manuscrito que presentó del alumno **Ulises Velázquez Valadez 1300742K**, concluimos que cumple con los requisitos académicos y con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado para el desarrollo de tesis.

Por lo anterior este Comité Tutorial da el aval para su impresión final.

Atentamente.
Morelia, Michoacán a 13 de julio de 2015.

Presidente o Asesor: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya 01000179

Vocales:

Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga 07001002

Dr. Rafael Maya Yescas 04002040

Dr. Medardo Serna González 89000676

Dr. Jaime Saucedo Luna 89000498

Dr. José Ma. Ponce Ortega
Coordinador de la Maestría en Ciencias en
Ingeniería Química.



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

*En adelante van estos lugares,
ya tienen su Diosa Coronada.*

(Leandro Díaz)

Agradecimientos.

A mi esposa, Monserrat, quien ha padecido y disfrutado impasible a mi lado esta larga y hermosa aventura.

A mis hijos, Danna Miranda y César Alejandro, quienes han llenado de luz y color mis días.

A mi madre, Elvia, que me ha dado todo incondicionalmente, empezando por el maravilloso don de la Vida.

A mi padre, Antonio Adrián, que a su manera me ha enseñado un par de cosas, o quizás mucho más.

A mi hermana, Guadalupe, que ha sido mi compañera en muchas de los momentos más tristes y felices de mi vida.

A mis suegros, Gloria y Ricardo, por haberme recibido como un hijo y darme su apoyo desinteresadamente.

A mi entrañable amigo, Juan Carlos, de quien siempre he tenido un consejo amable y de quien he recibido un apoyo incondicional sin el cual no hubiera podido completarse este trabajo.

A mi asesor, Dr. Agustín J. Castro, que me ha brindado todas las facilidades en la realización de este proyecto.

A mi comité tutorial, integrado por:

- Dr. Jaime Saucedo Luna
- Dra. María Del Carmen Chávez Parga
- Dr. Medardo Serna González
- Dr. Rafael Maya Yescas

Que con sus atinadas observaciones me han hecho crecer un poco más como científico y como persona.

A la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por facilitar todos los medios materiales para mi desarrollo como investigador.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de la beca número 367062.

Al Universo, por mostrarme cuan insignificantes son mis problemas y también por hacerme coincidir en este tiempo y espacio con la Vida que me ha tocado vivir.

Contenido

Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
1. Consideraciones previas.....	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Antecedentes.....	4
1.3 Marco teórico.....	8
1.3.1 Etanol.....	8
1.3.2 Material Lignocelulósico.....	8
1.3.3 Producción de etanol de segunda generación.....	10
1.3.4 Fermentación.....	13
1.3.5 Cultivos energéticos.....	14
1.3.6 <i>Agave tequilana</i>	15
1.4 Planteamiento del problema.....	17
1.5 Justificación.....	18
1.6 Hipótesis.....	19
1.7 Objetivo General.....	19
1.8 Objetivos Particulares.....	19
2. Pretratamiento.....	20
2.1 Metodología.....	21
2.1.1 Obtención del material y tratamiento previo.....	21
2.1.2 Pretratamiento.....	21
2.1.3 Hidrólisis enzimática.....	21
2.2 Resultados y discusión.....	22
2.2.1 Composición del bagazo de <i>Agave tequilana</i>	22
2.1.2 Pretratamiento alcalino-oxidativo.....	23
2.1.3 Hidrólisis enzimática.....	23
2.1.4 Balance del proceso y análisis estadístico.....	24
3. Hidrólisis.....	27
3.1 Metodología.....	28

3.1.1 Hidrólisis utilizando combinación de enzimas.....	28
3.1.2 Cinética de reacción	29
3.2 Resultados y discusión.....	29
3.2.1 Análisis de los diseños experimentales.....	29
3.2.2 Balance del proceso.....	31
3.2.3 Cinética de reacción	32
4. Fermentación	34
4.1 Metodología.....	35
4.1.1 Microorganismo y medio de cultivo	35
4.1.2 Cinética Microbiana	35
4.1.3 Determinación de la tolerancia a la temperatura.....	35
4.1.4 Procesos de sacarificación y fermentación separadas.....	36
4.1.5 Procesos de sacarificación y fermentación simultánea.....	36
4.2 Resultados y discusión.....	37
4.2.1 Cinética de crecimiento microbiano	37
4.2.2 Tolerancia a la temperatura	40
4.2.3 Sacarificación y fermentación separada.....	40
4.2.4 Sacarificación y fermentación simultánea.....	41
4.2.5 Balance de masa de la producción de etanol.....	41
5. Conclusiones y recomendaciones.....	43
5.1 Conclusiones	44
5.2 Recomendaciones	45
6. Referencias	46
7. Anexos.....	50
7.1 Técnica para la determinación de azúcares y etanol por HPLC.....	51
7.2 Técnica de determinación de azúcares reductores por medio del ácido 3,5-Dinitrosalicílico.....	52
7.3 Técnica para conteo celular de <i>Zymomonas mobilis</i> en cámara de Neubauer.....	53
7.4 Técnica para la determinación de lignina Klason.....	54
7.5 Bioseguridad en el laboratorio	55
7.5.1 Grupos de riesgo de microorganismos.....	55
7.5.1.1 Grupo de riesgo 1.....	55
7.5.1.2 Grupo de riesgo 2.....	55

7.5.1.3 Grupo de riesgo 3.....	55
7.5.1.4 Grupo de riesgo 4.....	55
7.5.1.5 Grupo de riesgo 5.....	55
7.5.2. Niveles de bioseguridad y biocontención.....	55
7.5.2.1 Laboratorio básico BSL-1.....	56
7.6 Determinación de la actividad de la enzima Cellic Ctec 3	58

Índice de figuras

Fig. 1. Cadenas de celulosa cristalina.	9
Fig. 2 Arreglo de la pared celular primaria en las plantas.....	9
Fig. 3. Estructura de la lignina.....	10
Fig. 4. Representación esquemática del efecto del pretratamiento.....	12
Fig. 5. Comparativo entre la ruta de Embden-Meyerhoff y Entner-Doudoroff.....	14
Fig. 6. Diagrama de bloques para el proceso de pretratamiento e hidrólisis.	24
Fig. 7. Diagrama de flujo de los procesos de pretratamiento e hidrólisis	31
Fig. 8. Representación gráfica del tiempo vs el inverso de la concentración de sustrato.	33
Fig. 9. Datos cinéticos para <i>Zymomonas mobilis</i> a 30°C y pH = 6.0	38
Fig. 10. Gráfico de la concentración de células como función de la concentración de azúcares.....	39
Fig. 11. Imagen del campo observado en la cámara de Neubauer.....	53

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Composición promedio del bagazo de Agave tequilana.</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 2. Diseño experimental para el pretratamiento alcalino-oxidativo</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 3. Composición del material lignocelulósico inicial.</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 4. Tabla de resultados de porcentaje de material removido y lignina residual.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 5. Rendimiento del proceso de hidrólisis de para cada uno de los pretratamientos.</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 6. Arreglo Ortogonal L8 de dos niveles para el estudio de la hidrólisis enzimática.</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 7. Arreglo Ortogonal L4 de dos niveles para el estudio de la hidrólisis enzimática.</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 8. Resultados del diseño experimental con las enzimas</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 9. Resultados del diseño experimental utilizando las enzimas Cellic de Novozymes.</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 10. Datos para la construcción de la cinética de las enzimas Cellic.</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 11. Variación de la concentración de sustrato con el tiempo.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 12. Resultados de la cinética de crecimiento de Zyomonas mobilis.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 13. Resultados de la fermentación a diferentes temperaturas.</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 14. Resultados de la fermentación de hidrolizados.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 15. Resultados de la sacarificación y fermentación simultánea.</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 16. Resultados para la determinación de la actividad enzimática de Cellic CTec 3.</i>	<i>58</i>

Resumen

La demanda de energía de la humanidad se ha incrementado sustancialmente en los últimos años, debido a que la principal fuente de producción la constituyen los combustibles fósiles se han presentado problemas tales como la escasez y aumento de precio de dichas materias primas, por otro lado, la gran cantidad de dióxido de carbono vertida a la atmosfera producto su combustión ha tenido como consecuencia el cambio climático. Finalmente, debido a que la distribución de combustibles fósiles no es homogénea a lo largo del orbe se han generado fuertes conflictos geopolíticos por el dominio de su extracción. Por estas razones, se ha recurrido a fuentes renovables de energía tales como el etanol, el cual ha demostrado ser una alternativa viable para el sector del transporte, el cual consume una buena parte de la energía producida a nivel mundial.

Actualmente el etanol es producido principalmente a partir de la fermentación de los azúcares contenidos en cultivos como el maíz y la caña de azúcar, lo cual provoca encarecimiento de los alimentos así como utilización de tierras fértiles y agua potable para su producción. Con el fin de evitar estas consecuencias se ha desarrollado la tecnología del etanol de segunda generación, la cual utiliza como materia prima los desechos agroindustriales o forestales. Este tipo de residuos se consideran como materia lignocelulósica. El proceso para la obtención de etanol incluye al pretratamiento, hidrólisis, fermentación y purificación del producto.

El *Agave tequilana* es una planta utilizada en el occidente de México para la fabricación de bebidas espirituosas, principalmente tequila o mezcal. Sin embargo, esta actividad deja como residuo el bagazo de los tallos de la planta, conocidos como piñas. Este bagazo constituye un problema para las plantas productoras y no tiene ningún uso. Es por este motivo que se eligió este tipo de materia prima.

En el presente trabajo se realizó un diseño experimental para la optimización de un pretratamiento alcalino oxidativo de donde se determinó que las concentraciones óptimas de reactivos son 6% de hidróxido de sodio y 10% de peróxido de hidrógeno. Para la hidrólisis enzimática se partió de la utilización de una enzima, la cual se obtiene del hongo *Trichoderma reesei*, sin embargo se plantearon un par de diseños experimentales combinando diferentes tipos de enzimas para maximizar la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado así como el rendimiento del proceso. Finalmente se obtuvo una concentración de azúcares de 165 g/l de azúcares después de 72 horas con un rendimiento de 632 g de azúcares por kilogramo de bagazo de *Agave tequilana* libre de solubles.

Estos hidrolizados se sometieron a fermentación con *Zymomonas mobilis* obteniéndose una concentración de etanol en el mosto de 62 g/l después de 72 horas. En contraste utilizando la técnica de fermentación y sacarificación simultáneas se obtuvieron 40 g/l de etanol después de 72 horas de reacción.

Palabras clave: Etanol, pretratamiento, hidrólisis, fermentación, *Zymomonas mobilis*.

Abstract

The energy demand of mankind has increased substantially in recent years, because the main source of production constitute fossil fuels have been problems such as the shortage and price increase of such raw materials, on the other hand, the large amount of carbon dioxide discharged into the atmosphere on combustion product has meant climate change. Finally, because the distribution of fossil fuels is not homogeneous across the globe have strong geopolitical conflicts generated by rough removal. For these reasons, it has turned to renewable energy such as ethanol, which has proven to be a viable option for the transport sector, which consumes much of the energy, produced worldwide alternative sources.

Currently ethanol is produced primarily from the fermentation of the sugars contained in crops such as corn and sugarcane, causing higher food and use of fertile land and water for their production. In order to avoid these consequences it has developed technology of second generation ethanol, which is used as raw material agro-industrial and forestry wastes. This type of waste is considered as lignocellulosic material. The process for producing ethanol includes pretreatment, hydrolysis, fermentation and purification.

The *Agave tequilana* is a plant used in western Mexico for the production of spirits, especially tequila or mezcal. However, this activity leaves as waste bagasse plant stems, known as cones. This bagasse is a problem for producing plants and has no use. It is for this reason that this type of raw material was chosen.

In this paper an experimental design was carried out for the optimization of alkaline oxidative pretreatment where it was determined that the optimum concentrations of reagents are 6% sodium hydroxide and 10% hydrogen peroxide. For the enzymatic hydrolysis was started with the use of an enzyme, which is obtained from the fungus *Trichoderma reesei*, however a few experimental design combining different types of enzymes to maximize the concentration of reducing sugars in the hydrolyzate and performance raised process. Finally sugars concentration of 165 g/l of sugars was obtained after 72 hours a yield of 632 g of sugar per kilogram of bagasse soluble matter free.

These hydrolysates were subjected to fermentation with *Zymomonas mobilis* obtaining an ethanol concentration of 62 g/l after 72 hours. In contrast it using the technique of simultaneous saccharification and fermentation 40 g/l ethanol were obtained after 72 hours of reaction.



1. Consideraciones previas.

1.1 Introducción

El consumo de energía se ha incrementado a lo largo del último siglo, a medida que la población en las grandes ciudades se ha multiplicado; debido a que la principal fuente de energía es el petróleo, se tiene una acumulación de gases contaminantes que en los últimos años ha llegado a niveles peligrosos; provocando efectos nocivos para el medio ambiente, tales como el cambio climático. Por otro lado, el petróleo es un recurso no renovable.

Como alternativas al uso del petróleo se han estudiado diversas fuentes energéticas, las cuales van desde la energía geotérmica, eólica, solar y hasta la nuclear. Sin embargo, el mayor consumidor de combustibles fósiles y productor de gases nocivos es el sector del transporte, para el cual se han desarrollado los llamados combustibles alternativos entre los cuales encontramos al hidrógeno, biogás, biodiesel y bioetanol. Siendo este último la alternativa que ha sobresalido, sobre todo en países como Brasil y Estados Unidos.

Dado que la tecnología actual predominante está orientada al consumo de gasolina, el cambio hacia etanol no puede hacerse de manera inmediata; es decir, ningún automóvil que este diseñado para funcionar con gasolina puede operar solo con etanol a pesar de que dicho alcohol tiene un índice de octano mayor que la mayoría de las gasolinas. Por esta razón se hace necesario hacer mezclas de alcohol y gasolina que hasta en un 10% en volumen pueden hacer funcionar un motor de combustión interna de gasolina sin ocasionarle ningún problema. Estas mezclas se conocen como E5 y E10 denominadas así por su contenido de etanol en volumen. Dado que el uso del etanol como combustible se ha difundido extensamente, los fabricantes de automóviles han desarrollado lo que se conoce como automóviles de combustible flexible, los cuales están equipados con sensores que detectan la concentración de etanol en su combustible y ajustan automáticamente los parámetros necesarios para su utilización, tales como la relación de compresión o el flujo de alimentación. Este tipo de vehículos son capaces de utilizar cualquier mezcla de etanol y gasolina o etanol hidratado.

El etanol es un alcohol primario que forma un azeótropo aproximadamente a 96 % en volumen con agua, por lo tanto al hacer las mezclas con gasolina es posible que se forme una segunda fase acuosa en el fondo de los depósitos, lo cual ocasionaría un daño irreversible a cualquier máquina de combustión interna. Esto plantea uno de los mayores problemas de la tecnología de producción de etanol como biocombustible, ya que se hace necesario retirar el agua del etanol casi por completo, al menos hasta un porcentaje superior al 98.5% en volumen. Para lograr este objetivo existen diversos métodos entre los cuales están la destilación extractiva, destilación azeotrópica o destilación al vacío. Sin embargo, el alto consumo energético de estas operaciones encarece considerablemente la producción de etanol.

Tradicionalmente, el etanol se ha producido por medios biológicos aprovechando la capacidad de fermentar azúcares simples hasta etanol, este proceso es tan antiguo como la humanidad, ya que hay vestigios que nos hacen creer que los egipcios ya practicaban la fermentación para producir cerveza. El microorganismo que preferentemente se ha utilizado para realizar la fermentación

alcohólica es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual presenta múltiples desventajas, entre las cuales destacan:

- Baja tolerancia al etanol en el medio donde se desarrolla, la cual ronda tan solo el 8% en volumen.
- Incapacidad para fermentar pentosas, lo cual limita su uso.
- Bajo rendimiento de producción de etanol.

Estas limitantes, también influyen en el encarecimiento del proceso global de producción de etanol. Por otro lado existe otro problema importante de la producción industrial de etanol que es la baja eficiencia de los microorganismos que actúan en este proceso.

En la actualidad existe un reto tecnológico para lograr la producción de biocombustibles sin que entre en competencia con la producción de alimento para consumo humano, ya que las fuentes tradicionales de azúcares han sido los granos y la caña de azúcar, motivo por el cual se están estudiando métodos para obtener el llamado etanol de segunda generación, para el cual se utiliza como materia prima, material lignocelulósico que representa un desecho de las actividades agroindustriales o en el mejor de los casos es usado como combustible sin aplicarle ningún tratamiento.

1.2 Antecedentes

En la actualidad, nos es imposible imaginar la actividad humana sin la energía, todo el desarrollo que la humanidad ha logrado como especie, está ligado a transformaciones de esta. Es por este motivo que se ha recurrido a múltiples fuentes de energía, de entre las cuales la más utilizada debido a su bajo costo de producción y relativa abundancia ha sido la energía fósil. La cual incluye al carbón, gas natural y petróleo. Este último es la fuente de energía más explotada del mundo ya que cerca del 80% de la energía consumida proviene de esta fuente, se calcula que por cada habitante del planeta se consumen 4.8 barriles de crudo al año [1]. El petróleo proviene de la descomposición de organismos que vivieron en eras geológicas antiguas gracias al efecto de las altas temperaturas y presiones que predominan en el suelo profundo. Es por esta razón que se dice que el petróleo se sigue generando, sin embargo, como se consume mucho más rápido de lo que se produce se le considera un recurso no renovable.

De acuerdo con los registros históricos se cree que la explotación del petróleo la comenzaron los chinos, en el siglo quinto utilizando tubos de bambú lograban extraer desde una profundidad de 243 metros. Independientemente a eso, los antiguos persas dejaron registro del uso del petróleo para fines terapéuticos y medicinales, no obstante a eso, también se sabe que la ciudad de Bagdad estaba pavimentada con las fracciones duras del petróleo hacia el siglo octavo.

La refinación moderna del petróleo comenzó en 1846 cuando Abraham Gesner [2] refinó queroseno a partir del carbón mineral, seis años más tarde Ignacio Lukasiewicz refinó el mismo producto pero a partir de petróleo [3]. Como este era más accesible y costeable, el proceso de producción cobró fama y se hizo necesario comenzar con la exploración y extracción masiva del petróleo. El primer pozo comercial para extraer petróleo en Norteamérica fue instalado por James Miller Williams en 1858 en Oil Springs (Ontario, Canadá) [4]. Al año siguiente Edwin Drake descubrió petróleo en Titusville, Pennsylvania. En México, el primer pozo perforado fue el que construyó Adolfo Autrey cerca de un chapopotera en Papantla, Veracruz en el año de 1869; sin embargo no se obtuvo petróleo de este. Lo cual era muy común en estas épocas ya que no se disponía de la tecnología y conocimientos geofísicos actuales, de modo que se actuaba en un ejercicio de prueba y error. Debido a las condiciones adversas que siempre han existido en México para la extracción de petróleo, fue hasta 1904, que en las inmediaciones de Ébano, en el estado de San Luis Potosí se construyó el primer pozo verdaderamente comercial, el cual tenía una profundidad de 503 metros y producía 1500 barriles de crudo diarios [5].

