



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

USO DE LA YACA PARA LA PRODUCCIÓN DE LICORES Y
BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN.

Tesis presentada por:

I.Q. Emmanuel Alejandro Aguilar López

Como requisito para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias en Ingeniería Química

Asesor:

Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Co-asesor:

Dra. Ana Alejandra Vargas Tah

Morelia, Mich.

Febrero 2018

RESUMEN

Emmanuel Alejandro Aguilar López, Enero 2018

Dirigida por: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Entidad: Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química

Hoy en día una de las metas que se buscan alcanzar en materia medio ambiental es desarrollar nuevas tecnologías de combustibles limpios que involucran la participación de toda una sociedad. Combustibles de origen fósil atentan contra un mundo que se ha visto mermado por altas cantidades de gases presentes en problemáticas como el calentamiento global y el efecto invernadero, sin mencionar que por ser de origen no renovable están a pocos años de dejar de existir.

En la actualidad se está innovando con diferentes sustratos de los cuales podamos obtener biocombustibles sin perjudicar algún sector de alta demanda. En la actualidad existen diversas formas que se están innovando para obtener combustibles a partir de materias primas renovables, los cuales se conocen como biocombustibles, siendo el etanol el de mayor uso ya sea como aditivo de la gasolina o incluso como combustible puro. Otros biocombustibles presentes son el biogás y el biodiesel.

Cabe mencionar que el uso de maíz en México no resulta factible debido a restricciones sociales y legales que actualmente limitan su uso, mientras que el alto precio de la caña de azúcar lo hace un material no viable en cuestión de costos. Por su parte, se sabe que la Yaca tiene propiedades con altos beneficios para los seres humanos, además de que contiene altos contenidos de azúcares. Actualmente de la Yaca sólo se consume la pulpa, mientras que la cáscara, pétalos, semillas y fibra son de desecho. Esto representa una oportunidad para llevar a cabo la producción de Bioetanol del material lignocelulósico y así tener un aprovechamiento integral. El proceso de Bioetanol contempla etapas tales como un Pretratamiento, hidrolisis y la fermentación; de la Yaca se conoce poco y esto conlleva a un área de oportunidad en la que es necesario realizar diversos diseños experimentales para encontrar puntos óptimos de nuestra investigación.

Debido a las propiedades benéficas para el ser humano que contiene la pulpa de Yaca, producir licor de esta fruta puede representar una oportunidad de comercialización.

Palabras clave: Pretratamiento, hidrolisis, Bioetanol, lignocelulósico, Yaca.

ABSTRACT

Emmanuel Alejandro Aguilar López, January 2018

Directed by: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Entity: Postgraduate of the Faculty of Chemical Engineering

Nowadays one of the goals that are sought to reach in environmental matter is to develop new technologies of clean fuels that involve the participation of a whole society. Fuels of fossil origin attempt against a world that has been diminished by high amounts of gases present in problems such as global warming and the greenhouse effect, not to mention that being of non-renewable origin they are a few years away from existing.

At present, it is innovating with different substrates from which we can obtain biofuels without harming any sector of high demand. At present there are various ways that are being innovated to obtain fuels from renewable raw materials, which are known as biofuels, with ethanol being the most widely used either as a gasoline additive or even as a pure fuel. Other biofuels present are biogas and biodiesel.

It should be mentioned that the use of corn in Mexico is not feasible due to social and legal restrictions that currently limit its use, while the high price of sugarcane makes it a non-viable material in terms of costs. For its part, it is known that the Yaca has properties with high benefits for humans, in addition to containing high levels of sugars. At the moment of the Jackfruit only the pulp is consumed, whereas the peel, petals, seeds and fiber are of waste. This represents an opportunity to carry out the production of bioethanol from the lignocellulosic material and thus have an integral use. The Bioethanol process includes stages such as a Pretreatment, hydrolysis and fermentation; of the Yaca is little known and this leads to an area of opportunity in which it is necessary to make various experimental designs to find optimal points of our research.

Due to the beneficial properties for the human being that contains the pulp of Yaca, producing liquor of this fruit can represent an opportunity of commercialization.

Key words: Pretreatment, hydrolysis, Bioethanol, lignocellulosic, Yaca.

Contenido

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCION	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.2 JUSTIFICACION	4
1.3 HIPOTESIS	5
1.4 OBJETIVOS	5
1.4.1 OBJETIVOS GENERALES.....	5
1.4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	5
1.5 ESTADO DEL ARTE.....	6
CAPÍTULO II	8
MARCO TEORICO.....	8
2.1 BIOCOMBUSTIBLES.....	8
2.1.1 BIOCOMBUSTIBLES DE PRIMERA Y SEGUNDA GENERACIÓN	9
2.1.2 BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACION	10
2.2 BIOETANOL	11
2.3 YACA.....	12
2.4 MATERIALES LIGNOCELULOSICOS.....	14
2.5 COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	15
2.6 LIGNINA.....	16
2.7 CELULOSA.....	17
2.8 HEMICELULOSA.....	18
2.9 PRETRATAMIENTOS.....	19
2.9.1 HIDRÓLISIS CON PRETRATAMIENTO ÁCIDO	21
2.9.2 PRETRATAMIENTO FISICO.....	22
2.9.3 PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO.....	22
2.10 HIDRÓLISIS.....	23