Como es de esperarse, conforme se ha ido aumentando el ritmo de exploración, extracción y refinación del petróleo se han ido requiriendo mayores tecnologías para lograr cada vez más exactitud para localizar los yacimientos, más potencia para perforar más profundo y mejores procesos para aumentar la eficiencia en su uso. Por lo cual el precio del crudo ha ido aumentando conforme su explotación se ha ido complicando, llegará un momento en que su uso resultará en costos prohibitivos para seguir utilizándolo como combustible. Estudios como el del Dr. Marion King Hubbert [6] predijeron que la producción de crudo mundial comenzaría su declive en el año

2010 y que para el año 2050 tan solo será la cuarta parte de la producción actual [7].

El principal consumidor de petróleo es el sector de transportes ya que actualmente requiere el 60% de la producción total [8]. Por esta razón es de vital importancia para minimizar la dependencia hacia el petróleo y reducir las emisiones de gases contaminantes hallar alternativas energéticas para transportar recursos materiales y humanos.

Los combustibles fósiles en general son causa de la acumulación exagerada de gases contaminantes y de efecto invernadero, propiciando el calentamiento global. Los gases de efecto invernadero son gases compuestos al menos de tres átomos los cuales pueden absorber la radiación en la banda infrarroja lo cual aumenta la temperatura de la atmosfera, algunos de ellos como el agua, metano, o dióxido de carbono siempre han estado presentes en la naturaleza [9] y han ayudado a regular la temperatura de la superficie terrestre, y también son responsables de los ciclos climáticos que han ocurrido por lo menos desde hace 10,000 años. Quizás el gas de efecto invernadero más importante por su copiosa producción es el bióxido de carbono, estudios de los hielos perpetuos demuestran que su concentración en la atmosfera terrestre ha sido determinante en los ciclos alternados de clima cálido y glaciaciones, no obstante a eso, en los últimos doscientos años la concentración de este gas ha aumentado exponencialmente como no lo hacía desde la última glaciación. Esta abrupta acumulación puede causar cambios en la temperatura de la tierra, lo cual puede llegar a desestabilizar la vida tal como la conocemos y causar principalmente los siguientes efectos:

- Desplazamiento de las zonas agrícolas.
- Migración de las áreas de enfermedades endémicas.
- Derretimiento de los hielos polares.
- Aumento del nivel oceánico.

Como este problema afecta en general a toda la humanidad, en el año de 1997, los líderes mundiales, firmaron un documento conocido como el Protocolo de Kioto donde la humanidad se compromete a reducir la cantidad de emisiones de gases de efecto invernadero sin sacrificar el desarrollo de países emergentes como el nuestro. En dicho documento se consideran incentivos fiscales, apoyos económicos para el desarrollo de tecnologías renovables y los bonos de carbono, los cuales se emiten por entidades que logran reducir sus emisiones más allá de lo requerido y son comprados por aquellos que por su propia naturaleza operativa no pueden cumplir las metas establecidas.

Además de la problemática expuesta en las líneas anteriores, hay que añadir que el petróleo es un recurso que no está uniformemente repartido por el globo terráqueo ya que cerca del 63% de las reservas se encuentran en el Medio Oriente, en donde solo vive aproximadamente el 2% de la población mundial, por lo tanto, el petróleo es un problema de política global y en países como el nuestro es un recurso estratégico del cual se depende fuertemente ya que gran parte de las importaciones de petróleo de Estados Unidos provienen de nuestro país.

Dado este escenario, se han hecho estudios para encontrar alternativas al uso de los combustibles

fósiles, de ahí se han podido desarrollar algunas tecnologías que son llamadas “renovables” como la luz del sol, la fuerza de los vientos, del agua o el uso de biomasa. Estas tecnologías tienen la ventaja de que son prácticamente inagotables, ya que directa o indirectamente son propiciadas por la energía que incide desde el sol hacia la tierra; son además, energías limpias ya que no producen acumulación de contaminantes como los combustibles fósiles, esto es cierto aun en la combustión de derivados de la biomasa ya que el carbón emitido en forma de dióxido de carbono es utilizado nuevamente por las plantas para generar más biomasa, de modo que no hay una acumulación neta de gases de efecto invernadero. En adición a lo anterior, los recursos renovables están uniformemente distribuidos por el orbe de modo que pueden llegar a ser pilares del desarrollo de las regiones que no tienen acceso al petróleo o a otras fuentes de energía fósil.

Las energías renovables tienen una historia aún más larga que la utilización de combustibles fósiles ya que la humanidad comenzó a obtener energía directamente de la biomasa desde hace más de 5,000 años, posteriormente en la era preindustrial se construyeron bombas y molinos movidos por corrientes de agua o aire, sin embargo, en la revolución industrial se abandonaron este tipo de energías debido a su baja eficiencia. Es posible que no se hubiera logrado un desarrollo tan rápido sin haber migrado de fuente de energía a las no renovables.

El término biomasa lignocelulósica será usado para referirse a la parte de las plantas que no es comestible, tales como hojas, tallos, cortezas y residuos agrícolas. En la actualidad tan solo el 3% de la energía consumida a nivel mundial proviene de la biomasa [10], y una gran parte de ella es obtenida de manera directa al quemar material lignocelulósico. Además de esta forma de utilización de la biomasa existen al menos cuatro formas de aprovechar la energía contenida en la biomasa, ellos son, gasificación, fermentación anaerobia, y pirolisis.

Más recientemente se ha intentado utilizar la biomasa lignocelulósica como fuente de carbono para la producción de etanol, debido a que una de las principales desventajas de los biocombustibles es que se requiere utilizar recurso (tierra fértil, agua y cosechas) destinado a la producción de alimento como precursor de combustibles. De este modo se estaría aprovechando un material que en muchos de los casos se considera desecho y que además es muy abundante. Si se aprovechara este tipo de material como base para producir etanol, hacia el año 2006 se calculaba que la producción global de etanol de origen lignocelulósico podría llegar a los 442 mil millones de litros por año, lo cual es una cifra bastante mayor comparada a los casi 85 millones de metros cúbicos producidos en 2011; el cual, en su mayoría es producido a partir de maíz o caña de azúcar.

El etanol, alcohol etílico o simplemente alcohol ha sido utilizado por la humanidad desde tiempos inmemoriales como relajante, medicamento o para fines de entretenimiento; y debido a su alto poder calorífico también ha tenido un papel preponderante como combustible. Ha sido producido por fermentación desde hace 4500 años en Egipto donde se introdujo la cerveza, en dicha cultura se le atribuía su producción al dios Osiris. En China se comenzó a practicar la destilación como un modo de aumentar la concentración de alcohol de una bebida producida a partir de arroz, miel y frutas. Debido a sus propiedades toxicológicas, en la mayoría de las religiones orientales se tenía

prohibido su consumo, y en cambio en las religiones occidentales se le han atribuido propiedades mágicas y espirituales. En la antigua Persia fue donde finalmente se aisló en una forma relativamente pura por la alquimista Zakariya Razi y de hecho la palabra alcohol viene de una raíz árabe (*al-kuhl*, *el espíritu*).

En 1796, Johan Tobías Lowitz obtuvo etanol puro filtrando alcohol destilado a través de carbón activado. Fue Antoine Lawrence Lavoisier quien describió al etanol como un compuesto de carbono hidrógeno y oxígeno y su fórmula empírica fue determinada por Nicolás-Theodore de Saussure en 1808. Cinco décadas después, Archibald Scott Couper publicó la estructura del etanol.

En Estados Unidos, en la década de 1840 el alcohol etílico era utilizado como combustible para lámparas, y para el año 1906 fue utilizado como combustible en el famoso modelo T de Ford. Durante la ley seca en los años veinte se prohibió como combustible para evitar su consumo como bebida; y no fue hasta el embargo de la OPEP de los años 70's en que se retomó esta aplicación para subsanar aunque sea parcialmente la escasez de energéticos. A partir de entonces y debido a las grandes ventajas que ofrece el etanol contra la gasolina, se ha ido ampliando su uso. En México, se ha intentado introducir este tipo de combustible en varias ocasiones, sin embargo, las condiciones del mercado y la rigurosa política energética han evitado el ingreso de nuestro país a una tecnología mundialmente reconocida.

1.3 Marco teórico

1.3.1 Etanol

El etanol es un líquido diáfano de olor característico, sabor picante, volátil y considerado inflamable. Su punto de ebullición es de 78.4 °C y el de fusión es de -130°C. Densidad 789.3 kg/m³ a 20 °C. Sus límites de explosividad van de 3.3 a 19% y su presión de vapor a 20 °C es de 59 mmHg [11]. Como se ha mencionado anteriormente, posee un índice de octano mayor que el de la gasolina, para ser exactos, el índice de octano del alcohol etílico es de 108, lo cual quiere decir que puede arder más uniformemente y con menos detonaciones que el 2,2,4 trimetil-pentano que es considerado el mejor hidrocarburo para ser usado como gasolina.

Al alcohol etílico se le considera derivado del agua por sustitución de uno de sus hidrógenos por un radical etilo, de este modo, el etanol es capaz de interaccionar fuertemente con la molécula de agua a tal grado de que a 96 % en peso de etanol se forma un azeótropo [12], comportándose la mezcla como si de un componente puro se tratase, y por más destilaciones convencionales sucesivas que se apliquen, jamás podrá ser diferente la concentración de etanol en el líquido que en el vapor producido.

1.3.2 Material Lignocelulósico

Como ya se ha mencionado anteriormente, la biomasa lignocelulósica representa todas las partes de las plantas que no puedan ser utilizadas como alimento, y está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y pequeñas cantidades de proteína, pectina, metabolitos secundarios y cenizas. Sin embargo, para la producción de etanol, las fracciones más importantes son las que están constituidas por carbohidratos, es decir, la celulosa y hemicelulosa. Al conjunto de estos dos polímeros se le conoce como holocelulosa [1]. El material lignocelulósico contiene alrededor de 40 a 50% de celulosa; 25 a 35% de hemicelulosa y 15 a 25% de lignina [13].

La celulosa es un polisacárido formado únicamente por monómeros de glucosa, los cuales están unidos por enlaces 1-4, sin puntos de ramificación. El enlace, además de poseer esta orientación es un enlace glucosídico β (beta) lo cual hace a la celulosa muy difícil de hidrolizar, ya que la mayor parte de los organismos no poseen las enzimas necesarias para degradarla. Se ha calculado que la celulosa está constituida por 300 a 15000 unidades de glucosa y por medio de difracción de rayos X se ha demostrado que la celulosa se agrupa en fibrillas que contienen cadenas de polímero ordenadas en forma paralela [14], a lo cual se le conoce como forma cristalina de la celulosa, en este tipo de ordenamiento hay fuertes interacciones entre las cadenas que forman la fibra, lo cual dificulta aún más su hidrólisis tal como se muestra en la Figura 1; por el contrario, en las regiones amorfas hay una menor interacción y las enzimas pueden iniciar su ataque en estas regiones. La celulosa no es soluble en agua a pesar de interactuar fuertemente con esta. La hemicelulosa no está relacionada estructuralmente con la celulosa ya que es un polímero de carbohidratos de cinco carbonos, principalmente xilosa polimerizada mediante enlaces glucosídicos β 1-4 y con ramificaciones en dirección β 1-3 de arabinosa, adicionalmente contiene algunos otros

carbohidratos como ácidos urónicos y hexosas. La hemicelulosa no forma una fuerte estructura como la celulosa cristalina, por tal motivo es más fácil degradarla, por otro lado, es soluble en soluciones alcalinas. La función de la hemicelulosa en las plantas es formar una especie de cemento entre las moléculas de celulosa lo cual las mantiene unidas como se aprecia en el esquema de la Figura 2 [1].

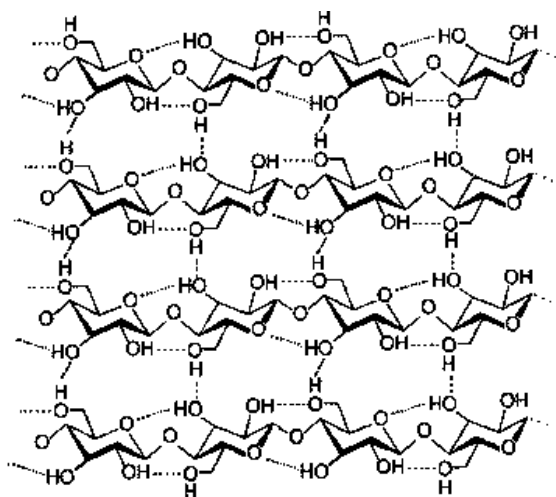
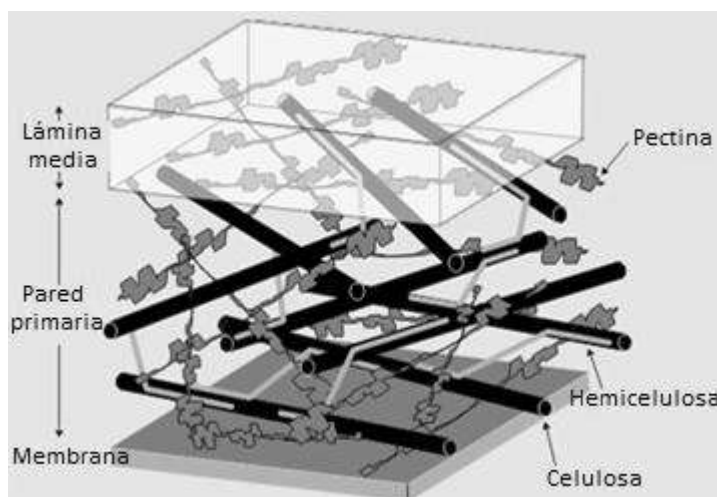


Fig. 1. Cadenas de celulosa cristalina interactuando entre ellas por medio de puentes de hidrógeno.

Fig. 2 Arreglo de la pared celular primaria en las plantas, obsérvese que la hemicelulosa ayuda a mantener juntas las fibras de celulosa. La pectina da cierta flexibilidad y porosidad.



La lignina es un polímero formado por tres unidades básicas de las cuales pueden derivar muchas más, guaiasilo, sinapilo y p-hidroxifenilo. Es el segundo biopolímero más abundante y su estructura aún no es del todo conocida, sin embargo se cree que pudiera ser como la mostrada en la Figura 3. La cantidad y estructura de la lignina depende de muchos factores, entre los cuales podemos mencionar, el grado de desarrollo de la planta, el tipo de especie del cual se trate y las condiciones en las cuales ha crecido el espécimen del cual provenga la muestra. De hecho, la producción de monómeros de lignina se realiza en el espacio intracelular por medio de un mecanismo oxidativo con 4-hidroxifenilpropanoides y de ahí es transportada a la pared celular por mecanismos que aún no son comprendidos del todo [15]. Un precursor bioquímico de la lignina es

el ácido síquimico del cual también derivan los aminoácidos fenilalanina y triptófano [14]. Para la planta es muy importante el contenido de lignina ya que esta provee una barrera hidrofóbica que evita el ataque microbiano y también da un soporte estructural a plantas leñosas. De hecho, este tipo de plantas contienen gran cantidad de lignina mientras que las herbáceas son pobres en este componente [1].

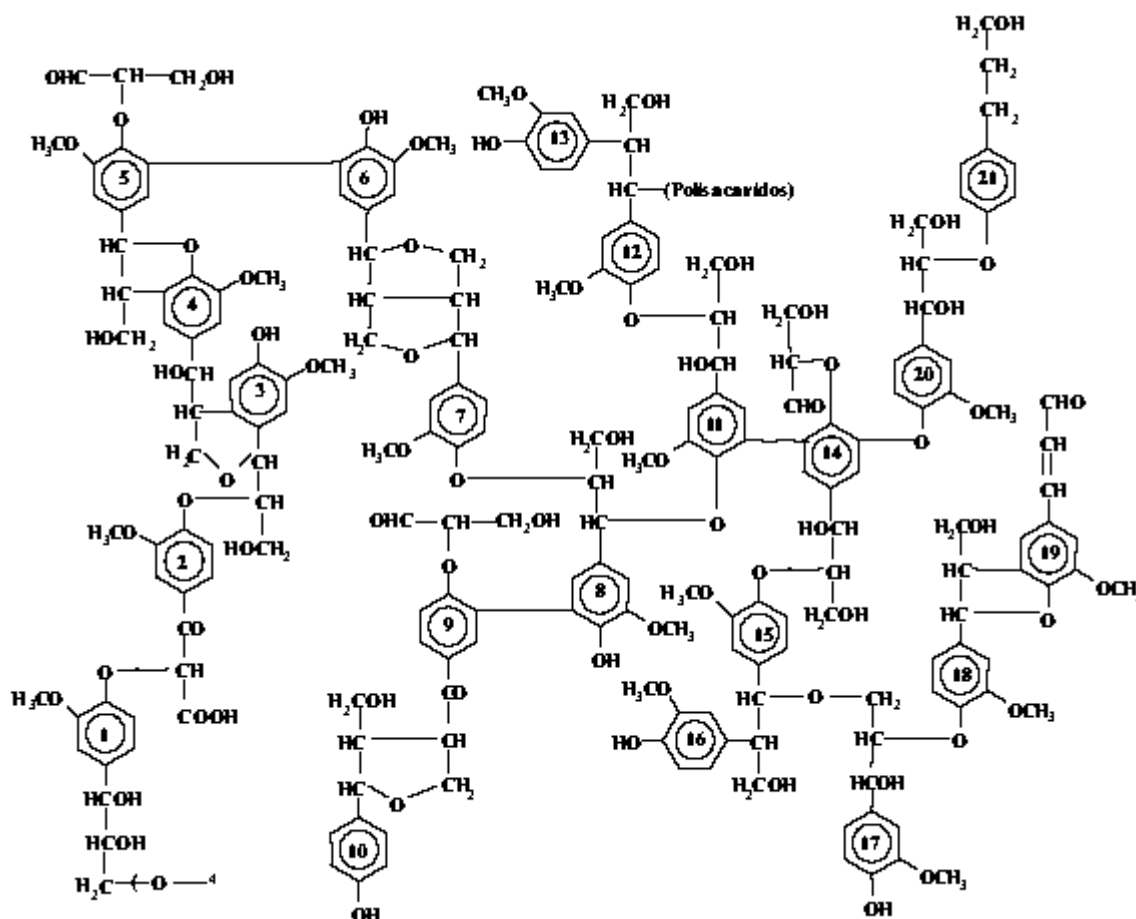


Fig. 3. Estructura de la lignina. Nótese los enlaces de 4-hidroxifenilpropanoides.