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

2.11	MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN FERMENTACIÓN.....	24
2.11.1	LEVADURAS.....	24
2.11.2	BACTERIAS Y HONGOS.....	25
2.12	FERMENTACIÓN.....	25
2.13	DESTILACION.....	28
2.14	CONVERSIÓN DE AZÚCARES.....	29
	CAPÍTULO III.....	30
	METODOLOGÍA.....	30
3.1	ETAPA 1.....	30
3.2	ETAPA 2. BALANCE GENERAL Y CARACTERIZACIÓN.....	30
3.2.1	CARACTERIZACIÓN DE AZÚCARESESTRUCTURALES.....	31
	(HIDRÓLISIS ÁCIDA CUANTITATIVA).....	31
3.3	ETAPA 3. BARRIDO EXPERIMENTAL DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	32
3.4	ETAPA 4. FERMENTACIÓN DE JUGOS.....	36
3.5	ETAPA 5. CUANTIFICACIONES POR HPLC.....	38
3.6	ETAPA 6. ESCALAMIENTO.....	39
	CAPÍTULO IV.....	40
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
4.1	DESCRIPCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA YACA.....	40
4.2	BALANCE DE MATERIA.....	45
4.3	PORCENTAJE DE HUMEDAD.....	48
4.4	CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO Y JUGOS DE YACA.....	50
4.4.1	CUANTIFICACIÓN DE CENIZAS.....	50
4.4.2	CUANTIFICACIÓN DE LIGNINA INSOLUBLE.....	52
4.4.3	CUANTIFICACIÓN DE LIGNINA SOLUBLE.....	54
4.4.4	CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES ESTRUCTURALES POR COMPONENTE.....	56
4.4.5	CUANTIFICACIÓN DE JUGOS.....	58
4.5	CORRIDAS EXPLORATORIAS.....	60

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

4.6	HIDROLISIS ÁCIDA.....	61
4.6.1	BARRIDO: TEMPERATURA-CONCENTRACIÓN CONSTANTE Y TIEMPO VARIABLE.....	62
4.6.2	BARRIDO: TEMPERATURA-TIEMPO CONSTANTE Y CONCENTRACIÓN VARIABLE.....	67
4.7	CARACTERIZACIÓN DE AZÚCARES ESTRUCTURALES DEL SÓLIDO RESIDUAL DE LAS HIDROLISIS.....	71
4.7.1	CARACTERIZACIÓN DEL SÓLIDO DEL BARRIDO A DIFERENTES TIEMPOS.....	72
4.7.2	CARACTERIZACIÓN DEL SÓLIDO DEL BARRIDO A DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	74
4.8	FERMENTACIÓN.....	76
4.8.1	CINETICAS DE CRECIMIENTO	76
4.8.2	FERMENTACIÓN DE LOS JUGOS.....	78
	CAPÍTULO V	84
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
5.1	CONCLUSIÓN DEL TRABAJO PRESENTE.....	84
5.2	LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN POSTERIOR.....	86
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	88

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
CAPITULO I		
1.1	Producción de Bioetanol de algunos lugares en Estados Unidos (artículo “ <i>Estado del arte de la bioenergía en México</i> ”).	7
CAPITULO II		
2.1	Volúmenes de la producción nacional de Yaca (SIAP 2014 Cierre de producción agrícola por cultivo).	14
2.2	Monosacáridos clasificados respecto al número de carbonos.	23
CAPITULO III		
3.1	Diseño experimental a diferentes tiempos.	34
3.2	Diseño experimental a diferentes concentraciones.	35
CAPITULO IV		
4.1	Resultado de estudio detección de sabor-estado anímico.	43
4.2	Composición porcentual de la Yaca en Octubre.	45
4.3	Composición porcentual de la Yaca en Agosto.	47
4.4	Muestras de humedad Yaca 1.	48
4.5	Muestras de humedad Yaca 2.	48
4.6	Muestras de humedad de pulpa y fibra.	49
4.7	Resumen de resultados de cenizas.	50
4.8	Resumen de resultados de la lignina insoluble.	52
4.9	Resumen de resultados de la lignina soluble.	54
4.10	Resultados por triplicado del %Glucanos y %Xilanos.	56
4.11	Rendimiento Jugo y Fibra de la Pulpa.	58
4.12	Resultados de la hidrolisis a diferentes tiempos.	62

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

4.13	Desviación estándar de los resultados en cada tiempo.	63
4.14	Resultados de la hidrolisis a diferentes tiempos.	66
4.15	Resultados de la hidrolisis a diferentes concentraciones.	67
4.16	Desviación estándar de los resultados en cada concentración.	68
4.17	Resultados de la hidrolisis a diferentes concentraciones por triplicado.	70
4.18	Rendimiento de sólidos en barrido a diferentes tiempos.	71
4.19	Rendimiento de sólidos en barrido a diferentes concentraciones.	71
4.20	Porcentaje de azúcares respecto de los tiempos.	72
4.21	Porcentaje de azúcares respecto de cada concentración.	74
4.22	Crecimiento de la levadura.	76
4.23	Concentraciones de fermentación A.	80
4.24	Concentraciones de fermentación B.	81
4.25	Concentraciones de fermentación C.	82

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
CAPITULO I		
1.1	Producción de combustibles de origen renovable y no renovable.	2
1.2	Producción de energía en 2013 (SENER 2014).	6
CAPITULO II		
2.1	Proceso del bioetanol de primera y segunda generación.	10
2.2	Imagen de Yacas.	12
2.3	Árbol de Yaca.	13
2.4	Estructura de la biomasa lignocelulósica.	16
2.5	Estructura de la lignina.	17
2.6	Estructura de la celulosa.	18
2.7	Estructura de la hemicelulosa.	19
2.8	Ruptura de la pared celular mediante los pretratamientos.	20
2.9	Representación de la hidrólisis de un polisacárido.	23
2.10	Proceso global para convertir los polímeros de la biomasa en Bioetanol.	27
CAPITULO III		
3.1	Diagrama de bloques del proceso.	31
3.2	Diagrama de bloques de la producción de Bioetanol de primera generación.	37
3.2	Equipo de fermentación.	37
3.3	Equipo HPLC.	39
CAPITULO IV		

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

4.1	Imagen de una Yaca de estudio proveniente de Tepic.	40
4.2	Cáscara y fibra de la Yaca.	41
4.3	Corazón de la Yaca.	42
4.4	Imagen de los pétalos que contienen la Pulpa.	42
4.5	Pulpa de Yaca.	43
4.6	Semillas de Yaca.	44
4.7	Gráfica de Pastel de Yaca 1 y Yaca 2.	46
4.8	Gráfica de Pastel de las 4 Yacas.	47
4.9	Gráfica de humedad promedio por componente.	49
4.10	Gráfica de cenizas promedio por componente.	51
4.11	Gráfica de lignina insoluble promedio por componente.	53
4.12	Gráfica de lignina soluble promedio por componente.	55
4.13	Gráfica de los porcentajes promedios del glucanos y xilanos.	57
4.14	Composición de los jugos de la Yaca.	58
4.15	Porcentajes de azúcar en jugos de la Yaca	59
4.16	Resultados de pruebas exploratorias.	60
4.17	Gráfica comparativa en los resultados del barrido por tiempos.	64
4.18	Composición porcentual de azúcares en cada tiempo.	65
4.19	Gráfica comparativa en los resultados del barrido por concentraciones.	68
4.20	Composición porcentual en cada concentración de ácido.	69
4.21	Gráfica de los porcentajes promedios del glucanos y xilanos en el sólido residual de cada tiempo.	73
4.22	Gráfica de los porcentajes promedios del glucanos y xilanos en el sólido residual de cada concentración de ácido.	75

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

4.23	Comportamiento gráfico de la <i>Saccharomyces cerevisia</i> .	78
4.24	Fermentación A.	79
4.25	Fermentación B.	82
4.26	Fermentación C.	83

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

Uno de los procesos que actualmente se encuentra en potencial desarrollo es la producción de Bioetanol el cual, en contraparte con los combustibles de origen fósil, se producen de recursos renovables y fuentes vivas como las levaduras, entre otras. Este proceso conlleva la fermentación de los azúcares presentes en el material lignocelulósico que se obtiene de residuos presentes en el sector industrial. El aprovechamiento de estos recursos presenta una gran opción en el desarrollo y búsqueda de nuevas tecnologías que implican una disminución en los contaminantes presentes y la problemática que se vive día a día.

El desarrollo sustentable es un tema de interés mundial que necesita un fuerte compromiso de la parte social con el ambiente.

El Bioetanol es visualizado como combustible renovable de alto impacto en el sector transportista, siendo de uso actual principalmente en países como Estados Unidos, parte de Europa y Brasil, sin embargo se ha ido introduciendo en otras partes del mundo.

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.

Según los estudios que se realizaron por Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, a nivel mundial un alto porcentaje de los combustibles son obtenidos mediante fuentes como petróleo, gas y el carbón.

Al no ser un producto tóxico y que puede introducirse sin problemas en mezclas con la gasolina, además de una baja generación de gases de efecto invernadero son parte de las ventajas que ofrece este biocombustible.

Se sabe que a nivel mundial tan sólo un 16.7 % corresponde a los biocombustibles, de entre los cuales destacan los que parten de sustratos lignocelulósicos para su producción, tal y como se muestra en la Figura 1. [1]