1.3.3 Producción de etanol de segunda generación

Dado que la materia lignocelulósica tiene una gran cantidad de polímeros de hexosas y pentosas, es posible utilizarlos para producir alcohol etílico por medio de la hidrólisis de estas moléculas y su posterior fermentación y purificación. A este tipo de etanol se le conoce como de segunda generación. *Zymomonas mobilis* al igual que todos los miembros del grupo de las Pseudomonas y la mayor parte de los microorganismos no es capaz de crecer en medios que contengan como fuente de carbono solamente polímeros de glucosa como el almidón y mucho menos, la celulosa.

Por tal motivo se hace necesario someter el material lignocelulósico a un proceso que haga posible su transformación [16], en la figura 5 se presenta el efecto deseado del pretratamiento, obsérvese que la estructura de la pared celular vegetal es completamente disgregada lo cual permitirá una acción enzimática más eficaz. La primera etapa de dicho proceso es un pretratamiento que tiene los siguientes objetivos [17]:

- Debe procurar una alta recuperación de carbohidratos estructurales.
- Debe propiciar que la lignina no represente una barrera física ni química para la hidrólisis de los carbohidratos.
- La hemicelulosa debe ser hidrolizada, de modo que los azúcares de 5 carbonos sean solubilizados, a menos que se realice una co-fermentación.
- La estructura cristalina de la celulosa debe ser modificada debiendo predominar las partes amorfas.
- Aumento de la porosidad del sustrato.

Para este fin existe una gran cantidad de procedimientos, que van desde los tratamientos mecánicos como la simple reducción de tamaño, o la extrusión; los fisicoquímicos como la explosión con vapor o con amonio (AFEX, "*amonía fiber explosión*"); y los químicos, como el tratamiento con ácido diluido, ozonólisis, tratamiento con organosolventes [18], líquidos iónicos y el tratamiento alcalino [19]. El efecto de todos los pretratamientos se muestra de manera esquemática en la Figura 4 [20]. En el pretratamiento alcalino se aprovecha el efecto que tienen las bases como el hidróxido de sodio, sobre la materia lignocelulósica. Puede ser llevado a cabo incluso a temperatura ambiente, y su tiempo de acción va desde unos cuantos segundos hasta varios días dependiendo de la temperatura. Funciona mejor para residuos agroindustriales que para maderas. Tiene la desventaja de que puede producir varios compuestos tóxicos y también puede haber pérdidas de azúcares fermentables. Produce aumento de volumen del sustrato a tratar y por ende aumento el área expuesta de las cadenas de celulosa, también disminuye el grado de cristalinidad y polimerización de las fibras [21]. Si se combina este tipo de pretratamiento con la acción de un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno es posible lograr que más de la mitad de la lignina y casi toda la hemicelulosa se solubilicen. Esta operación es fuertemente dependiente del pH y su máximo de efectividad está dado entre 11.5 y 11.6 [22].

Posterior al pretratamiento se hace necesario llevar a cabo un lavado o desintoxicación para eliminar las sustancias inhibitorias que se producen durante la fase anterior. Esta etapa depende del tipo de pretratamiento utilizado.

Como última preparación, se lleva a cabo la hidrólisis enzimática [23] para lograr la obtención de azúcares reductores que puedan ser utilizados por *Zymomonas mobilis* o cualquier otro microorganismo. Las enzimas utilizadas para este fin son biosintetizadas por microorganismos como la bacteria *Clostridium cellulovorans* o los hongos *Aspergillus niger* o *Trichoderma reesei* [22]. Este último es el microorganismo más usado para la obtención de celulasas [24]. Las enzimas

necesarias para la hidrólisis de celulosa se pueden catalogar en una de tres clases, las cuales forman complejos sinérgicos:

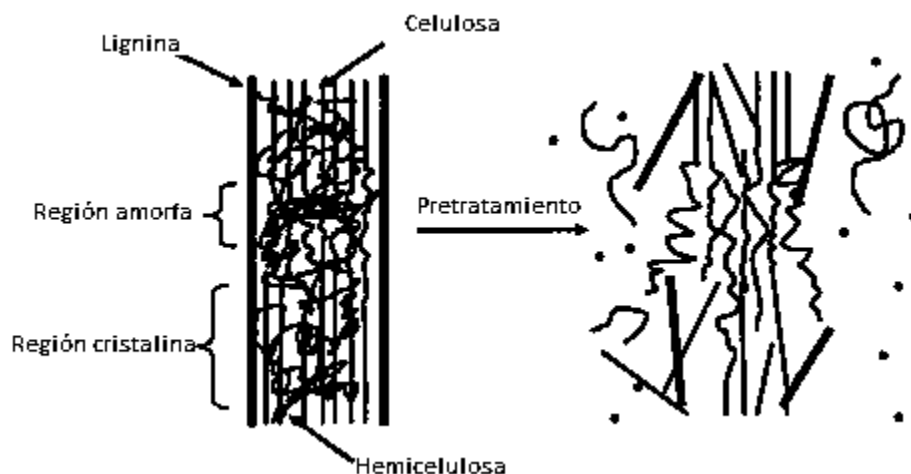


Fig.4. Representación esquemática del efecto del pretratamiento sobre el material lignocelulósico

- Endoglucanasas: que atacan regiones de baja cristalinidad en las cadenas de celulosa y producen oligosacáridos de cadenas variables.
- Exoglucanasas: que atacan los extremos de los oligosacáridos que producen las anteriores y generan moléculas de celobiosa (que son dímeros de glucosa unidos por enlace β 1-4)
- β -Glucosidasas: son las encargadas de separar los dímeros y producir glucosa libre para su aprovechamiento en la fermentación.
- Xilanasas, que son endoglucanasas con actividad 1-4 y 1-3, por lo tanto, son capaces de hidrolizar la Hemicelulosa.

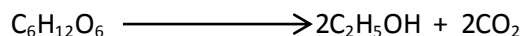
Estos tres tipos de enzimas están acopladas para trabajar en conjunto, ya que los oligosacáridos inhiben a las endoglucanasas, pero las exoglucanasas evitan su acumulación. Y lo mismo sucede con las otras dos. Es decir, el producto de una es sustrato de la otra. Sin embargo, si al final de la cadena existe una acumulación de glucosa, entonces toda la cadena se verá inhibida. Es por esta razón que se ha ideado la sacarificación y fermentación simultánea. En este arreglo se lleva a cabo en la misma unidad de reacción el proceso de rompimiento de celulosa hasta glucosa y también la transformación de glucosa en etanol por medio del microorganismo adecuado. Así, la glucosa producida por el complejo enzimático no inhibirá la sacarificación ya que será consumida por el microorganismo fermentador.

El mayor problema de esta técnica es que la sacarificación se lleva a cabo a una temperatura de 45 a 55 °C y un pH de 6.0. La fermentación con *Zymomonas mobilis* tiene sus condiciones óptimas a 30°C y pH de 6.0, de acuerdo a lo reportado se sugiere que las condiciones del proceso combinado sean de 30°C y pH de 6 [25]. Sin embargo, debido a que *Z. mobilis* es un organismo mesófilo se

podrían proponer otras condiciones a temperatura más elevada para favorecer la reacción de sacarificación.

1.3.4 Fermentación

Para producir etanol se utiliza fundamentalmente la vía biológica, mediante la cual un microorganismo fermenta los azúcares reductores en condiciones anaeróbicas para rendir etanol, anhídrido carbónico, agua y energía [14]. Si se utiliza glucosa como azúcar la reacción general de la fermentación puede escribirse como sigue:



Tradicionalmente, el microorganismo que se utiliza es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la cual utiliza la ruta de Embden-Meyerhoff [1]. Por dicha ruta se obtienen un par de moles de ATP por mol de Glucosa, lo cual hace que el rendimiento energético del microorganismo sea elevado mientras que el rendimiento de producción de etanol sea bajo. Por otro lado, *Zymomonas mobilis*, la cual es una bacteria gram negativa que pertenece al grupo de las Pseudomonas [26] utiliza la ruta de Entner-Duordoff de manera anaeróbica, por dicha ruta se produce tan solo una molécula de ATP por mol de Glucosa, y debido a eso se hace eficiente la producción de etanol sacrificando eficiencia energética disminuyendo así la cantidad de biomasa producida [27]. En la Figura 5 se puede observar un comparativo entre ambas rutas metabólicas, debido a esta diferencia, en todo momento, *Zymomonas mobilis* mantiene una tasa de metabolismo de glucosa entre tres a cinco veces más activo que el de *Saccharomyces cerevisiae* [25]. Una ventaja más es la alta resistencia de *Zymomonas mobilis* al producto final –etanol-, la cual es debida a la presencia de un alto contenido de hopanoides en su membrana plasmática [28]. Con este microorganismo se pueden obtener concentraciones de etanol en el mosto que rondan el 13% de alcohol en volumen.

Sin embargo, el uso de *Z. mobilis* está restringido a la fermentación de glucosa, fructosa y sacarosa; además de que requiere que el medio de cultivo contenga nitrógeno orgánico, ya que es la única forma en que puede aprovecharlo.

En algunas fuentes bibliográficas se cita a *Z. mobilis* como microorganismo capaz de fermentar pentosas [29], pero en general se acepta que las cepas silvestres no tienen esta capacidad; para lograr este tipo de metabolismo se debe recurrir a cepas modificadas genéticamente, tal como la cepa ATCC PTA 7858 [30].

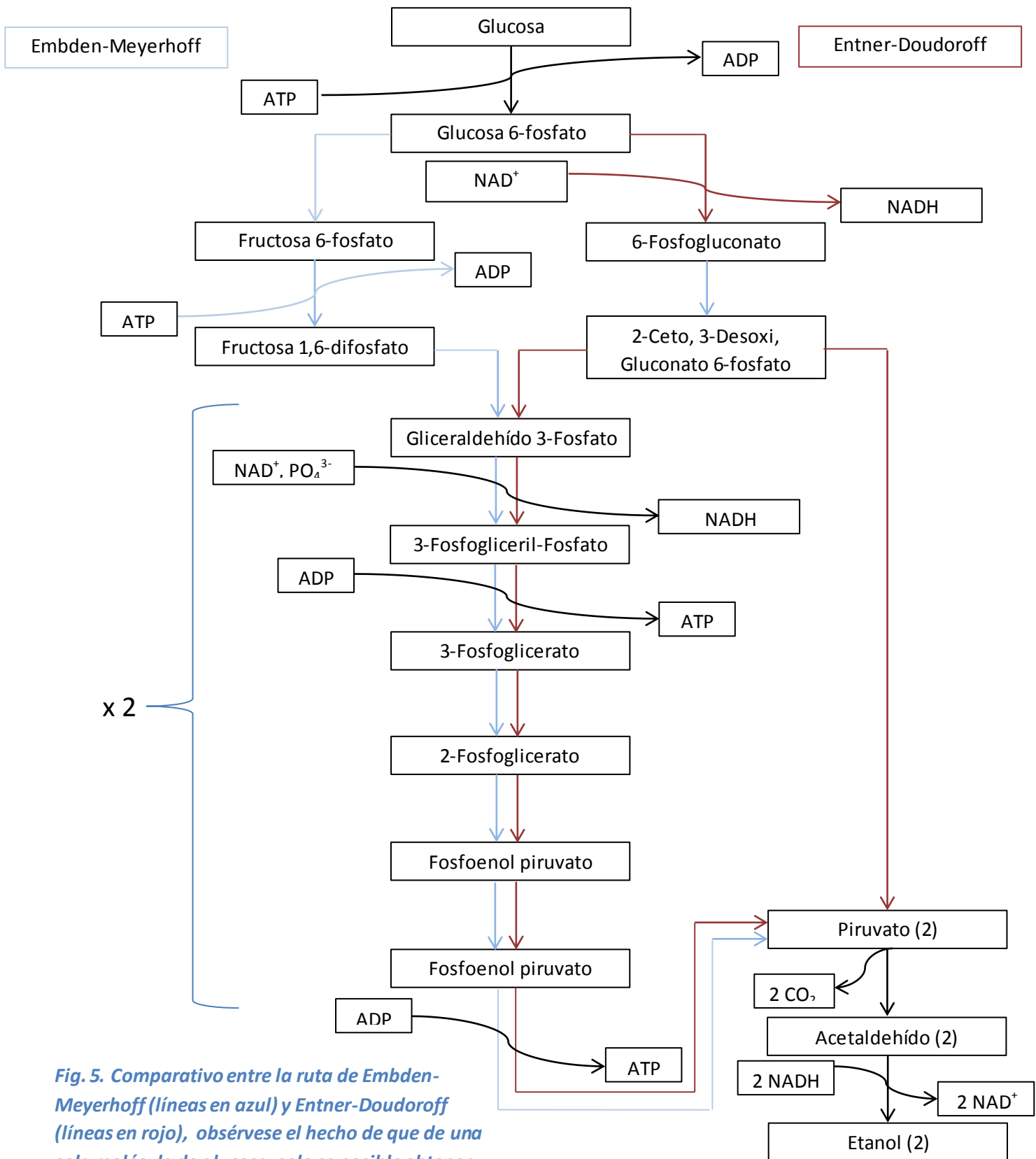


Fig. 5. Comparativo entre la ruta de Embden-Meyerhoff (líneas en azul) y Entner-Doudoroff (líneas en rojo), obsérvese el hecho de que de una sola molécula de glucosa, solo es posible obtener una de ATP.

1.3.5 Cultivos energéticos

Son plantas cultivadas específicamente para producir alguna clase de energía, la cual debe ser aprovechada bien sea por combustión directa, vía gasificación de los cultivos para producir calor y/o electricidad o convirtiendo la biomasa generada en algún tipo de biocombustible [31]. Para que un cultivo pueda ser denominado como cultivo energético debe cumplir con ciertas condiciones generales:

- **Adaptación:** Los cultivos deben ser adaptables para ser cultivados en tierras no aptas para la producción de alimentos y en áreas geográficas diversas.
- **Alta eficiencia:** los rendimientos de biomasa deben ser lo suficientemente altos para ser rentable y además el cultivo debe ser capaz de utilizar los nutrientes y recursos de manera eficiente, un cultivo energético no debe ser altamente demandante de agua ya que entra en competencia de recursos con los cultivos alimenticios.
- **Costos de producción bajos:** Los costos asociados a la producción del cultivo deben ser competitivos comparados con los costos presentados por las fuentes de energía convencional.
- **Balance energético positivo:** la energía que se extraiga del cultivo debe ser mayor a la utilizada para la propia producción de éste, además debe poder mejorar el balance medioambiental en relación a los cultivos tradicionales.
- **Naturaleza adecuada:** El cultivo debe ser el indicado para ser usado como materia prima en un proceso de producción de bioenergía en alguna de sus formas.

1.3.6 *Agave tequilana*

México se considera centro de origen del género *Agave* [32, 33], del que según Granados [34] existen 272 especies, mientras que otros autores reportan de 136 a 150 especies [32, 35]. Las especies de *Agave* se han utilizado para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas como alimento, fibras, forraje, medicamento, construcción y elaboración de bebidas alcohólicas [36]. Los agaves tienen una distribución amplia en ambientes limitantes (suelos someros, infértiles y secos), lo que puede colocarlos en peligro de extinción ([33]).

Agave tequilana es una especie de planta suculenta perteneciente a la antigua familia de las agaváceas ahora subfamilia Agavoideae, es monocárpico, florece sólo una vez en su vida y muere a continuación. La floración se produce después de una década. La planta produce un tallo floral de unos metros de altura, con numerosas umbelas de flores verdosas y tubulares verticales. La polinización depende exclusivamente de un murciélago *Leptonycteris nivalis*, un filostómido nectívoro [37].

Esta planta es usada principalmente para la producción de tequila en el occidente de México, bajo la legislación de ese país, solamente el *Agave tequilana azul webber* puede ser usado para la producción de dicha bebida espirituosa [38]. El resto de las especies podrán ser usadas para la producción de mezcal. La parte de la planta con el mayor interés comercial, lo constituyen las piñas, es decir el tallo de la planta, del cual se obtiene por medio del proceso de cocción un jarabe

rico en fructosa que se fermenta para la producción de tequila. Una vez realizada esta operación, se obtiene un residuo que según un estudio previo [39] tiene la tiene la composición mostrada en la Tabla 1 en base seca. Ese material no tiene ninguna aplicación importante y se considera un residuo del cual hay que disponer.

Tabla 1. Composición promedio del bagazo de Agave tequilana.

Parámetro	Medición promedio (% peso)	Error (%)
Cenizas	5.30	0.05
Lignina	21.10	0.07
Holocelulosa	73.6	1.13

Por lo tanto, es factible utilizar el pretratamiento alcalino oxidativo, debido a la baja cantidad de lignina presente.

Debido a la amplia utilización comercial de esta especie de agave la variabilidad genética se ha anulado casi en su totalidad, como lo demuestra el estudio de Gil-Vega [40], quien encontró que se cultivan prácticamente sólo clones con valores de disimilitud menores de 0.01. Este valor tan bajo es alarmante y puede conducir a la disminución de la viabilidad de la especie, por lo tanto es un aspecto a considerar en todas las posibles aplicaciones con fines comerciales.

1.4 Planteamiento del problema

La vida moderna no se puede concebir sin la energía; ésta se utiliza para cocinar los alimentos, calentar los hogares, transformar las materias primas en productos que a diario utilizamos y también para mover el transporte de bienes y personas. Sin embargo, la excesiva dependencia de los combustibles fósiles; principalmente el petróleo, ha traído consecuencias adversas como el calentamiento global y problemas político-económicos. Adicionalmente, el petróleo no es un recurso infinito ya que se estima que para 2050 su producción decaerá fuertemente.

Para hacer frente a esta coyuntura se ha optado por la utilización de las energías renovables, como la solar, eólica y la conversión de biomasa lignocelulósica en combustibles. En particular, esta última opción se presenta como una alternativa interesante. No obstante, presenta problemas de rendimiento que encarecen los productos finales. Por lo tanto, para hacer de esta alternativa verdaderamente sustentable y rentable, hace falta investigar formas que aumenten su eficiencia, tal como la integración de procesos. Particularmente, la producción de etanol se lleva a cabo en cuatro etapas, pretratamiento, hidrólisis de la materia prima hasta azúcares simples, fermentación de esos azúcares y purificación del etanol. Para la segunda y tercera etapa, los productos finales inhiben el proceso, y a su vez estos últimos son la materia prima del proceso siguiente.