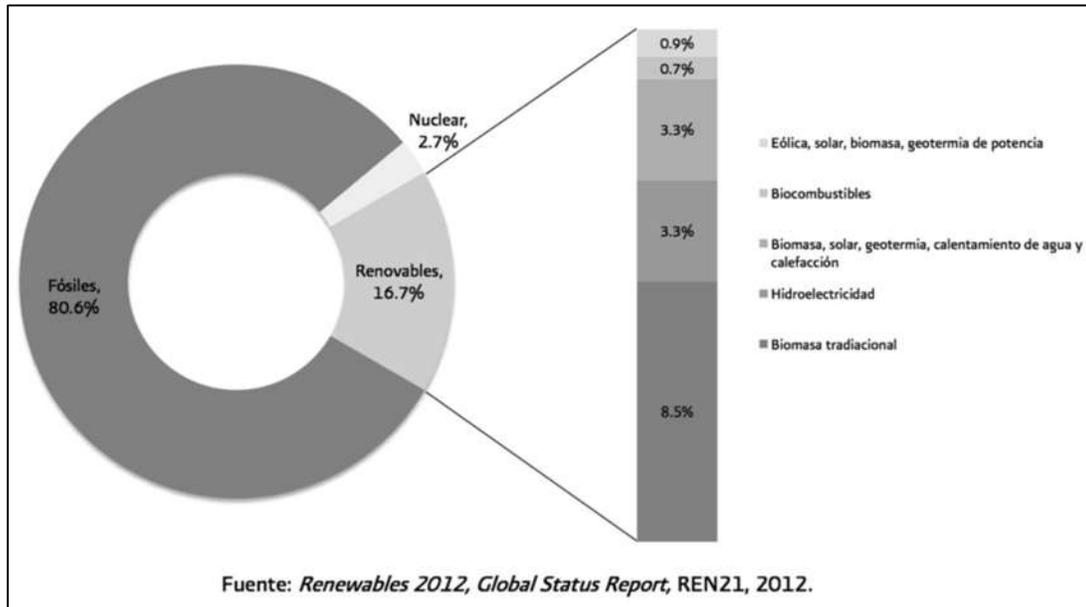


Figura 1.1 Producción de combustibles de origen renovable y no renovable.

Un desafío que se denotan fuertemente en la producción del Bioetanol es el uso de nuevas materias primas que puedan ayudar a la competitividad de este biocombustible en materia de costos. Dentro del reto se presentan residuos lignocelulósicos tales como el bagazo de caña de azúcar, residuos forestales, el rastrojo de maíz, residuos de agave, sorgo y trigo, siendo estos los principales.

Dentro de las etapas primordiales en la producción del Bioetanol se encuentra el proceso de obtención de los azúcares que se encuentran en la biomasa mediante procesos que implican el uso de químicos para poder obtenerlos. Uno de los parámetros importantes que están implicados en los pretratamientos es el pH, debido a que en base a esto se tiende a usar pretratamientos con ácido, pH bajo, y pretratamientos alcalinos, con pH alto.

Posterior a un Pretratamiento, y si el sustrato así lo demanda, se requiere un proceso de hidrolizado asistido con enzimas, en el cual las celulasas se encargan de descomponer a monómeros los azúcares de las celulosas y hemicelulosa.

Finalmente la fermentación alcohólica da como resultado nuestro Bioetanol, empleando microorganismos tales como hongos o levaduras principalmente. En cuanto a la levadura más empleada en la producción del Bioetanol se encuentra la *Saccharomices cerevisiae*, que se ha utilizado en diversos desarrollos experimentales por su fácil control comparado con otros.

Actualmente el uso de enzimas, los químicos en los pretratamientos, los microorganismos empleados en la fermentación y la demanda de materia prima son factores de alta importancia en el costo final del producto, pese a que se tengan co-productos como es la lignina, la cantidad no es suficiente para amortiguar este costo. Un riesgo latente que puede visualizarse a futuro es que la demanda de residuos llegue a ser tal que, el costo inclusive puede aumentar y aun cuando se haya encontrado un proceso que genere altos rendimientos a un costo competitivo, este riesgo puede ocasionar que nuevamente no sea competitivo.

Pese a que todo apunta a un desarrollo tecnológico orientado al uso de etanol, una de las situaciones presentes es que el cambio que conlleva impide el uso al momento de este biocombustible, dejando fuera a la gasolina. Dada esta situación es necesario realizar mezclas gasolina etanol para tener un balance dentro de los vehículos. El sector automotriz por su parte está en desarrollo de motores que cada vez puedan usar mezclas más altas de etanol con gasolina.

En la búsqueda de nuevos sustratos llegamos a encontrar materiales como la yaca, la cual presenta un campo de acción alto debido a sus múltiples propiedades actualmente reportadas. Aunque se encuentra en constante estudios por sus extrañas pero sorprendentes características, sólo un muy bajo porcentaje es el destinado para consumo humano, siendo el resto residuos lignocelulósicos que presentan un área de oportunidad grande para la producción de biocombustibles.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La excesiva dependencia de los combustibles fósiles, principalmente el petróleo, ha traído consecuencias adversas como el calentamiento global. El petróleo no es un recurso infinito ya que se estima que en 30 años su producción decaerá fuertemente. En la actualidad, la problemática del cambio climático en México y en el mundo ha traído consigo la necesidad de buscar fuentes de energía renovable. Los biocombustibles y particularmente el Bioetanol representan una vía de solución a las necesidades de obtener energía a partir de un recurso renovable, como es el caso de la Yaca, cuyas propiedades lo hacen candidato para la producción de Bioetanol.

1.2 JUSTIFICACION

La energía es un recurso indispensable en el desarrollo de las actividades que realiza el hombre, por lo que temas relacionados en la búsqueda de nuevas energías, no son de interés nacional, sino mundial.

Por lo cual es necesario realizar estudios encaminados a desarrollar nuevas tecnologías de producción de biocombustibles cuyas combustiones disminuyan la producción de gases de efecto invernadero. La producción de Bioetanol de primera generación, así como de segunda generación a partir de los materiales lignocelulósicos constituye una fuente de materia prima importante para su obtención.