1.5 Justificación

Dada la situación actual en materia de energéticos y siendo estos, un motor de desarrollo económico para las regiones donde son producidos se hace necesario realizar estudios encaminados a desarrollar nuevas tecnologías de producción de biocombustibles. Como se ha expuesto anteriormente, los puntos más débiles de este tipo de procesos son la eficiencia de la conversión de azúcares a etanol y la subsecuente etapa de purificación del producto es ahí donde se requiere implementar soluciones de ingeniería que ayuden a abatir costos y reducir emisiones para hacer de esta una tecnología realmente sustentable.

En el presente trabajo se propone la producción de etanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos de *Agave tequilana*. La parte central del proceso será un reactor donde se lleven a cabo dos procesos simultáneos; sacarificación y fermentación. Este tipo de configuración nace de la idea de que los procesos que retiran los productos de un proceso anterior evitan la inhibición por producto final lo cual redundará en una eficiencia mayor, reducción del tiempo de reacción y una baja en los costos de operación.

1.6 Hipótesis

La eficiencia de producción de etanol de segunda generación aumentara si se integran dos procesos consecutivos para su obtención, sacarificación y fermentación; utilizando a *Zymomonas mobilis* ATCC PTA 7858, como agente fermentador; y diferentes tipos de enzimas como biocatalizadores en la hidrólisis de holocelulosa; en una configuración tal que permita coexistir a ambos agentes sin disminuir considerablemente su desempeño.

1.7 Objetivo General

Proponer un proceso que sea capaz de producir etanol a partir de material lignocelulósico de agave por medio de un solo reactor que realice sacarificación y fermentación simultáneas para disminuir el impacto de la inhibición de la actividad enzimática.

1.8 Objetivos Particulares

- Caracterizar la composición del material lignocelulósico de partida.
- Determinar las concentraciones óptimas de reactivos para el pretratamiento alcalino-oxidativo por medio de un diseño experimental.
- Establecer y analizar un diseño experimental para hallar la combinación de enzimas óptima para el proceso de hidrólisis de material pretratado.
- Determinar el rendimiento de producción de etanol de *Zymomonas mobilis* ATCC PTA-7858 a diferentes temperaturas.
- Medir el desempeño de la reacción simultanea de sacarificación y fermentación en las condiciones de temperatura máxima a la cual se desarrolla *Zymomonas mobilis* ATCC PTA-7858 y compararlo con el rendimiento de la hidrólisis y fermentación separada.



2. Pretreatamienento

A lo largo del presente trabajo se utilizara el pretratamiento alcalino-oxidativo debido a que cambia eficazmente la estructura del material lignocelulósico dejando la celulosa en su forma amorfa, removiendo casi en su totalidad el contenido de lignina y dejando una buena parte de las hemicelulosas. Los reactivos utilizados para llevar a cabo este proceso fueron hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno, de modo tal que el primer problema es encontrar las concentraciones de reactivos que optimicen el pretratamiento; es decir, que maximicen la producción de azúcares simples tras la hidrólisis, que minimicen la cantidad de lignina residual y que minimice la cantidad de polisacáridos removidos.

2.1 Metodología

2.1.1 Obtención del material y tratamiento previo

La biomasa lignocelulósica se obtuvo de la mezcalera “Ex hacienda de Zacapendo” como residuo de la cocción de piñas de *Agave tequilana*. Posteriormente se secó a una temperatura de 80°C por 24 horas en un horno eléctrico Novatech y finalmente se redujo su tamaño parcialmente en un molino de cuchillas genérico de 1500 W para obtener tamaños de fibras heterogéneos que van de 15 a 3 mm de largo con diámetros de 0.3 mm. Cabe señalar que no se utilizó ninguna clase de tamiz para reducir al máximo el consumo de energía de la molienda. Se determinó la composición del material lignocelulósico por triplicado.

2.1.2 Pretratamiento

Se trató el material seco y molido con diferentes combinaciones de reactivos, las cuales fueron obtenidas por medio de un diseño factorial 2^3 como se observa en la Tabla 2.

Se utilizaron 10g de bagazo seco y molido, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se le agregó 100 ml de hidróxido de sodio a la concentración especificada por el diseño (Tabla 2). Se trató dicha mezcla a 121°C y 2 atm absolutas de presión por 60 minutos. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le agregaron 100 ml de la solución de peróxido de hidrógeno especificado por el diseño. Esta mezcla se dejó reposar por 24 horas a 30°C en una estufa bacteriológica marca Precision. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Una vez transcurrido ese tiempo, se acidifico la mezcla con ácido clorhídrico concentrado (al 36.9%) hasta un pH de 5.0, se secó y pesó. La operación de secado se llevó a cabo solamente para cuantificar la pérdida de peso, sin embargo para el proceso de hidrólisis, la materia prima se utiliza húmeda para evitar los cambios de estructura por efecto del secado [41]. A cada uno de los materiales resultantes de los pretratamientos se les determinó su contenido de lignina Klason.

2.1.3 Hidrólisis enzimática

Para la hidrólisis enzimática, se utilizó la enzima Celluclast 1.5L de Novozymes. Se agregaron 2 gramos de material pretratado, 1 ml de enzima y 20 ml de solución buffer de citratos 0.05 M pH = 5.0. Dicha mezcla se conservó 72 horas a 50°C con una agitación de 150 rpm en un shaker orbital marca Polyscience; al final de ese lapso se analizó el sobrenadante por un método estandarizado en un equipo HPLC marca Varian Pro Star, utilizando una columna Metacarb 87 C a 70°C y un detector de índice de refracción a 50°C con flujo isocrático de agua a 1 ml/min para determinar azúcares simples y celobiosa con la cual se pretende modelar los oligosacáridos de cadena corta

solubles. Posterior a la hidrólisis se filtró, lavó y secó el residuo sólido.

Tabla 2. Diseño experimental para las concentraciones de reactivos en el pretratamiento alcalino-oxidativo

Número de pretratamiento	NaOH (% p/v)	H ₂ O ₂ (% p/v)
1	2	2
2	2	6
3	2	10
4	6	2
5	6	6
6	6	10
7	10	2
8	10	6
9	10	10

2.2 Resultados y discusión

2.2.1 Composición del bagazo de *Agave tequilana*

La composición del material lignocelulósico se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición del material lignocelulósico inicial.

Componente	Cantidad (% w/w)
Material Soluble	44.29 ± 0.93
Lignina	13.57 ± 0.18
Cenizas	2.07 ± 0.08
Holocelulosa	40.07 ± 0.77

Obsérvese que en el bagazo obtenido como residuo de la producción tequilera existe una gran cantidad de material soluble, el cual se puede remover por simple ebullición con agua. Esta materia soluble está constituida principalmente por inulina, ya que se llevó a cabo un proceso de lixiviación con agua saturada a 120°C y se analizó el sobrenadante por medio de HPLC con el método estandarizado. En estas condiciones apareció un pico a los 5 minutos, el cual se comparó con una muestra de Inulina grado comercial, correspondiéndose el tiempo de retención con la muestra problema. No se llevaron a cabo determinaciones cuantitativas de este compuesto. Los resultados obtenidos del análisis corresponden con los datos obtenidos con Lisha Yang [42] quien reporta 13.8±1.3% de lignina, 43.8±1.3% de holocelulosa y 6% de cenizas y Kestur G. [39] quien reporta 21.10±1.13% de lignina, 73.6±0.01% de holocelulosa y 5.3±0.07% de cenizas en base seca

y libre de solubles.

2.1.2 Pretratamiento alcalino-oxidativo

Realizando el procedimiento establecido para el pretratamiento alcalino-oxidativo para el bagazo de *Agave tequilana* se llegó a los resultados mostrados en la Tabla 4. Cabe señalar que los porcentajes de material removido mostrados se calcularon en base a masa libre de material soluble. Considérese además que los datos presentados son el promedio de tres corridas del mismo experimento.

Tabla 4. Tabla del diseño factorial 2³ con resultados de porcentaje de material removido en base libre de extraíbles y lignina residual.

Número	NaOH (% p/v)	H ₂ O ₂ (% p/v)	Material removido (%)	Lignina residual (%)
1	2	2	10.14 ± 0.28	11.13 ± 1.01
2	2	6	18.62 ± 0.32	14.18 ± 0.89
3	2	10	15.63 ± 0.16	12.64 ± 0.77
4	6	2	22.27 ± 0.23	6.34 ± 0.21
5	6	6	32.43 ± 0.37	8.24 ± 0.32
6	6	10	25.87 ± 0.27	5.71 ± 0.17
7	10	2	28.95 ± 0.34	5.24 ± 0.12
8	10	6	43.75 ± 0.64	6.31 ± 0.06
9	10	10	32.01 ± 0.42	5.3 ± 0.08

Obsérvese que el porcentaje de remoción de material es directamente proporcional a la concentración de hidróxido de sodio, tal como se reporta en estudios previos [43]. Pero la tendencia con respecto a la concentración de peróxido de hidrógeno, muestra un máximo a una concentración de 6% (w/v), lo cual va ligado fuertemente a la tendencia de la solubilización de la lignina. Los sobrenadantes resultantes se analizaron por HPLC en con el método antes mencionado. En todos los casos se encontraron trazas de azúcares simples y una gran cantidad de inulina, la cual no fue cuantificada por carecer de estándar primario.

2.1.3 Hidrólisis enzimática

Los resultados de la hidrólisis de cada uno de los sólidos pretratados por el método alcalino-oxidativo se muestran en la Tabla 5.

Nótese que el máximo de hidrólisis se encuentra en una concentración intermedia de hidróxido de sodio y de peróxido de hidrógeno. Esto se debe a que a bajas concentraciones de reactivos hay poca disgregación de la estructura del material lo que impide la acción de las enzimas. Sin embargo, si la concentración de reactivos es muy alta, entonces se consigue una gran destrucción de la matriz lignocelulósica pero a la par también se producen compuestos nocivos que inhiben la actividad enzimática. Según Stuart Wilkinson [44], la cantidad de azúcares reductores obtenidos esta alrededor de 30 a 40 g/l, para la hidrolisis de residuos de granos de malta pretratado con un

método alcalino oxidativo similar. En la mayoría de los pretratamientos aquí propuestos, se logra igualar o superar esta cantidad.

Tabla 5. Rendimiento del proceso de hidrólisis de para cada uno de los pretratamientos.

Número	NaOH (% p/v)	H ₂ O ₂ (% p/v)	Azúcares en el hidrolizado (g/L)	% Rendimiento
1	2	2	33.82 ± 1.04	34.36 ± 1.04
2	2	6	38.30 ± 0.74	40.57 ± 0.74
3	2	10	35.65 ± 0.57	37.10 ± 0.57
4	6	2	49.03 ± 0.67	47.60 ± 0.67
5	6	6	56.02 ± 0.92	55.50 ± 0.92
6	6	10	54.92 ± 1.16	52.95 ± 1.16
7	10	2	12.33 ± 0.97	11.83 ± 0.97
8	10	6	16.78 ± 0.82	16.28 ± 0.82
9	10	10	13.68 ± 0.77	13.13 ± 0.77

Ahora bien, un pretratamiento eficiente es aquel que maximiza la producción de azúcares en la hidrólisis, a la vez que elimina la menor cantidad de polisacáridos y que al mismo tiempo maximiza la cantidad de lignina removida, la combinación de estas condiciones da un rendimiento alto.

2.1.4 Balance del proceso y análisis estadístico.

Para llevar a cabo este análisis partiremos del balance de materia del proceso global, el cual puede ser representado por el diagrama de bloques de la figura 6, donde todos los sólidos están en gramos y las corrientes líquidas en mililitros.

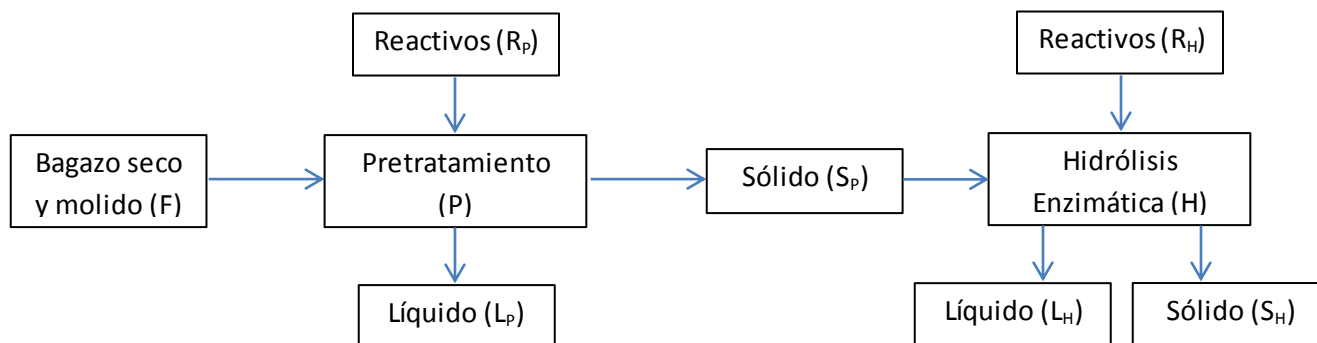


Fig. 6 Diagrama de bloques para el proceso de pretratamiento e hidrólisis.

Realizando un balance de materia alrededor del pretratamiento tenemos que:

$$S_p = F x_p \quad (1)$$

y

$$L_P = Fy_P + \rho_{RP}R_P \quad (2)$$

Donde x_P es la fracción de sólido que permanece después del pretratamiento e y_P es la fracción removida por este; ρ_{RP} , es la densidad de los reactivos agregados. Por otro lado, a la hidrólisis enzimática entra un material que prácticamente está compuesto de una mezcla de polisacáridos y lignina. Por lo que la entrada de polisacáridos es:

$$PS_P = S_P(1 - f_{lig}) = Fx_P(1 - f_{lig}) \quad (3)$$

Donde f_{lig} es la fracción de lignina en la alimentación de la hidrólisis.

Para calcular la cantidad de azúcares reductores que podrían obtenerse de la alimentación si todos los polisacáridos se hidrolizaran a monosacáridos se multiplica la cantidad de polisacáridos alimentados por un factor de 1.1, el cual representa que por cada mol de glucosa separada de una cadena de celulosa se agrega un mol de agua. Para hemicelulosas el factor es ligeramente más grande pero para fines prácticos la diferencia se desprecia. Entonces se pueden calcular los monosacáridos teóricos como:

$$MS_{Teo} = 1.1 * [Fx_P(1 - f_{lig})] \quad (4)$$

La cantidad real de monosacáridos obtenidos por el proceso de hidrólisis es:

$$MS = C_{LH} * R_H \quad (5)$$

Donde C_{LH} es la concentración de azúcares en el líquido resultante de la hidrólisis. De esta manera el rendimiento del proceso de hidrólisis es:

$$\eta_H = \frac{MS}{MS_{Teo}} = \frac{C_{LH} * R_H}{1.1 * [Fx_P(1 - f_{lig})]} \quad (6)$$

Los valores de esta variable para cada prueba se enlistan en la tabla 5, al igual que las concentraciones de azúcares reductores obtenidos. Ahora bien, la expresión anterior no considera que durante el pretratamiento existe pérdida de polisacáridos que ya no pueden ser utilizados para obtener azúcares simples, por lo tanto es necesario aplicar un factor de corrección dado por la relación de polisacáridos que permanecen después del pretratamiento a la cantidad de polisacáridos originales. Los polisacáridos después del pretratamiento están dados por la ecuación (3) y los polisacáridos originales están dados por:

$$PS_F = Fc_{PS} \quad (7)$$

Donde c_{PS} es la cantidad de holocelulosa determinada en la muestra inicial, molida y seca. De esta manera el factor de corrección necesario es:

$$\alpha = \frac{PS_P}{PS_F} = \frac{Fx_P(1 - f_{lig})}{Fc_{PS}} = \frac{x_P(1 - f_{lig})}{c_{PS}} \quad (8)$$

Por lo tanto, la eficiencia global del proceso de pretratamiento-hidrólisis es:

$$\eta_G = \alpha\eta_H = \left[\frac{x_P(1-f_{lig})}{c_{PS}} \right] \left\{ \frac{C_{LH} * R_H}{1.1 * [F x_P(1-f_{lig})]} \right\} = \frac{C_{LH} * R_H}{1.1 * c_{PS} * F} \quad (9)$$

Esta variable involucra a todos los parámetros obtenidos de las pruebas efectuadas y representa la fracción de polisacáridos contenidos en el bagazo inicial que se convirtieron en azúcares simples, por lo tanto se declara como la variable de respuesta del diseño experimental. Analizando estadísticamente estos datos, se llega a la conclusión de que el mejor pretratamiento con un 95% de certeza, es el número 6, es decir, la combinación de 6% de hidróxido de sodio y 10% de peróxido de hidrógeno.

Finalmente se realizó un balance de materia global del proceso óptimo de pretratamiento e hidrólisis, este balance incluye las tres corrientes resultantes:

- El efluente del pretratamiento, el cual consta básicamente de lignina disuelta (y probablemente despolimerizada), inulina, productos de la degradación de polisacáridos y otros compuestos solubles. La cantidad total de materia removida por el pretratamiento incluye a estos cuatro componentes, sin embargo, en el balance se muestran valores en base libre de material soluble.
- El sobrenadante del proceso de hidrólisis, el cual consta de una solución de azúcares simples (principalmente glucosa y solo una pequeña parte de xilosa) y pequeños oligosacáridos (principalmente celobiosa).
- El sólido residual después de la hidrólisis, el cual consta de toda la lignina que el pretratamiento no pudo remover y los polisacáridos no hidrolizados.

Para una base de 10 g de material lignocelulósico libre de solubles, utilizando el pretratamiento elegido y posteriormente hidrolizando con el procedimiento estándar; se obtuvieron 4.07 gramos de azúcares simples y 2.85 g de oligosacáridos (determinados como celobiosa), resultando 2.42 gramos de sólido residual. El efluente del pretratamiento contiene todo el material restante, el cual se calculó por la diferencia del material sólido posterior al pretratamiento y el material inicial, el cual corresponde a 2.59 gramos. De esta manera es posible calcular la cantidad de azúcares reductores obtenidos, equivalentes a 407 gramos por kilogramo de material lignocelulósico libre de solubles. En el estudio de Mathew [45] se logra un rendimiento de 440 g/kg de azúcares reductores, partiendo de paja de semillas oleaginosas pretratadas con un método alcalino, sin embargo para la hidrólisis utilizaron además de Celluclast 1.5, la enzima Novozyme 188, demostrando que con la utilización de diferentes tipos de enzimas es posible lograr sinergias entre ellas que redunden en un aumento en la productividad de azúcares, tal y como lo menciona Bals [46] quienes hidrolizaron pasto de pradera pretratado por medio de explosión de amoníaco y obtuvieron entre 450 y 500 g de azúcares por kilogramo de biomasa lignocelulósica.