La producción de Bioetanol se hará a nivel laboratorio, reproduciéndolo posteriormente a nivel planta piloto, produciendo biocombustible de primera y segunda generación, desde la parte del Pretratamiento culminando con la fermentación.

1.3 HIPOTESIS

El material lignocelulósico de la Yaca es una materia prima con potencial para la producción de Bioetanol de segunda generación, mientras que los jugos pueden emplearse para la producción de licores para consumo humano.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVOS GENERALES

Estudio exploratorio del uso potencial de los jugos de la Yaca para la producción de licores para consumo humano.

Estudio del potencial de los materiales lignocelulósicos de la Yaca para la producción de Bioetanol de segunda generación.

1.4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el material lignocélulosico y compararlo con lo reportado en la bibliografía.
- Caracterizar los jugos de la pulpa.
- Hidrolizar el material lignocelulósico por el método de ácido diluido, considerando como variables principales la temperatura, concentración de ácido y el tiempo de hidrolisis, y analizar su composición de azúcares.
- Seleccionar las condiciones de hidrolisis que permitan obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables con el menor contenido de furanos.
- Fermentar los jugos de la fruta de la Yaca, determinando cinéticas de crecimiento, rendimientos y velocidades de producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae*.

1.5 ESTADO DEL ARTE

En 2016 en México García, Riegelhaupt y Masera, en su documento publicado “Estado del arte de la bioenergía en México” muestran que la demanda por los combustibles fósiles es alta, esto en base a los datos que muestran en el año 2013. (SENER, 2014). La Figura 1.2 muestra el porcentaje de distribución que se tiene en materia de energía.

Es necesario plantear una estrategia que implique un alto compromiso gubernamental para revertir los estadísticos que tenemos hoy en día.

La situación por la que atraviesa no solo nuestro país sino el resto del mundo son delicados, por ello mismo la búsqueda de nuevas tecnologías en materia de bioenergía es de alta prioridad.

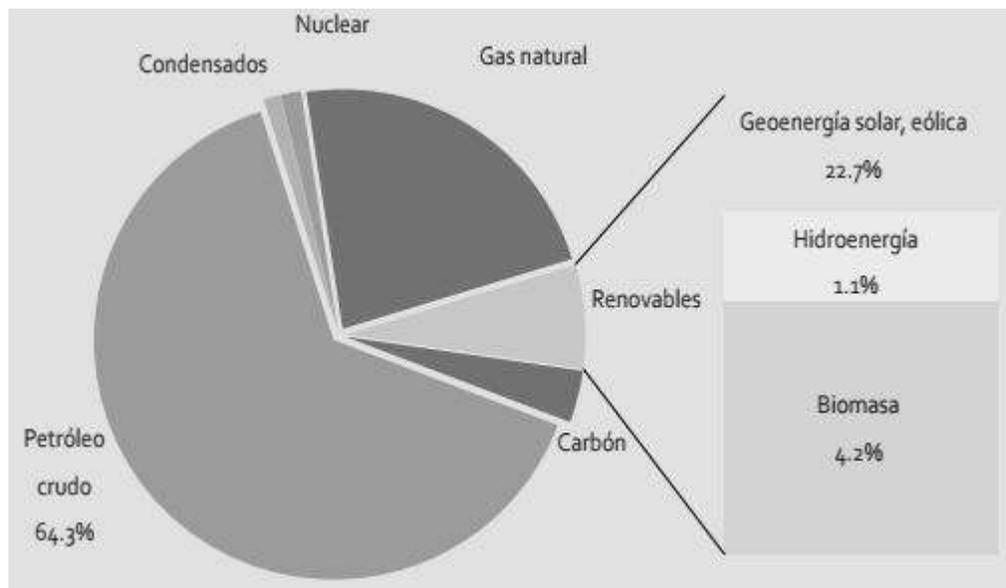


Figura 1.2 Producción de energía en 2013 (SENER 2014).

En Junio de 2009 el Quintero Ramírez publicó un ejemplar llamado “Biocombustibles lignocelulósicos: El estado del arte” en el Segundo Seminario de Divulgación Ventajas y Desventajas de las Energías Alternativas: El Caso de los Biocombustibles, en cual muestra una tabla de la producción de Bioetanol en

MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

Estados Unidos (febrero 2009) mencionando compañías, localidades y materias primas de las cuales se genera este combustible. En la Tabla 1.1 se muestran sólo algunos de estos sitios. Con esto podemos observar el desarrollo potencial que está teniendo este país en materias de energías renovables en comparación con México que no tienen aún un peso importante en este sector [1].

Tabla 1.1 Producción de Bioetanol de algunos lugares en Estados Unidos
(artículo “*Estado del arte de la bioenergía en México*”)

Compañía	Localización	Capacidad	Materia Prima
AE Biofuels	Montana	0.15	Maíz, rastrojo
KL Energy Corp	Wyoming	1.5	Madera
Poet	S. Dakota	0.02	Olote de maíz
Verenium	Louisiana	1.4	Bagazo de caña
Abengoa Bioenergy	Kansas	30	Biomasa
BluFire Mecca Llc	California	17	Desecho agrícola
Colusa Biomass	California	12.5	Cáscara de arroz
Gulf Coast Energy	Florida	25	Biomasa (madera)
Mascoma Corp.	Michigan	40	Biomasa (madera)
Poet	Iowa	25	Olote de maíz
Range Fuels	Georgia	20	Biomasa (madera)

Cabe mencionar que lo aquí mostrado es en base al documento citado al inicio, y que las tablas con los datos concentrados se encuentran en el mismo.

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

2.1 BIOCOMBUSTIBLES

Se conoce o define a los biocombustible a cualquier tipo de combustible que derive de la biomasa (es decir, que se obtiene a partir de cualquier tipo de materia orgánica). Los tipos de biocombustibles que destacan actualmente son [1,2]: El Bioetanol, es un combustible obtenido de materiales orgánicos no limitados a diferencia de los fósiles, se pueden obtener de diferentes materiales tales como maíz, sorgo, remolacha, maderas, residuos de agave, entre otros. A nivel mundial se tiene la siguiente producción: China con un aporte del 6%, La Unión Europea se tiene registrado el 3%, la India también muestra producción con un 1% y un cúmulo de algunos países el 1%, el resto corresponde a la competencia entre Brasil y Estados Unidos ya que presentan la mayor producción de este combustible. Una de las ventajas es que se puede emplear solo o como mezcla al 20% con la gasolina en los vehículos, con lo cual se puede considerar un ahorro en la factura de petróleo, al ser éste un combustible que no genera combustiones contaminantes a la atmósfera, lo hace una propuesta atractiva. Uno de los biocombustibles con mayor presencia a nivel mundial y potencia en su desarrollo es el biodiesel, durante el año de 1900, Rudolf Diesel empleó en el primer motor de diesel aceite de maní siendo pionera en este combustible. Así como el etanol puede ser producido por residuos lignocelulósicos, el biodiesel se procesa mediante aceites grasas animales, también de vegetales con lo cual abre una oportunidad al sector primario y secundarios para comercializar productos y tener mayor variedad en esto, estimulando la economía y fuentes limpias de combustibles. El biogás, por su parte, se obtiene de manera natural o mediante tecnología puntual que mediante su diseño ayuda a su producción, en este tema la materia orgánica y microorganismos juega un papel muy importante.

2.1.1 BIOCOMBUSTIBLES DE PRIMERA Y SEGUNDA GENERACIÓN

El principio para la producción de biocombustibles de primera y segunda generación es muy parecido, puede llegar a cambiar los equipos a emplear y una pauta para distinguirlos es la el sustrato que se emplea. Dentro del proceso una diferencia que se puede detectar es la ruptura de la pared celular de los materiales lignocelulósicos para los combustibles de segunda generación, en la cual se demanda un Pretratamiento térmico, químico o mecánico (según la necesidad de la materia prima) para poder sintetizar azúcares simple. De entre los biocombustibles de esta clasificación destacan el Bioetanol, Biodiesel y Biogás. Los sustratos para la obtención de los biocombustibles de segunda generación provienen de cultivos agrícolas destinados a la alimentación humana, a diferencia de los de segunda generación que no presentan alguna competencia con la la demanda de alimentos para consumo diario [3].

Debido a que la producción de biocombustibles de primera generación demandan tecnologías más simples genera una situación más económica a diferencia de los que provienen de los residuos lignocelulósicos sin embargo esta ambos procesos en el mercado aún no llegan a ser competidores en cuestión de costos, más sin embargo si son aceptados en pro de la naturaleza. La demanda de algunos pasos extra en la producción de combustibles de segunda generación provoca una búsqueda exhaustiva en alternativas de materias primas para su fabricación que disminuyan el costo de producción [4].

Puntualmente, el Bioetanol de primera y segunda generación no presenta diferencias dentro de sus producciones ya que se basan en la conversión de azúcares mediante microorganismos sin embargo el alcohol etílico es exactamente el mismo. A nivel mundial el maíz y la caña de azúcar son los principales materiales empleados para la producción de Bioetanol de primera generación sin embargo en México la regulaciones impiden emplear el maíz como tal debido a que es uno de los potentes alimentos de consumo a nivel nacional.

La Figura 2.1 nos presenta los pasos que se emplean para la producción de biocombustibles de primera y segunda generación, así como la diferencia en ambos procesos.

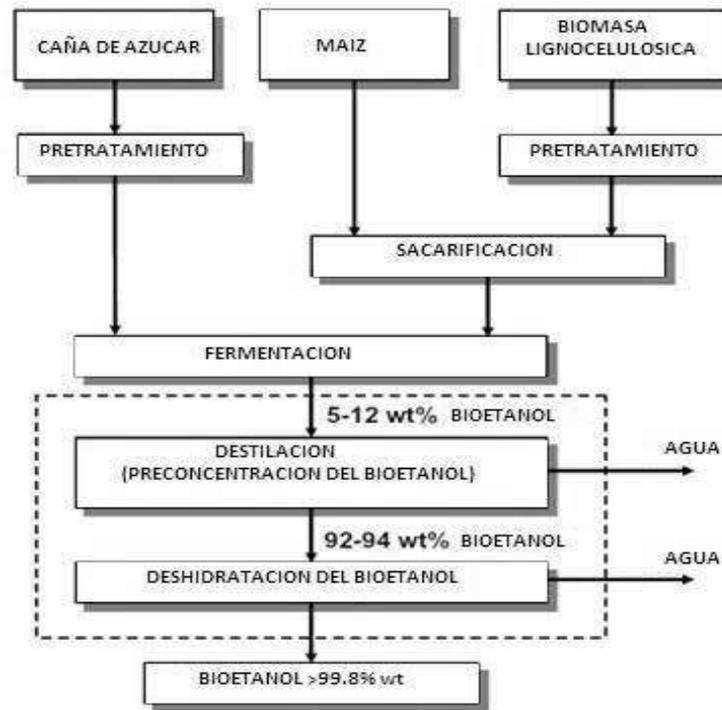


Figura 2.1 Proceso del bioetanol de primera y segunda generación.