3. Hidrólisis

En la sección anterior se llevó a cabo la hidrólisis de material lignocelulósico de *Agave tequilana* pretratado con el método alcalino oxidativo optimizado; sin embargo, los resultados son poco satisfactorios, tanto en concentración de azúcares en el hidrolizado como en rendimiento total. Un estudio similar utiliza la explosión de fibras por amoníaco (AFEX) para tratar material lignocelulósico de pasto de pradera tomado de varias estaciones y ubicaciones [46]. En este estudio se utilizan las enzimas Acellerase, Novozyme 188, Multiefect Xilanase, Multiefect Pectinase. Con esta configuración se logran entre 400 y 500 g de azúcares reductores por kilogramo de material lignocelulósico, dependiendo de la estación y el lugar de donde fueron tomadas las muestras. Por otro lado en el trabajo de Equihua [17] se reportan concentraciones de azúcares reductores cercanos a los 80 g/l utilizando la enzima Acellerase 1500 actuando sobre bagazo de sorgo dulce pretratado con los mismas condiciones del presente trabajo, es por esta razón que para continuar se pretende crear sinergias entre diferentes tipos de enzimas tal como lo proponen Hu y cols. [47], donde utilizaron Celluclast 1.5 L, Novozyme 188 y Multiefect Xilanase en combinación, alcanzando conversiones cercanas al 70 %. En base a esta información se utilizó Celluclast 1.5 L, como celulasa; Novozyme 188, como beta-glucosidasa; y Viscozyme L, como Xilanasa. Por otro lado, también se propone la utilización de las enzimas de nueva generación Cellic CTec 3 y Cellic HTec3. Ambos son complejos enzimáticos que incluyen todas las enzimas necesarias para lograr altos grados de despolimerización de las fibras.

3.1 Metodología

3.1.1 Hidrólisis utilizando combinación de enzimas

Para mejorar el rendimiento de producción de azúcares reductores se planteó un arreglo ortogonal L8 de dos niveles y tres factores. Dicho arreglo ortogonal se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Arreglo Ortogonal L8 de dos niveles para el estudio de la hidrólisis enzimática.

Experimento	Cantidad de enzima (ml/g material)		
	Viscozyme L	Celluclast 1.5 L	Novozyme 188
1	0.1	0.1	0.1
2	0.1	0.1	0.5
3	0.1	0.5	0.1
4	0.1	0.5	0.5
5	0.5	0.1	0.1
6	0.5	0.1	0.5
7	0.5	0.5	0.1
8	0.5	0.5	0.5

A manera de comparativo se llevó a cabo la hidrólisis del mismo material pretratado con una combinación de enzimas de última generación, las cuales fueron generosamente donadas por Novozymes. Estas enzimas son Cellic CTec 3 y Cellic HTec 3, en la hoja de aplicación de estas, se

recomienda que la cantidad a emplear sea de entre el 5 y 10 % del peso del material a hidrolizar. Es por este motivo que se planteó otro arreglo ortogonal L4 para analizar el efecto combinado de estas dos enzimas. La serie de experimentos se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Arreglo Ortogonal L4 de dos niveles para el estudio de la hidrólisis enzimática.

Experimento	Cantidad de enzima (Porcentaje en peso del material a hidrolizar)	
	CTec 3	HTec 3
1	6	3
2	6	6
3	9	3
4	9	6

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en un Shaker orbital marca Polyscience a una temperatura de 50°C y pH de 5.0 en buffer de citratos 0.05 M. La relación de sólido a líquido fue en todos los casos de 1:5. El tiempo de reacción fue de 72 horas, al final de ese periodo se tomó una muestra, la cual se analizó por medio de un método estandarizado en un equipo HPLC marca Varian Pro Star, utilizando una columna Metacarb 87 C a 70°C y un detector de índice de refracción a 50°C con flujo isocrático de agua a 1 ml/min para determinar azúcares simples y celobiosa. Al final de la hidrólisis se filtró, lavó y secó el residuo sólido, al cual se le determinó lignina Klason.

3.1.2 Cinética de reacción

Para la determinación de la cinética enzimática, se realizó un experimento de hidrólisis por triplicado en buffer de citratos 0.05 M y pH de 5.0. La relación de material pretratado a líquido fue de 1:5. Se utilizó la combinación óptima de enzimas y se mantuvo la temperatura a 50°C con agitación de 150 rpm en un Shaker orbital marca Polyscience. Se tomaron muestras a las 1, 6, 24, 48 y 72 horas; las cuales se analizaron por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Análisis de los diseños experimentales

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la hidrólisis enzimática con la combinación de enzimas ternaria (Celluclast 1.5 L, Novozyme 188 y Viscozyme L); y en la Tabla 9 los resultados del experimento con las enzimas de última generación (Cellic CTec 3 y Cellic HTec 3) se muestran los datos obtenidos a lo largo de todo el experimento como promedios de tres corridas.

Analizando los datos de concentración de azúcares totales a las 72 horas por medio de la metodología Taguchi de índice de señal a ruido, se llegó a la conclusión de que la mejor combinación de enzimas para maximizar la cantidad de azúcares simples liberados es la representada por el experimento número 3, es decir, por cada gramo de muestra se necesitan

agregar 0.5 ml de Celluclast 1.5 L, 0.1 ml de Viscozyme L y 0.1 ml de Novozyme 188.

Al ser analizados con la misma metodología, los resultados obtenidos de la utilización de las enzimas Cellic, muestran que la mejor combinación de enzimas es la número 2; 6% de Cellic Ctec 3 y 6% de Cellic HTec 3.

Tabla 8. Resultados del diseño experimental con las enzimas Viscozyme, Celluclast 1.5L y Novozyme 188.

Cantidad de enzima (ml/g material)				Azúcares reductores obtenidos (g/l)		
No.	Viscozyme L	Celluclast 1.5 L	Novozyme 188	72 h		
1	0.1	0.1	0.1	106.64	±	2.04
2	0.1	0.1	0.5	98.65	±	1.96
3	0.1	0.5	0.1	128.07	±	1.15
4	0.1	0.5	0.5	121.95	±	1.57
5	0.5	0.1	0.1	112.79	±	2.45
6	0.5	0.1	0.5	110.46	±	1.05
7	0.5	0.5	0.1	118.07	±	2.58
8	0.5	0.5	0.5	116.98	±	0.89

Tabla 9. Resultados del diseño experimental utilizando las enzimas Cellic de Novozymes.

Experimento	Concentración de enzima (% en peso de material a hidrolizar)		Azúcares obtenidos (g/l)		
	Ctec 3	HTec 3	72 h		
1	6	3	126.92	±	2.34
2	6	6	165.67	±	2.26
3	9	3	151.81	±	1.98
4	9	6	142.24	±	2.55

Los resultados de los diseños experimentales condujeron a combinaciones de enzimas que son óptimas en su correspondiente serie, sin embargo, aunque ambas combinaciones mejoran el grado de despolimerización obtenido con la sola aplicación de Celluclast 1.5 L (56.02 g/l), sólo con la utilización de las enzimas Cellic se logra minimizar la cantidad de enzima utilizada. Por tal motivo, se concluye que para hidrolizar un gramo de material pretratado con el método alcalino oxidativo, se requieren 60 mg de Cellic Ctec 3 y 60 mg de Cellic HTec 3 con un rendimiento de hidrólisis de 82.21 % y obteniendo 632.18 g de azúcares por kilogramo de bagazo de *Agave tequilana* libre de solubles. Estos datos se obtuvieron con el balance propuesto en la sección anterior, el cual se muestra a detalle a continuación.

3.2.2 Balance del proceso

En el siguiente diagrama de flujo se enlistan todas las corrientes y sus composiciones que forman parte de los dos procesos que se han optimizado. Dicho balance se realizó con una base de cálculo de 10 gramos de bagazo libre de material soluble y humedad. Obsérvese que la diferencia entre la suma del balance y el material inicial es de alrededor del 4%.

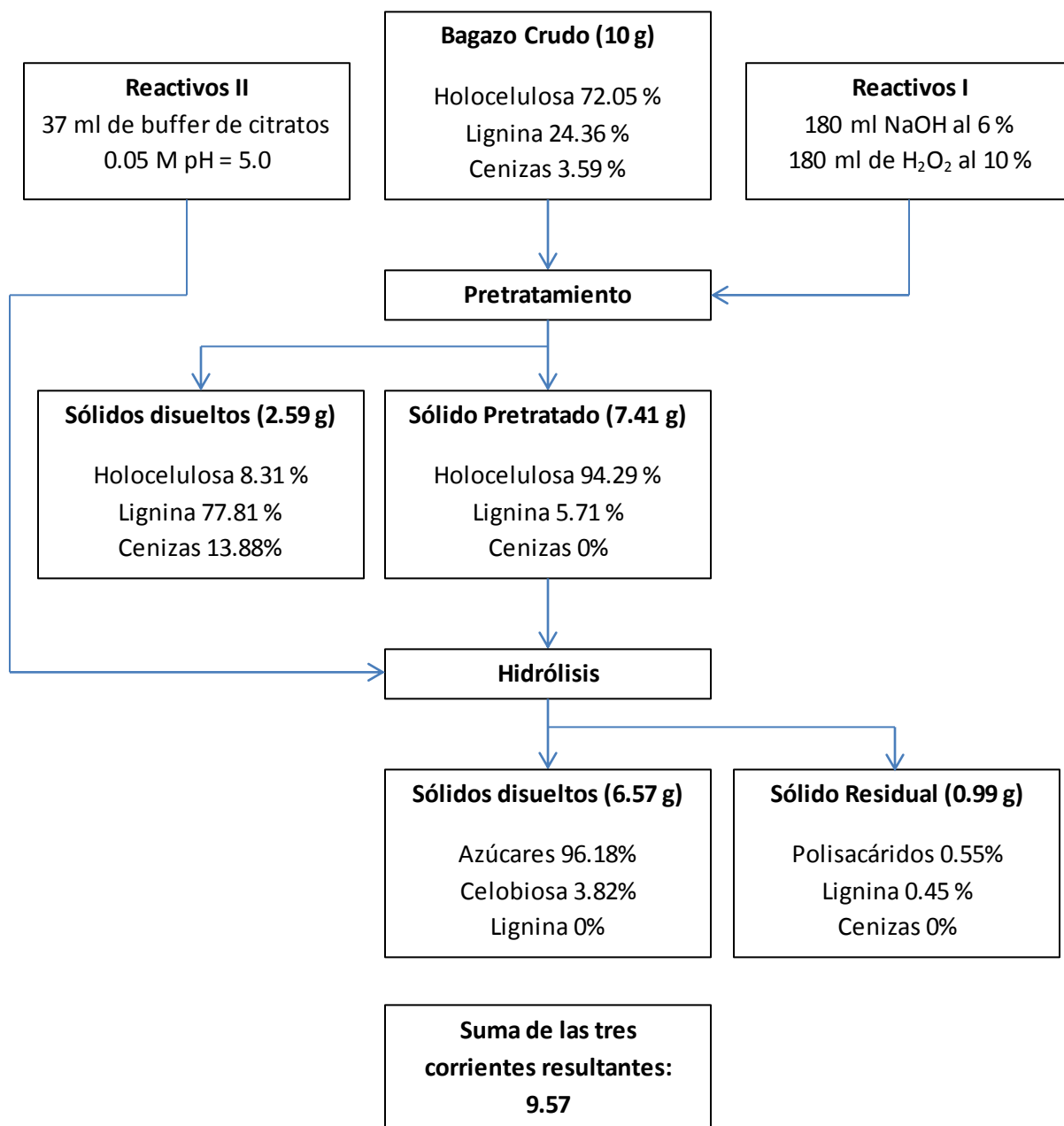


Fig. 7. Diagrama de flujo de los procesos de pretratamiento e hidrólisis, con el balance de materia correspondiente

3.2.3 Cinética de reacción

Una vez que se ha encontrado un óptimo en la combinación de enzimas, es necesario aproximar los resultados experimentales para un futuro escalamiento del proceso. Debido a que las soluciones comerciales utilizadas son en sí mismas combinaciones de enzimas de las cuales no se conocen las composiciones y tipos de enzimas que la forman, no es posible determinar la cinética de Michaelis Menten. Por otro lado, en la hidrólisis ocurren al menos las siguientes reacciones:

- La ruptura de las cadenas de celulosa en oligosacáridos de longitud variable.
- La conversión de las cadenas de oligosacáridos en celobiosa.
- El desdoblamiento de las moléculas de celobiosa en glucosa.
- La hidrólisis de la Hemicelulosa.

Cada reacción es catalizada por un tipo de enzima específica y la concentración de cada uno de los reactivos en cuestión es difícil de medir en un instante determinado. Así que para la construcción del modelo cinético, únicamente se tomaran en cuenta el efecto global del conjunto de enzimas, el cual consiste en la ruptura de la holocelulosa en azúcares simples –o reductores-.

En la Tabla 10, se enlistan las concentraciones de azúcares totales obtenidas en este experimento, se muestran los promedios de las tres corridas.

Tabla 10. Datos para la construcción de la cinética de las enzimas Cellic.

Tiempo (h)	1	6	24	48	72
Azúcares totales (g/L)	8.98 ± 1.56	59.68 ± 2.44	123.56 ± 3.67	148.98 ± 3.37	170.34 ± 3.08

Debido a que la velocidad de las reacciones enzimáticas está relacionada con la concentración del sustrato, entonces se calculó la concentración de polisacáridos [S] según la ecuación (10)

$$[S] = \frac{\{w_0 \cdot (1 - f_{lig})\} - [P]/1.1}{V_R} \quad (10)$$

Donde w_0 , es el peso de material pretratado inicial en gramos; f_{lig} , es la fracción de lignina en el sólido inicial, [P], es la concentración en gramos por litro de azúcares totales en el instante en el que se quiere calcular [S]; V_R , es el volumen total de reacción que incluye la humedad contenida entre las fibras de material pretratado y el buffer de citratos agregado hasta completar la relación de solido-liquido deseada. EL factor 1.1 es adimensional y representa el hecho de que por cada mol de azúcares que se hidroliza es necesario un mol de agua.

Haciendo este cálculo para cada instante con una base de cálculo de 1 l de volumen total de reacción, se obtuvieron los datos de la Tabla 11. Los cuales fueron ajustados a una cinética de segundo orden, de la forma de la ecuación (11).

$$\frac{d[S]}{dt} = -k[S]^2 \quad (11)$$

Tabla 11. Variación de la concentración de sustrato con el tiempo.

t (h)	0	1	6	24	48	72
[S] (g/L)	188.58	180.42	134.33	76.25	53.14	33.73

Donde [S] es la concentración de sustrato (polisacáridos), t es el tiempo de reacción en horas y k es la constante de velocidad por determinar en litro por gramo-hora (L/g*h). Integrando la ecuación (11) se llegó a:

$$\frac{1}{S} = kt - \frac{1}{S_0} \quad (12)$$

La cual puede ser transformada a una recta con la constante de reacción como pendiente y al inverso de la concentración inicial como intersección al origen. Numéricamente, la linealización se hizo graficando el tiempo contra los inversos de la concentración. Dicha gráfica se muestra en la Figura 8.

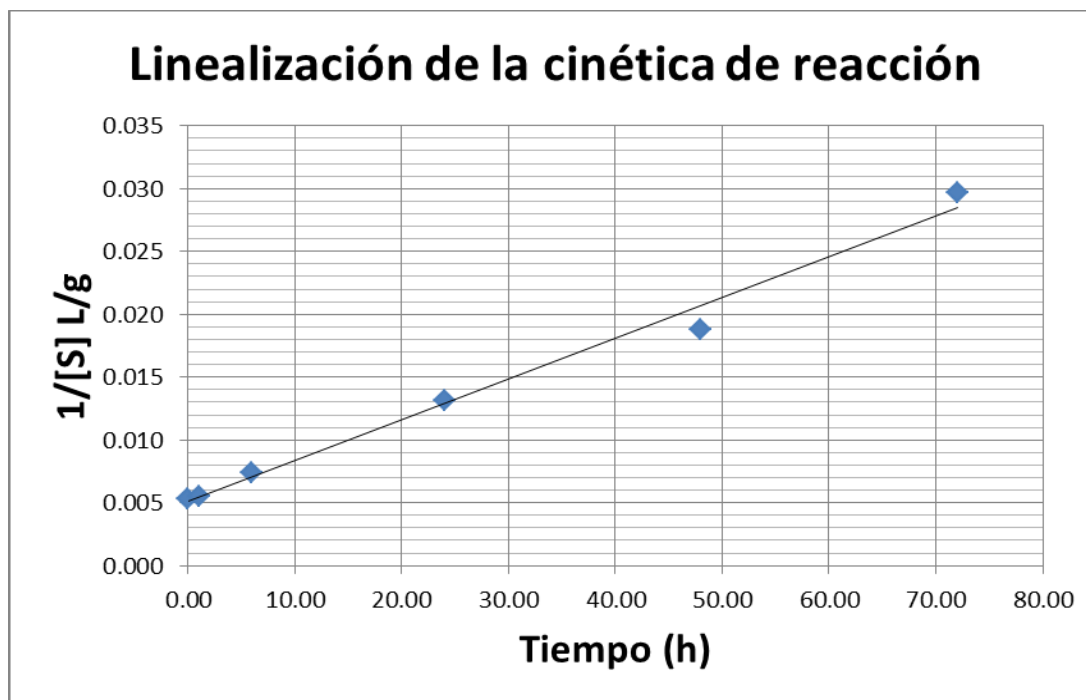


Figura 8. Representación gráfica del tiempo vs el inverso de la concentración de sustrato.

Con esta transformación matemática se realizó un ajuste de mínimos cuadrados llegándose a un valor de $k = 3.25 \times 10^{-4}$ L/g*h. Con un coeficiente de correlación de 0.9888.