2.1.2 BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACION

Los biocombustibles de tercera generación son aquellos provenientes de diversos organismos acuáticos, citando algunos tenemos las microalgas y también la presencia de los lirios acuáticos en gran parte del territorio global. Una desventaja considerable es que el cultivo de estos es bastante complejo y de impacto en cuestión de costos, esto al igual que en etanol demanda mayor trabajo para poder hacerlo un producto competitivo con los combustibles de origen no renovable, pese a que esto ha evitado el desarrollo a nivel industrial actualmente se busca mejorar estas situaciones mediante investigación y alternativas tecnológicas de innovación [4].

2.2 BIOETANOL

El Bioetanol es un combustible líquido el cual libera significativas cantidades de calor al quemarse y proviene de diferentes fuentes renovables. Se puede emplear directamente como un único combustible en vehículos, o como mezcla con la gasolina para ayudar en el aumento a su contenido y permitiendo una mejor oxidación de hidrocarburos, de esta manera de tiene una gran ventaja al reducir la cantidad de compuestos aromáticos y además uno de los principales problemas que es el monóxido de carbono liberado a la atmósfera. Posee un poder calorífico de 29,000 KJ/Kg [4,5].

Hoy en día varios países han estado implementados programas para la producción de etanol combustible o la adición de etanol a la gasolina, de esta manera de impulsa a la búsqueda de nuevas alternativas de energías limpias. Según la Asociación de Combustibles Renovables (RFA), la sustitución de la gasolina por Bioetanol ayuda a reducir entre un 30 a 50 % las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) [5,6].

Dentro de las ventajas que se tienen para hacer al etanol un combustible potencial, se encuentra que, proviene de una materia prima renovable y se puede emplear bajo mezclas con la gasolina. Se tiene conocimiento de que en la actualidad se pueden aprovechar todos los recursos agrícolas, además de ser una materia prima renovable, el proceso que se realice al material, no causa daño al ambiente, por el contrario, se pueden tratar los residuos generados al obtener Bioetanol de primera generación. Se ha comprobado experimentalmente que los combustibles provenientes de Bioetanol reducen las emisiones de monóxido y dióxido de carbono en una gran proporción teniendo un estimado de hasta en un 65% a 70%, al igual que una disminución considerable de las emisiones de óxido de nitrógeno [7-8].

2.3 YACA

El árbol de Yaca que se muestran en la Figura 2.2 y 2.3, conocido en inglés como Jackfruit, pertenece a la familia de las Moraceae. Tiene diferentes sinónimos al nombrarse, puede encontrarse como Jacka, Yaca, Jaca, Jaka, su nombre científico es *Artocarpus heterophyllus Lam* [10,11]. Es un árbol nativo de la India, Bangladesh y en muchas partes de Asia oriental. Actualmente la Yaca se encuentra con una alta disponibilidad, particularmente en lugares fuera de México como Malasia, China India Tailandia, Brasil. Esta fruta puede darse en climas cálidos en donde puede encontrar la forma de desarrollarse. La pulpa es el principal componente que se aprovecha en la Yaca para consumo humano, además de la semilla. Algunos lugares en el mundo aprovechan las partes internas distintas a éstas para la gastronomía, sin embargo el residuo de la Yaca tiene potencial para ser utilizado en una biorefinería para producir biocombustibles [12].



Figura 2.2 Imagen de Yacas.

Físicamente, es un árbol de tamaño mediano que suele alcanzar los 28 a 80 pies de altura, sin embargo tiene una gran resistencia debido a que la masa de

cada fruto es considerable, el árbol es fácilmente accesible para su fruto. La fruta se lleva en ramas laterales y ramas principales del árbol, la Yaca crece por parejas, sin embargo algunos productores prefieren sacrificar a uno de los frutos para evitar la competencia entre ellos y no tener un peso máximo deseado para obtener mayor ganancias, es por ellos que además del material que no se aprovecha para consumo humano este factor impulsa a la Yaca para aprovechar sus residuos en cuestiones de bioenergía. El peso medio de una fruta es de 3,5 a 10 kg y a veces una fruta puede alcanzar hasta 25 kg [11]. Hay diferentes variedades de Yaca: una es pequeña, fibrosa, y blanda, y los pétalos son dulces, con una textura como la de una ostra cruda; la otra variedad es crujiente, pero no muy dulce. Las semillas grandes de esta planta no leguminosa también son comestibles, aunque son difíciles de digerir. La semilla del Yaca se consume extensamente como postre en algunas regiones del mundo, principalmente en la India o se toma como un ingrediente en preparaciones culinarias asiáticas, actualmente a nivel nacional algunos restaurantes emplean partes de la Yaca para la gastronomía.