4. Fermentación

Una vez que se han optimizado las etapas de pretratamiento e hidrólisis para la obtención de azúcares simples, la vía para obtener etanol es la fermentación alcohólica. Para dicho fin se utilizó la bacteria *Zymomonas mobilis* ATCC PTA 7858 por su capacidad de fermentar pentosas. Esta bacteria utiliza la vía de Entner-Duodoroff por lo que su metabolismo es rápido, característica que se utilizó para reducir los tiempos de reacción considerablemente. El rendimiento teórico de la reacción de fermentación es del 51 %, es decir, por cada gramo de azúcares se pueden obtener como máximo 0.51 g de etanol. El rendimiento real para *Zymomonas mobilis* es mayor que para otros microorganismos fermentadores y por esa razón se espera que el rendimiento de producción global aumente.

4.1 Metodología

4.1.1 Microorganismo y medio de cultivo

Como microorganismo fermentador se usó una cepa modificada de *Zymomonas mobilis* (ATCC PTA-7858) la cual es capaz de fermentar pentosas.

Las condiciones óptimas de crecimiento de este organismo son temperatura de 30°C, pH de 6.0, requiere la presencia de nitrógeno orgánico e iones magnesio para sobrevivir. Por lo tanto, se propone el siguiente diseño de medio de cultivo:

- Extracto de levadura, 10 g/L
- Fosfato monobásico de potasio, 2 g/L
- Sulfato de amonio, 5 g/L
- Sulfato de magnesio heptahidratado, 0.5 g/L
- Glucosa, 40 g/L
- Xilosa, 40 g/L

Finalmente, se ajustó el medio a pH de 6 con hidróxido de sodio 1M o ácido clorhídrico 1M.

4.1.2 Cinética Microbiana

El cultivo se realizó primeramente a las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria en matraces Erlenmeyer de 500 ml con un volumen inicial de 150 ml de medio fresco y estéril. Se muestreo a las 6, 24, 48, 72 y 96 horas para determinar la cantidad de azúcares reductores residuales y etanol por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución y se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer. El inóculo inicial será tomado de un cultivo primario con 24 horas de desarrollo donde se cuenten 1×10^9 células por mililitro. El tamaño del inóculo será de 3 ml en todos los casos, es decir, el equivalente al 2% del volumen inicial de medio fresco. Este procedimiento será realizado por triplicado.

4.1.3 Determinación de la tolerancia a la temperatura

Para determinar el máximo de temperatura al que *Z. mobilis* es capaz de crecer y mantener una producción de etanol considerable se propone cultivarla a diferentes temperaturas que van desde los 30°C, 35°C y hasta 40°C, cada corrida será cultivada por un tiempo de 48 horas. Al final de todas las corridas se medirán azúcares reductores por DNS y etanol por cromatografía de líquidos

de alta resolución.

4.1.4 Procesos de sacarificación y fermentación separadas

Se realizó una hidrólisis de material tratado con la combinación de reactivos óptima, sin embargo el líquido adicionado fue formulado como sigue:

- Extracto de levadura, 10 g/L
- Fosfato monobásico de potasio, 2 g/L
- Sulfato de amonio, 1 g/L
- Sulfato de magnesio heptahidratado, 0.5 g/L

Posteriormente, se ajustó a un pH de 5.0 con ácido clorhídrico 1.0 M, en este caso se prescindió del buffer de citratos, debido a que en pruebas preliminares se determinó que *Zymomonas mobilis* no es capaz de crecer con la presencia del ion citrato en su medio. Finalmente este medio se esterilizó y se agregó al material pretratado (también estéril) en proporción 1:5. Se adicionaron las cantidades de enzimas Cellic optimizadas (6% de Ctec 3 y 6% de Htec 3) y se colocaron en un shaker orbital a 50°C por un lapso de 72 horas con agitación de 150 rpm. Al finalizar este periodo, se tomó una muestra y se realizó la inoculación con el cultivo primario de *Zymomonas mobilis*. Se ajustó la temperatura del shaker orbital a 30°C y se mantuvo en agitación a 150 rpm por 72 horas. Cada 24 horas se tomó una muestra que junto con la inicial se analizaron por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución para determinar azúcares y etanol.

4.1.5 Procesos de sacarificación y fermentación simultánea

Se realizó una hidrólisis de material tratado con la combinación de reactivos óptima (6% de hidróxido de sodio y 10% de peróxido de hidrógeno, sin embargo el líquido adicionado fue formulado como sigue:

- Extracto de levadura, 10 g/L
- Fosfato monobásico de potasio, 2 g/L
- Sulfato de amonio, 1 g/L
- Sulfato de magnesio heptahidratado, 0.5 g/L

Posteriormente, se ajustó a un pH de 5.0 con ácido clorhídrico 1.0 M, en este caso se prescindió del buffer de citratos, debido a que en pruebas preliminares se determinó que *Zymomonas mobilis* no es capaz de crecer con la presencia del ion citrato en su medio. Finalmente este medio se esterilizó y se agregó al material pretratado (también estéril) en proporción 1:5. Se adicionaron las cantidades de enzimas Cellic optimizadas (6% de Ctec 3 y 6% de Htec 3) y el inóculo del cultivo primario de *Zymomonas mobilis*, se colocaron en un shaker orbital a 30°C por un lapso de 96 horas con agitación de 150 rpm. Cada 24 horas se tomó una muestra que finalmente fueron analizadas por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución para determinar azúcares y etanol.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Cinética de crecimiento microbiano

Los resultados de la cinética de crecimiento se muestran en la Tabla 12. Analizando dichos datos con ayuda de la Figura 9, se llegó a concluir que el metabolismo de glucosa de *Zymomonas mobilis* PTA 7858 es muy rápido, ya que en 48 horas se consumen alrededor del 99% de la misma, la fase de adaptación dura alrededor de 6 horas y durante esa fase no hay producción de etanol pero si consumo de glucosa, la cual decae en aproximadamente 50 g/l. También se puede concluir que la inhibición de la producción de etanol se da por falta de sustrato y no por la acumulación del producto. Adicionalmente, la conversión de azúcares a etanol se lleva a cabo durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Finalmente, se ve que el consumo de Xilosa es tan solo del 40% del inicial, no se logró determinar cantidad de Xilitol en el fermentado, pero es posible que la inhibición del metabolismo de las pentosas se deba a su presencia [30].

Tabla 12. Resultados del experimento para determinar la cinética de crecimiento de *Zymomonas mobilis*.

Cinética de crecimiento para <i>Zymomonas mobilis</i> PTA 7858 a 30°C y pH=6															
Tiempo (h)	Concentraciones (g/l)														
	Glucosa			Xilosa			Fructosa			Etanol			Biomasa (10^{11} cel/l)		
0	150	±	0.5	20	±	0.56	2	±	0.34	0	±	-	0	±	-
6	96.97	±	3.45	16.55	±	2.34	1.55	±	0.45	0.45	±	0.05	10.65	±	1.35
24	10.87	±	1.23	17.22	±	2.57	0	±	-	56.79	±	3.45	81	±	3.89
31	6.55	±	0.55	16.98	±	1.59	0	±	-	62.94	±	2.79	91	±	4.63
49	4.18	±	0.15	12.83	±	1.34	0	±	-	63.04	±	3.01	91	±	3.45
97	2.16	±	0.24	12.89	±	1.42	0	±	-	64.59	±	3.77	45.5	±	2.03

Considerando al experimento como un reactor tanque agitado por lotes, entonces podemos escribir la ecuación de Monod que establece la velocidad específica de crecimiento bacteriano (μ , 1/h) como:

$$\mu = \frac{\mu_{max}S}{S+K_S} \quad (13)$$

Donde μ_{max} es la velocidad específica de crecimiento bacteriano máximo (1/h), S es la concentración de sustrato (g/l) y K_S (g/l) es la constante de saturación. Sin embargo, en la fase exponencial se cumple que $S \gg K_S$ y por lo tanto:

$$\mu = \mu_{max} \quad (14)$$

Haciendo un balance del crecimiento microbiano, se llegó a:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x = \mu_{max}x \quad (15)$$

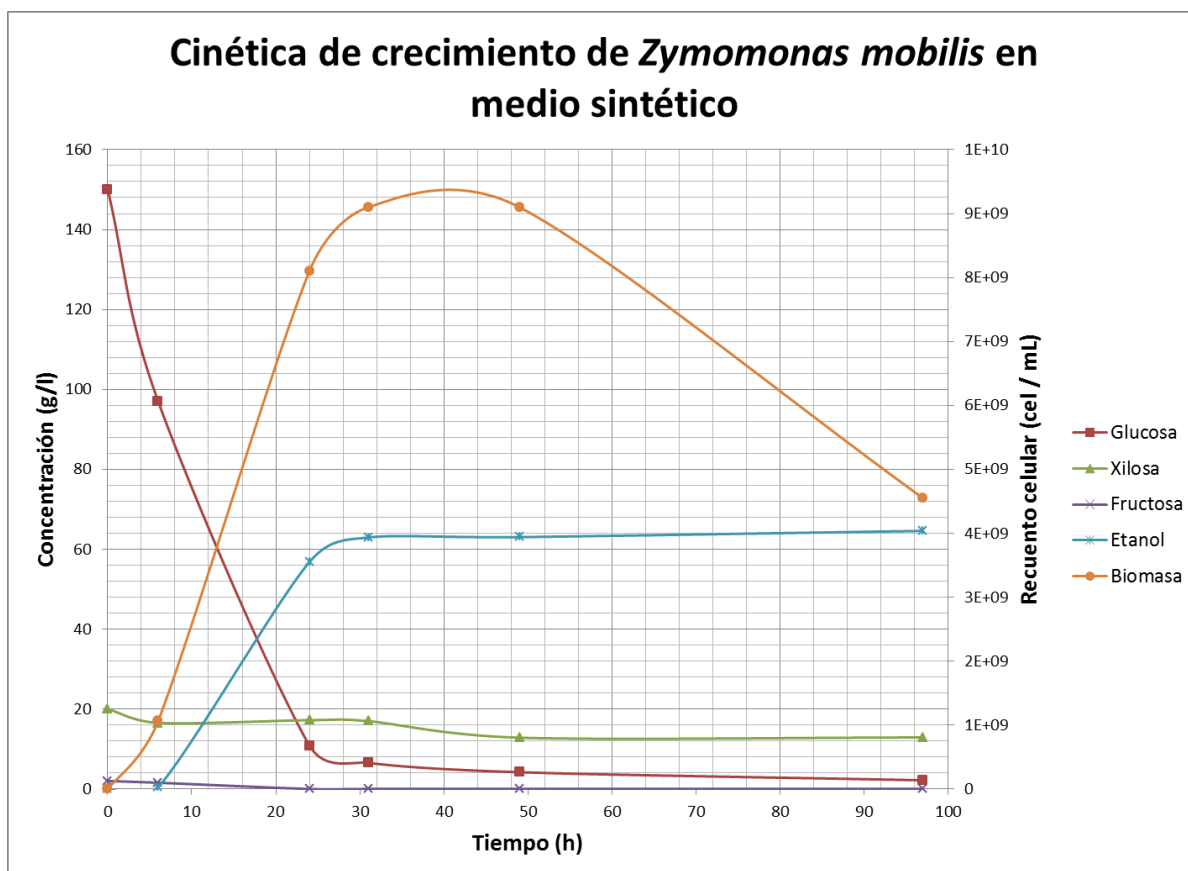


Fig. 9. Datos cinéticos para Zymomonas mobilis a 30°C y pH = 6.0

Donde x es la concentración de células (células/l) y t es el tiempo en horas.

Integrando la ecuación (15) desde 0 hasta t y desde X_0 hasta X :

$$\ln x = \mu_{max} t + \ln x_0 \quad (16)$$

Haciendo una regresión lineal de t vs $\ln x$, se obtuvo que $\mu_{max} = 0.0911 \text{ h}^{-1}$.

Haciendo los balances correspondientes para sustrato (azúcares) y producto se obtienen las ecuaciones (17) y (18) respectivamente.

$$\frac{dS}{dt} = -Y_{XS}\mu_{max}X \quad (17)$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{XP}\mu_{max}X \quad (18)$$

Donde S es la concentración de sustrato en g/l, P es la concentración de etanol en g/l, Y_{XS} es el rendimiento de consumo de sustrato por biomasa y Y_{XP} es el rendimiento de producción de etanol por el crecimiento de biomasa. Para lograr integrar la ecuación (17) fue necesario relacionar la concentración de células con la concentración de sustrato. Esta relación se encontró empíricamente. En la Figura 10, se muestra el gráfico de conteo celular contra concentración de sustrato. Los datos de la fase de crecimiento exponencial se pueden aproximar a una función de la

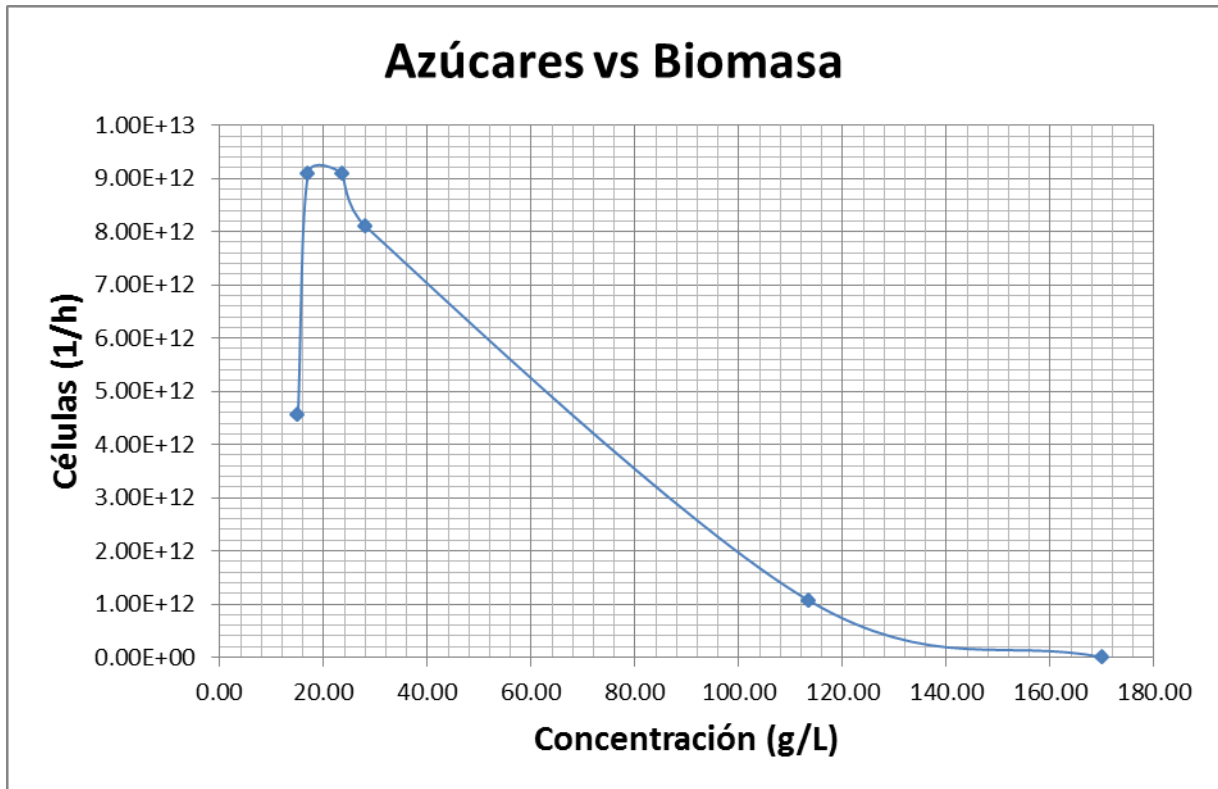


Fig. 10. Gráfico de la concentración de células como función de la concentración de azúcares, nótese que no es posible modelarla en todo momento, sin embargo, en la fase exponencial si existe una tendencia marcada.

forma:

$$x = be^{aS} \quad (19)$$

Donde $a = -0.024 \text{ L/g}$ y $b = 1.59 \times 10^{10} \text{ célula/l}$, sustituyendo esta función en (17) queda:

$$\frac{dS}{dt} = -bY_{XS}\mu_{max}e^{aS} \quad (20)$$

Por lo que el rendimiento de consumo de sustrato está dado por:

$$Y_{XS} = -\frac{\int_{S_0}^S e^{-aS} dS}{b\mu_{max}t} \quad (21)$$

La integral del numerador es necesario resolverla numéricamente, de esta manera, para la fase exponencial de crecimiento se tiene que el valor absoluto de $Y_{XS} = 4.91 \times 10^{-12} \text{ g/célula}$.

Por un procedimiento similar se obtuvo que $Y_{XP} = 4.57 \times 10^{-12} \text{ g/célula}$. Con este valor estaría completo el modelo de Monod para la fase exponencial del crecimiento de *Zymomonas mobilis*.

4.2.2 Tolerancia a la temperatura

Los resultados indican que a 35°C se reduce en un 50 % la producción de etanol a las 48 horas, y a 40°C la producción es casi nula. Aún así, es posible que a 35°C se pueda llevar a cabo la sacarificación y fermentación simultáneas dando tiempo a la reacción. Los datos de la Tabla 13 ilustran este comportamiento.

Tabla 13. Resultados de la fermentación a diferentes temperaturas.

T(°C)	Azúcares (g/L)			Etanol (g/L)		
30	38.9	±	2.07	63.04	±	3.36
35	66.14	±	3.34	41.32	±	2.75
40	155	±	2.74	5	±	0.93

4.2.3 Sacarificación y fermentación separada

Los resultados de la sacarificación y fermentación separada se muestran en la Tabla 14. Obsérvese que hay gran similitud entre los datos obtenidos y los datos de la cinética de crecimiento en medio sintético, lo cual apunta a que aún con los componentes que pueden resultar inhibidores (como trazas de lignina y trazas de fenilpropanoides libres), la fermentación alcohólica sigue su curso normal.

Tabla 14. Resultados de la fermentación de hidrolizados.

Tiempo (h)	Concentración (g/l)							
	Glucosa			Xilosa			Etanol	
0	135.4	±	2.97	31.26	±	2.23	0	± -
24	2.64	±	0.68	17.7	±	1.08	56.51	± 2.35
48	11.15	±	1.47	10.31	±	0.87	59.46	± 2.61
72	7.28	±	1.22	10.36	±	1.22	61.86	± 2.37
96	5.95	±	1.17	9.61	±	0.75	63.56	± 0.05

El rendimiento de la producción de etanol (η_F) en la fermentación se calculó como lo indica la ecuación (22):

$$\eta_F = \frac{[P]}{[S_0 - S]} \quad (22)$$

Donde [P] es la concentración de etanol al final del tiempo de reacción, [S] es la concentración de azúcares al final del proceso y $[S_0]$ es la concentración de azúcares después de la hidrólisis. Todos en gramos por litro.

Utilizando dicha definición, se llegó a un valor de eficiencia del 42.07 %. Combinando ese resultado con la eficiencia de la hidrólisis se tiene que de una tonelada de bagazo de agave libre de solubles,

se pueden obtener 265.96 kg de etanol, utilizando la sacarificación y fermentación separada.

4.2.4 Sacarificación y fermentación simultánea

Los resultados de la sacarificación y fermentación simultánea están contenidos en la Tabla 15, nuevamente, se observa que la máxima producción de etanol se da en las primeras 24 horas, cuando la bacteria se encuentra en su fase exponencial, sin embargo, debido a que el metabolismo de *Zymomonas mobilis* es muy rápido, el suministro de azúcares por parte de la hidrólisis enzimática no es suficiente para sostener su velocidad de crecimiento y por ende, la producción de alcohol etílico, este hecho queda de manifiesto si comparamos las primeras 24 horas de ambos procesos, en la hidrólisis enzimática se producen en ese lapso la cantidad de 123 g/l; mientras que en la fermentación, se consumen 146.32 g/l. Por otro lado, al inocular el medio con *Zymomonas mobilis* existe muy poca cantidad de azúcares en las primeras horas, periodo en el cual está la fase de adaptación, sometiendo a la bacteria a estrés por falta de sustrato y propiciando su muerte, reduciendo así la productividad.

Tabla 15. Resultados de la sacarificación y fermentación simultánea.

Tiempo (h)	Concentración								
	Glucosa			Xilosa			Etanol		
0	0	±	-	0	±	-	0	±	-
24	0.53	±	0.05	11.16	±	0.89	40.27	±	2.45
48	21.62	±	1.75	18	±	1.17	43.32	±	1.98
72	23.45	±	1.47	19.39	±	1.56	42.78	±	2.79
96	25.82	±	1.87	21.4	±	1.22	41.89	±	3.01

Ahora bien, para calcular el rendimiento de producción de etanol se supuso que no hay ningún otro producto más que el etanol. Siendo así, el rendimiento del proceso de sacarificación y fermentación simultánea (η_{SSF}) es:

$$\eta_{SSF} = \frac{[P]}{1.1[S_H] - [S]} \quad (23)$$

Donde [P] es la concentración de etanol al final del tiempo de reacción, [S] es la concentración de azúcares al final del proceso y $[S_H]$ es la concentración de bagazo pretratado al inicio del proceso. Todos en gramos por litro. El factor 1.1 indica la despolimerización de polisacáridos a azúcares simples. Con estas consideraciones se obtuvo que el rendimiento de etanol es de 24.24% en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea. Obteniéndose 179.72 kg de etanol por tonelada de bagazo libre de extraíbles.

4.2.5 Balance de masa de la producción de etanol

Al entrar al proceso de fermentación, los azúcares obtenidos del proceso de hidrólisis solo pueden tener tres destinos:

- Ser utilizados por los microorganismos inoculados para generar más biomasa, lo cual

sucede generalmente en presencia de oxígeno, para los microorganismos anaerobios facultativos.

- Entrar a la ruta metabólica de Entner-Duodoroff y producir etanol.
- Quedar sin reaccionar.

Así, el balance de azúcares en el bioreactor es:

$$S_0 = S_x + S_p + S \quad (24)$$

Donde S_0 es la cantidad inicial de azúcares, S_x es la cantidad de azúcares consumidos para producir biomasa, S_p es la cantidad de azúcares que se transformaron en etanol y S , es la lectura final de azúcares.

Los azúcares destinados a producir biomasa están dados por:

$$S_x = XY_{XS} \quad (25)$$

Donde Y_{XS} es el rendimiento de biomasa por sustrato obtenido de los parámetros cinéticos de Monod. Debido a que es muy difícil contar en cámara de Neubauer en presencia de material lignocelulósico hidrolizado, no se tiene el dato de concentración de células al final de la fermentación, sin embargo, se tomó este valor de la cinética en medio sintético suponiendo que el comportamiento es aproximadamente el mismo.

Los azúcares que se transformaron en etanol se calcularon con el supuesto de que un gramo de etanol, procede de 1.96 gramos de glucosa, de modo tal que:

$$S_p = 1.96P \quad (26)$$

Donde P , es la concentración final de etanol.

De esta manera, la cantidad de azúcares iniciales es de 183.56 g/l, en contraste con lo que se había medido inicialmente, 167 g/l. El diferencial, puede deberse a que la hidrólisis de material lignocelulósico continúa a un ritmo muy lento durante la fermentación y aumenta la concentración de azúcares reductores.



5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Comparando los valores de rendimiento global de los procesos de hidrólisis y fermentación separadas y simultáneas se llegó a la conclusión de que la integración de procesos con las condiciones estudiadas en el presente trabajo, **no tiene ningún efecto positivo sobre el rendimiento de la productividad de etanol**. Por lo tanto, la hipótesis queda rechazada y se opta por proponer un proceso tradicional con las siguientes etapas:

- Molienda del material lignocelulósico hasta un tamaño de fibra heterogéneo entre 1.5 y 3 mm de largo con 0.5 mm de diámetro.
- Pretratamiento alcalino-oxidativo de dos etapas, la primera con hidróxido de sodio al 6%, 120°C por una hora y relación de reactivo a bagazo de 1:10. La segunda con peróxido de hidrógeno a 30°C por 24 horas y relación de reactivo a bagazo de 1:10.
- Neutralización hasta un pH=5.0, lavado con agua corriente y filtrado.
- Hidrólisis con una carga enzimática de 6% de Cellic CTec 3 y 6% de Cellic HTec 3 en base al peso de material pretratado seco, con una relación de sólido a líquido de 1:5. Tiempo de reacción de 72 horas.
- Fermentación con *Zymomonas mobilis* PTA 7858 inoculando el 2% del medio inicial con un cultivo primario de 1×10^8 cel/ml. Tiempo de fermentación de 24 horas.

Con este proceso, es posible obtener 187.8 l de etanol por tonelada de bagazo de *Agave tequilana* seco, a reserva del potencial de producción de los restos de inulina presentes entre las fibras, los cuales llegan a ser cerca del 40% del peso seco de las mismas.

En el proceso del pretratamiento se obtiene, además del sólido destinado a la hidrólisis enzimática, un efluente que es rico en lignina parcialmente despolimerizada lo que abre la posibilidad de utilizar esta parte del proceso para obtener compuestos aromáticos derivados de la lignina. Por otro lado, el efluente del pretratamiento contiene toda la inulina residual contenida entre las fibras del bagazo de *Agave tequilana*, el aprovechamiento de dicho producto puede aumentar el rendimiento de la producción de etanol.

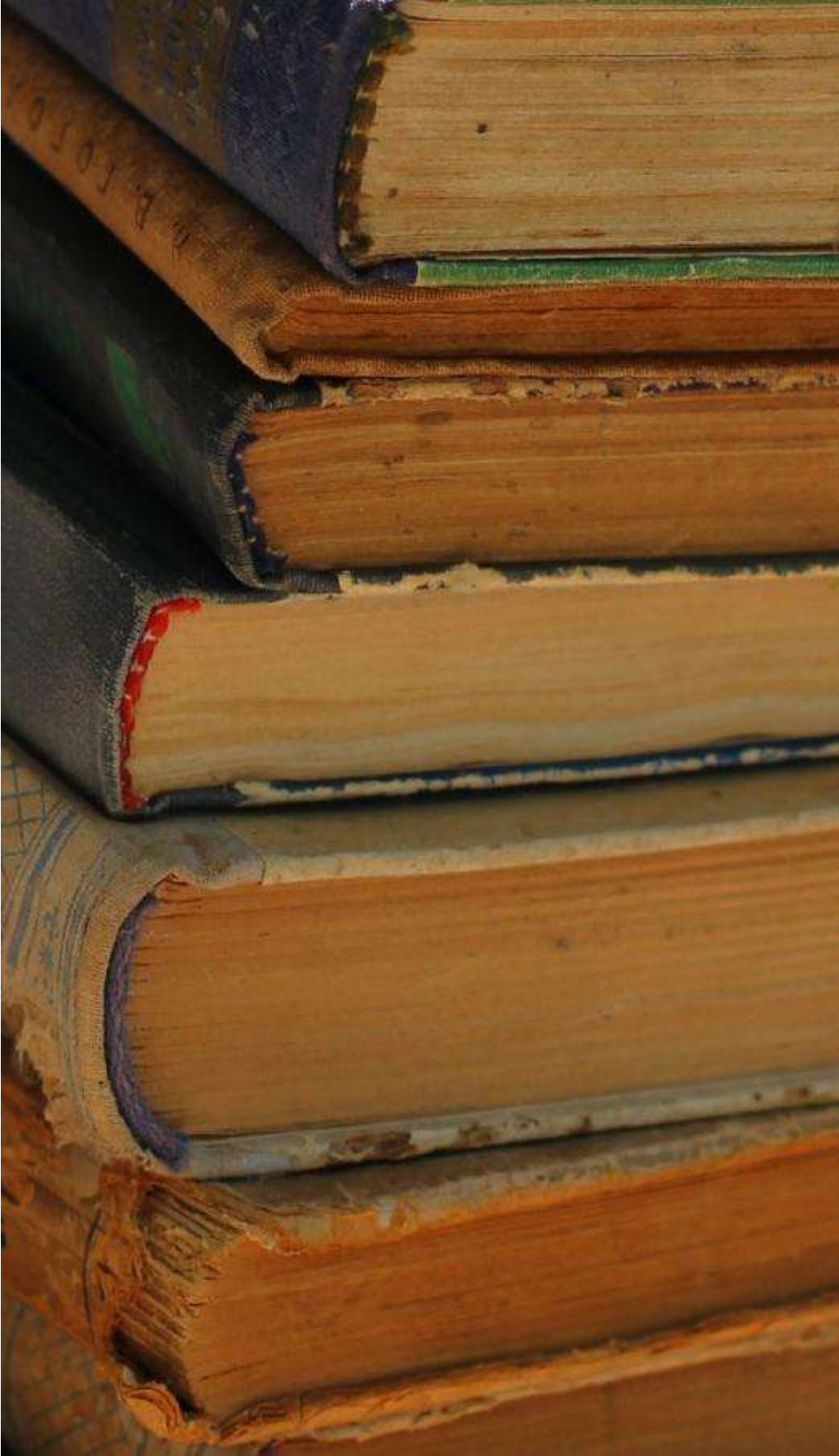
Es factible llevar a cabo el proceso de hidrólisis con buenos rendimientos sin la utilización de ninguna solución amortiguadora de pH, así como a temperatura de 35 °C.

Se determinó que *Zymomonas mobilis* ATCC PTA 7858 no puede crecer en medios donde esté presente el ion citrato, sin embargo, no se ha podido elucidar cual es la razón bioquímica por la cual sucede esto.

El método analítico del ácido 3, 5 dinitrosalicílico (DNS) es un método confiable siempre y cuando las muestras a analizar estén compuestas únicamente de monosacáridos, cuando aparecen otro tipo de compuestos como la celobiosa o etanol, el método se vuelve inestable y da errores considerables.

5.2 Recomendaciones

- Realizar una corrida del proceso propuesto en planta piloto, para comprobar que es posible escalar el mismo sin ningún problema y ajustar cualquier parámetro que pueda salir de control.
- Realizar un estudio detallado de la composición y aprovechamiento del efluente del pretratamiento alcalino oxidativo del bagazo de *Agave tequilana*.
- Realizar pruebas para minimizar la temperatura de operación de la hidrólisis con los complejos Cellic Ctec 3 y Htec 3.
- Realizar un estudio de optimización para aumentar la carga de sustrato en la hidrólisis y así poder aumentar aún más el rendimiento de azúcares por kilogramo de material lignocelulósico.
- Estudiar la fermentación en un reactor continuo para comprobar si esta configuración aumenta el rendimiento de producción de etanol.
- Determinar cuáles productos secundarios pueden obtenerse de la fermentación con *Zymomonas mobilis*.
- Realizar un estudio sobre la producción de combustibles sólidos a partir del residuo de la fermentación.
- Intentar retirar el etanol del fermentador por medio de vacío tal como lo sugiere Nguyen [48] y determinar si estas condiciones aumentan la eficiencia de la reacción.



6. Referencias

1. Gupta, R.B. and A. Demirbas, *Gasoline, diesel and ethanol biofuels from grasses and plants*. 2010: Cambridge University Press.
2. Murray, T.J., *Dr Abraham Gesner: the father of the petroleum industry*. Journal of the Royal Society of Medicine, 1993. **86**(1): p. 43.
3. Frank, A.F., *Oil empire: visions of prosperity in Austrian Galicia*. Vol. 149. 2009: Harvard University Press.
4. Society, P.H. *Canadian Beginnings*. Available from: <http://www.petroleumhistory.ca/history/cdnbeginnings.html>.
5. *Historia de la exploración petrolera en México*. Available from: <http://www.ref.pemex.com/octanaje/23explo.htm>.
6. Hubbert, M.K., *Energy from fossil fuels*. 1949: Moses King.
7. Deffeyes, K.S. *Hubbert's peak: the impending world oil shortage*. in *AGU Fall Meeting Abstracts*. 2004.
8. Balat, M. and H. Balat, *Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel*. Applied energy, 2009. **86**(11): p. 2273-2282.
9. Rodhe, H., *A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect*. Science, 1990. **248**(4960): p. 1217.
10. Iye, E. and P. Bilsborrow, *Cellulosic ethanol production from agricultural residues in Nigeria*. Energy Policy, 2013. **63**: p. 207-214.
11. *Hoja de seguridad XII*. UNAM; Available from: <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/12etanol.pdf>.
12. Mejía, S.M., J.F. Espinal, and F. Mondragón, *Estudio del azeótropo etanol-agua. caracterización molecular de dímeros de etanol, heterodímeros y heterotrímeros de etanol-agua*. Energética, 2006(36): p. 5-18.
13. Wyman, C.E., et al., *Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies*. Bioresource technology, 2005. **96**(18): p. 1959-1966.
14. Lehninger, A.L., *Bioquímica*. 1995: Omega.
15. Zeng, Y., et al., *Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels*. Current opinion in biotechnology, 2014. **27**: p. 38-45.
16. Ranjan, A. and V.S. Moholkar, *Comparative study of various pretreatment techniques for rice straw saccharification for the production of alcoholic biofuels*. Fuel, 2013. **112**: p. 567-571.
17. Equihua S., M., *Obtención de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas, a partir de la biomasa lignocelulósica de tallos de sorgo dulce*, in *Centro de Investigación Científica de Yucatán*, A.C. 2013.
18. Diaz, M.J., et al., *Organosolv pretreatment of olive tree biomass for fermentable sugars*. Holzforschung, 2011. **65**(2): p. 177-183.
19. Nikzad, M., et al., *A study on alkali pretreatment conditions of sorghum stem for maximum sugar recovery using statistical approach*. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, 2014. **20**(2): p. 261-271.
20. Mosier, N., et al., *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. Bioresource technology, 2005. **96**(6): p. 673-686.
21. Alvira, P., et al., *Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review*. Bioresource technology, 2010. **101**(13): p. 4851-4861.
22. Talebnia, F., D. Karakashev, and I. Angelidaki, *Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation*. Bioresource Technology, 2010.

- 101**(13): p. 4744-4753.
23. Sun, Y. and J. Cheng, *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresource technology, 2002. **83**(1): p. 1-11.
24. Jun, H., H. Guangye, and C. Daiwen, *Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: Comparative proteome analysis of Trichoderma reesei grown on different carbon sources*. Journal of proteomics, 2013. **89**: p. 191-201.
25. Wirawan, F., et al., *Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF processes using immobilized Zymomonas mobilis*. Applied Energy, 2012. **100**: p. 19-26.
26. Madigan, M.T., et al., *Biología de los microorganismos*. 2004: Pearson Education/Prentice Hall.
27. Conway, T., *The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology*. FEMS microbiology reviews, 1992. **103**(1): p. 1-28.
28. Hermans, M., B. Neuss, and H. Sahm, *Content and composition of hopanoids in Zymomonas mobilis under various growth conditions*. Journal of bacteriology, 1991. **173**(17): p. 5592-5595.
29. Kuhad, R.C., et al., *Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2011. **15**(9): p. 4950-4962.
30. Viitanen; Paul V., C.Y.-C., McCutchen; Carol M., Zhang; Min, *US Patent 7741119*. 2010.
31. Sims, R.E., et al., *Energy crops: current status and future prospects*. Global Change Biology, 2006. **12**(11): p. 2054-2076.
32. Nobel, P.S. and E.G. Moya, *Los incomparables agaves y cactus*. 1998: Trillas Mexico.
33. García-Mendoza A, E.L., P Dávila, F Chiang, R Bye, T Elias *Riqueza y endemismo de la familia Agavaceae en México. In: Conservación de Plantas en Peligro de Extinción: Diferentes Enfoques*. Instituto de Biología, UNAM, 1995.
34. Granados-Sánchez, D., *Los agaves en México*. Universidad Autónoma Chapingo. México.[Links], 1993.
35. Calderón, G. and J. Rzedowski, *Flora fanerogámica del Valle de México*. Comisión Nacional para el Estudio de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, AC. México. 2001.
36. Ramírez V P, R.O.P., A L Herrera, F Castillo, M Livera, F Rincón, F Zavala *Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura*. Informe Nacional. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética, 2000.
37. Gentry, H.S., *Agaves of Continental North America*. 2004: University of Arizona Press.
38. Iñiguez-Covarrubias, G., S.E. Lange, and R.M. Rowell, *Utilization of byproducts from the tequila industry: part 1: agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production*. Bioresource Technology, 2001. **77**(1): p. 25-32.
39. Flores-Sahagun, T.H., et al., *Characterization of blue agave bagasse fibers of Mexico*. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 2013. **45**: p. 153-161.
40. Vega, K.G., et al., *Analysis of genetic diversity in Agave tequilana var. Azul using RAPD markers*. Euphytica, 2001. **119**(3): p. 335-341.
41. Luo, X. and J. Zhu, *Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses*. Enzyme and microbial technology, 2011. **48**(1): p. 92-99.
42. Yang, L., et al., *Biomass characterization of Agave and Opuntia as potential biofuel feedstocks*. Biomass and Bioenergy, 2015. **76**: p. 43-53.
43. Han, M., et al., *Bioethanol production by Miscanthus as a lignocellulosic biomass: Focus on high efficiency conversion to glucose and ethanol*. Bioresources, 2011. **6**(2): p. 1939-1953.
44. Wilkinson, S., K.A. Smart, and D.J. Cook, *Optimisation of alkaline reagent based chemical*

- pre-treatment of Brewers spent grains for bioethanol production*. Industrial Crops and Products, 2014. **62**: p. 219-227.
45. Mathew, A.K., et al., *Alkaline pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production: Evaluation of glucose yield and pre-treatment energy consumption*. Bioresource technology, 2011. **102**(11): p. 6547-6553.
 46. Bals, B., et al., *Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations*. Biotechnol Biofuels, 2010. **3**(1): p. 1.
 47. Hu, J., V. Arantes, and J.N. Saddler, *The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?* Biotechnology for biofuels, 2011. **4**(1): p. 1-14.
 48. Nguyen, V.D., et al., *Vacuum fermentation integrated with separation process for ethanol production*. Biochemical Engineering Journal, 2011. **55**(3): p. 208-214.
 49. Ghose, T., *Measurement of cellulase activities*. Pure and applied Chemistry, 1987. **59**(2): p. 257-268.



7. Anexos

7.1 Técnica para la determinación de azúcares y etanol por HPLC

Con este método se pueden analizar cualquier tipo de muestra donde se contengan azúcares y etanol, como los son los mostos fermentados.

Se inicia tomando una cantidad de 2 ml del caldo de fermentación o hidrólisis sujeto de estudio, dicha muestra será colocada en viales cónicos perfectamente equilibrados. Se someterán a centrifugación a 13500 rpm por 5 minutos para precipitar todo el material en suspensión.

El sobrenadante se hará pasar por una membrana Millipore de 0.22 μm , la cual retendrá todos los microorganismos y una gran cantidad de enzimas. El filtrado deberá ser recibido en viales de cromatografía, los cuales deben estar llenos hasta la mitad (0.75 ml) como mínimo para evitar que el cromatógrafo succione aire.

Los viales serán colocados en el carrusel del cromatógrafo y serán analizados bajo las siguientes condiciones:

- Columna Metacarb 87C a 70°C
- Flujo isocrático de agua a 1.0 ml/min
- Detector de índice de refracción

Si es necesario se pueden hacer diluciones para mejorar la resolución de los resultados.

Posteriormente se deben preparar estándares de todos los compuestos que se quieran determinar, todos los estándares deben llevar la misma preparación que las muestras (es decir, centrifugación-filtración).

De cada cromatograma correspondiente a algún estándar se tomará el tiempo de retención y valor de área bajo la curva dado por el equipo. Esta última variable se debe graficar contra la concentración del estándar y finalmente realizar la correlación de estos parámetros. Se recomiendan mínimo cuatro concentraciones para cada componente a determinar.

Finalmente, se debe comparar el valor de área bajo la curva obtenido del análisis de las muestras problema con la correlación obtenida para obtener los resultados de concentración.

7.2 Técnica de determinación de azúcares reductores por medio del ácido 3,5-Dinitrosalicílico [49]

El reactivo DNS se prepara de la siguiente manera

- 1416 ml de agua destilada
- 10.6 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico
- 19.8 g de hidróxido de sodio

Una vez disuelto todo lo anterior, agregar:

- 306 g de sal de Rochelle (tartrato de sodio y potasio)
- 7.6 ml de fenol (punto de fusión 50°C)
- 8.3 g de metabisulfito de sodio

Una vez preparado, tomar una muestra de 3 ml y titular con ácido clorhídrico 0.1 N en presencia de fenolftaleína como indicador. Debe consumirse un volumen aproximado de entre 5 y 6 ml, si no es así, agregar hidróxido de sodio considerando que 2 g de este, equivalen a aproximadamente 1 ml de solución 0.1 N de ácido clorhídrico.

Antes de comenzar, se debe preparar la curva estándar con soluciones de glucosa entre 0.2 y 5 miligramos de glucosa por mililitro. Dichos estándares serán tratados exactamente igual que las muestras.

Para realizar la prueba se deben colocar 0.5 ml de muestra y 1 ml de buffer de citratos en un tubo de ensaye, posteriormente se deben agregar 3 ml de reactivo DNS. Calentar en baño maría hirviendo por 5 minutos y posteriormente enfriar a temperatura ambiente. Leer transmitancia a 540 nm utilizando blanco con 1.5 ml de buffer de citratos y 3 ml de reactivo DNS. Si las muestras están demasiado concentradas es necesario diluirlas de modo que la transmitancia medida se encuentre entre 20 y 80%. Por el contrario, si se encuentran demasiado diluidas agregar 1 mg de glucosa a la muestra. Al graficar el logaritmo decimal de la transmitancia contra la concentración de los estándares se debe obtener una línea recta con un intersección al origen de 0.04 mg, lo cual representa la pérdida de glucosa por oxidación con el reactivo de DNS.

Tomar en cuenta que tres mililitros de reactivo de DNS reaccionan con 10 mg de glucosa así que se debe tener precaución con soluciones concentradas, ya que se obtienen mejores resultados si las muestras contienen 5 mg de glucosa, o menos.

También hay que considerar que la reacción entre los azúcares reductores y el reactivo de DNS sólo se lleva a cabo en medio básico, así que las muestras que tengan un pH ácido deben ser neutralizadas antes de la realización del método. Por otro lado, este método no es específico así que detectará cualquier sustancia reductora, si se utiliza glucosa como estándar, los valores para celobiosa serán 15 % más bajos de lo estimado y para xilosa serán 15 % más altos.

7.3 Técnica para conteo celular de *Zymomonas mobilis* en cámara de Neubauer

Preparar una solución de safranina con 0.5 g en un litro de agua, tomar 0.1mL de la muestra a analizar y aforar a 1 ml con la solución de safranina. Calentar ligeramente la solución y dejar enfriar. Tomar una pequeña cantidad de dilución con ayuda de una pipeta serológica y llenar adecuadamente la cámara de Neubauer. Observar en un microscopio con el objetico de 10x o 40x. Se deben contar las bacterias en el cuadro central tomando los cuadros pequeños (los que miden 0.05 mm de lado) como base. No debe haber diferencia de más de 10 unidades entre cuadro y cuadro. Una vez que se hayan contado al menos el 50% de los cuadros, obtener el promedio de todos los cuadros contados. El número de células por mililitro (x) es:

$$x = (400)(10^5)Y \quad (27)$$

Donde Y es el promedio de células contadas en los cuadros pequeños.

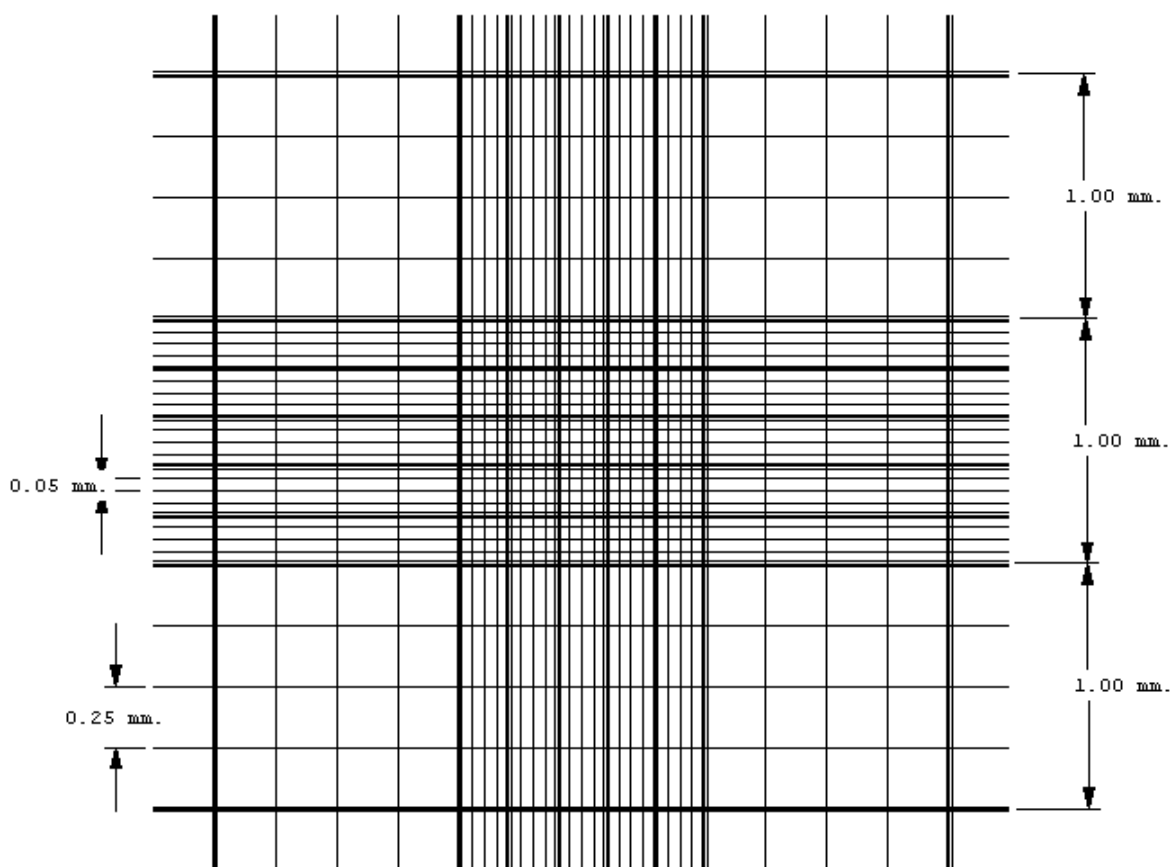


Fig. 11. Imagen del campo observado en la cámara de Neubauer. Para contar bacterias se utilizan los cuadros pequeños (de 0.05 mm de lado)

7.4 Técnica para la determinación de lignina Klason

Se deben pesar 0.5 g de muestra y colocarse en un vaso de precipitados de 200 ml, posteriormente agregar 12.5 ml de ácido sulfúrico al 72% y 5 ml de ácido bromhídrico concentrado al 40%. Dicha mezcla se debe dejar en reposo con agitación esporádica por 2 horas. Una vez transcurrido ese tiempo agregar 100 ml de agua destilada y llevar a ebullición por 5 minutos. Filtrar con ayuda de vacío y lavar repetidas veces con agua destilada para eliminar cualquier rastro de azúcares y reactivos. Una vez hecho esto, secar a peso constante en un horno a aproximadamente 100°C. El porcentaje de lignina está dado por:

$$f_{lig} = \frac{w_f}{w_f - w_0} \quad (28)$$

Donde w_f es el peso después del procedimiento indicado y w_0 es el peso de la muestra inicial.

7.5 Bioseguridad en el laboratorio

7.5.1 Grupos de riesgo de microorganismos

7.5.1.1 Grupo de riesgo 1

Microorganismos que representan escaso riesgo para el individuo y la comunidad, tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales por ejemplo agentes como: *Naegleria gruberi*, *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis*, entre otros.

7.5.1.2 Grupo de riesgo 2

Microorganismos que representan riesgo moderado para el individuo y limitado o bajo para la comunidad; pueden provocar enfermedades humanas o animales pero tienen bajas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado por ejemplo existe disponibilidad de tratamiento y medidas preventivas y el riesgo de diseminación está limitado, por ejemplo agentes como: *Micobacterium* (excepto *M. Boris* y *M. tuberculosis*), *Helicobacter*, *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Staphilococcus*, HIV, virus de la hepatitis A, B, C, D y E, entre otros.

7.5.1.3 Grupo de riesgo 3

Microorganismos que representan riesgo elevado para el individuo y escaso para la comunidad; usualmente causan enfermedades serias a humanos y animales que resultan en importantes consecuencias económicas, la diseminación no es ordinaria y depende del contacto casual de un individuo a otro, puede haber disponibilidad de medidas preventivas y terapéuticas eficaces, por ejemplo agentes como: *Micobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *Histoplasma capsulatum*, virus de la Influenza incluyendo HPAI (H7 y H5), virus del Nilo, entre otros.

7.5.1.4 Grupo de riesgo 4

Microorganismos que representan riesgo elevado para el individuo y para la comunidad; causa serias infecciones a humanos o animales, en ocasiones sin tratamiento y puede transmitirse fácilmente de un individuo a otro, o de un animal a humano o viceversa directa o indirectamente o por contacto casual; normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces, por ejemplo agentes como; Ébola, Hanta, virus de la rabia de murciélagos, Nipah, Junin, entre otros.

7.5.1.5 Grupo de riesgo 5

Agentes que desarrollan enfermedades que no están reportadas en el país (exóticas); su introducción y presencia están reglamentadas por leyes sanitarias locales, por ejemplo agentes como; Enfermedad de Aujeszky, CAE, virus de la hepatitis en patos, Nairobi, enfermedad Teschen, virus serotipo BT, enfermedad del caballo africano, entre otros.

7.5.2. Niveles de bioseguridad y biocontención

Los niveles de bioseguridad se basan en la combinación de características de diseño, construcción,

medios de contención, equipo, prácticas, y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos o potencialmente patógenos de los distintos grupos de riesgo, se clasifican en 4 niveles (BSL por sus siglas en inglés BioSafety Level) BSL-1 o laboratorio básico 1, BSL-2 o laboratorio básico 2, BSL-3 o laboratorio de contención 3 y BSL-4 o laboratorio de contención máxima 4. Los grupos de riesgo de microorganismos no se equiparan con los niveles de bioseguridad de los laboratorios destinados al trabajo con los agentes biológicos de cada uno de esos grupos [Manual de Bioseguridad en el laboratorio, OMS, 3ª edición, 2005].

7.5.2.1 Laboratorio básico BSL-1

Los agentes biológicos que se utilizan en este tipo de laboratorio son microorganismos de muy bajo potencial patogénico, se manipulan con prácticas y técnicas microbiológicas básicas. El laboratorio básico BSL-1 debe estar acondicionado para trabajar con microorganismos de nivel 1, que son aquellos que están bien caracterizados y se sabe que no causan enfermedad en las personas sanas y por ende, no representan un riesgo para el personal del laboratorio y del medio ambiente. Este tipo de laboratorio es el que se requiere para la manipulación de *Zymomonas mobilis*, por lo tanto, solo se describirán los equipos y procedimientos aplicables a este nivel de bioseguridad.

Este laboratorio no necesita un área aislada, no requiere de equipo ni de instalaciones especiales de contención, el trabajo con estos microorganismos se puede realizar en un laboratorio de investigación convencional, siguiendo las prácticas estándares de microbiología.

7.5.2.1.1 Instalaciones e ingeniería en BSL-1

El laboratorio debe contar con un lavamanos.

El laboratorio debe estar diseñado de tal manera que pueda limpiarse con facilidad. Los pisos de mosaico no son apropiados ya que impedirían la descontaminación después de cualquier derrame o salpicadura.

Las mesas de trabajo deben ser impermeables al agua y resistentes a solventes orgánicos, ácidos, álcalis y al calor moderado.

Los equipos de laboratorio deben estar espaciados con el fin de facilitar el acceso a las operaciones de limpieza, dicho acceso tampoco deberá estar obstaculizado por materiales o cajas.

No se requiere cabina de Bioseguridad

7.5.2.1.2 Procedimientos administrativos, prácticas estándares de operación y buenas prácticas del laboratorio en BSL-1

El acceso al laboratorio debe ser controlado por el responsable del mismo.

Todos los investigadores deben lavarse las manos después de manipular material biológico o animales, así como antes de salir del laboratorio.

No se permite comer, beber, fumar ni maquillarse dentro del área de trabajo. Los alimentos deben

de ser almacenados en lugares o refrigeradores asignados únicamente para este propósito.

El pipeteo debe ser realizado con instrumentos mecánicos (propipeta, pipeta automática) y nunca por medio de la boca.

Se debe tratar de reducir al máximo la producción y liberación de aerosoles, evitando: agitaciones y pipeteo bruscos, introducción de asas de cultivo calientes dentro de medios de cultivo, etcétera.

Las áreas de trabajo deben ser descontaminadas una vez al día, así como después de cualquier derrame de material biológico.

Los desechos sólidos o líquidos con material biológico deben ser descontaminados por medio de un procedimiento apropiado antes de ser eliminados (esterilización en autoclave o inmersión en desinfectantes apropiados). Si el autoclave no se encuentra disponible, los desechos a descontaminar por esta vía, deben ser etiquetados debidamente y colocados en un sitio específico hasta su esterilización.

7.5.2.1.3 Uso de equipo de protección personal en BSL-1

Es necesario el uso de batas y guantes con el fin de evitar la contaminación de ropa personal de calle. Está prohibido el uso de prendas de laboratorio en lugares como: oficinas administrativas, salas de reuniones o biblioteca.

Debe existir un programa de fumigación periódico.

7.5.2.1.4 Procedimientos específicos en BSL-1

Todo material contaminado que deba salir del laboratorio para su descontaminación (por autoclave o incineración) debe ser colocado dentro de bolsas especiales debidamente cerradas y etiquetadas. Una cinta testigo deberá ser colocada como indicativo de esterilización.

7.6 Determinación de la actividad de la enzima Cellic Ctec 3

Para la determinación de la enzima Cellic Ctec 3 en FPU (Unidades de papel filtro), se llevaron a cabo una serie de experimentos de hidrólisis en las condiciones óptimas de este producto (T= 50°C y pH = 5.0). A cada experimento se le agregaron 20 ml de solución buffer de citratos 0.05 M pH = 5.0, se atempero a 50°C y se colocó 1 g de papel filtro Whatman No. 1. Cada experimento se realizó con una dilución de enzima diferente, las diluciones de cada experimento se muestran en la Tabla 16.

Después de una hora de reacción, se debe medir la concentración de glucosa por el método del DNS. Por otro lado, se debe determinar la concentración de glucosa propia de la enzima (ya que la mayor parte de las enzimas celulolíticas están estabilizadas con algún azúcar) y restarse de la lectura total.

Haciendo un ajuste semilogarítmico se debe encontrar la dilución exacta de enzima que libera 2 mg/l de azúcar después de una hora de reacción.

Finalmente, se debe aplicar la siguiente definición para obtener la actividad enzimática.

$$FPU = \frac{0.37}{E} \quad (29)$$

Donde E, es la concentración de enzima que libera 2 g/l de glucosa después de una hora de reacción.

Tabla 16. Resultados de las hidrólisis para la determinación de la actividad enzimática de Cellic Ctec 3.

	Dilución de enzima	Glucosa generada (g/L)
1	0.025	17.91
2	0.01	14.24
3	0.005	9.94
4	0.001	3.01
5	0.0005	1.59

De esta manera se llegó a la conclusión de que la actividad de la enzima CellicCtec 3 es de 556.14 FPU/ml.