Figura 2.3 Árbol de Yaca.

Cabe mencionar que las semillas de Yaca tienen alto contenido en almidón. Las frutas maduras pueden ser consumidas crudas, o cocinadas en leche de coco cremosa como postre, hechas en jacones confitados.

En México se conoce que hay una producción cercana a las 14 mil toneladas de Yaca al año siendo Nayarit el estado que tiene la mayor producción dentro del país. Sin embargo lugares con condiciones climáticas propicias están apostando por esta fruta. A nivel nacional la producción de Yaca se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2.1 Volúmenes de la producción nacional de Yaca (SIAP 2014 Cierre de producción agrícola por cultivo).

Estado	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción anual (ton)	Producción (ton/ha)
Nayarit	846.73	779.73	13268.91	17.20
Veracruz	36.00	24.00	442.00	18.42
Jalisco	38.00	37.00	242.40	6.55
Colima	11.00	11.00	101.00	9.20

En el año 1992 la Yaca inició con un gran éxito centrado principalmente en Nayarit, aunque es nativa de la India, en Tepic encontró un medio climatológico apropiado para su desarrollo. Actualmente existen dos mil hectáreas en producción pese a esta información se conoce también que existen diez ejidos del municipio de San Blas que dependen del cultivo de la Yaca y hoy en día se producen en un área de mil doscientas cincuenta hectáreas.

2.4 MATERIALES LIGNOCELULOSICOS

Los materiales lignocelulósicos se conforman principalmente por 3 polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales se deben someter a

pretratamientos térmicos y químicos para transformar las amplias cadenas de carbohidratos en azúcares simples que pueden llegar a ser fácilmente fermentables para posteriormente realizar un proceso de destilación y obtener un alcohol anhidro. La biomasa lignocelulósica es un representativo del material que no puede ser empleado como alimento [13]. En términos muy generales podemos hacer mención a lo siguiente:

- Celulosa es sintetizado por organismos vivos y, la mayor parte de su procesamiento proviene de plantas, algunas bacterias, hongos y algas verdes [14].
- Hemicélulosa se encuentran presente en la pared celular de las plantas de los residuos sólidos. Consta de polímeros formados por más de un tipo de azúcares entre los cuales destacan la D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, entre otros [14,15].
- Lignina es un polímero tridimensional amorfo cuyos monómeros básicos, llamados alcoholes cinamílicos, son: el alcohol *p*-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico. Es el tercer componente predominante dentro de los materiales lignocelulósicos [15].

2.5 COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Los materiales lignocelulósicos, como se muestra en la Figura 2.4, se conforman principalmente por 3 polisacáridos, estos son celulosa, hemicelulosa y lignina. La biomasa lignocelulósica es un representativo del material que no puede ser empleado como alimento y por ende se puede aprovechar en la producción de biocombustibles presentando una oportunidad en este sector [17].

Cabe mencionar que además de estas 3 sustancias principales dentro de la materia lignocelulósica, También se pueden tener presentes algunos otros componentes dentro de la misma estructura, entre ellos destacan las cenizas, proteína, pectina y alguno metabolitos secundarios.

Sin embargo estos compuestos no se encuentran dentro de la pared celular y cabe mencionar que la cantidad en la cual están presentes es mínima es por ello que el impacto no es tan significativo como en la celulosa, hemicelulosa y la lignina.

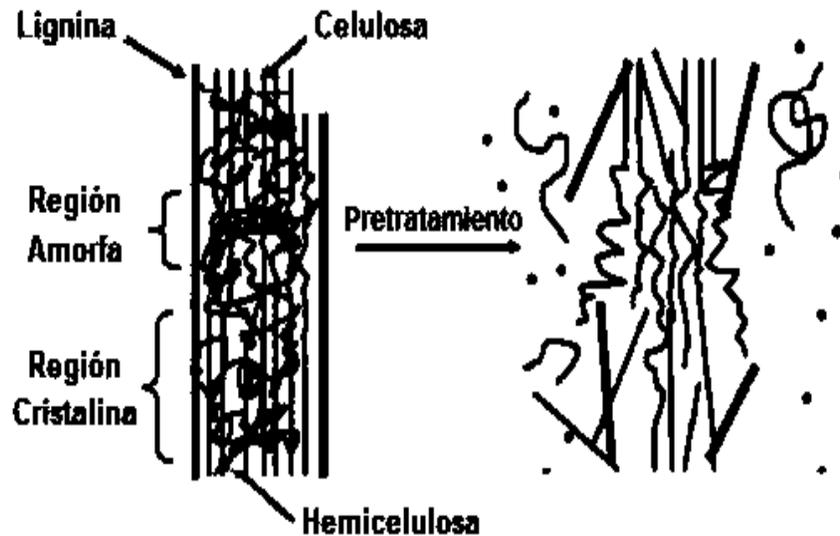


Figura 2.4 Estructura de la biomasa lignocelulósica.

Entre un 25 a 40% del peso de la materia lignocelulósica contiene lignina, al igual que en las holocelulosas (conjunto que conforman los polímeros de celulosa y hemicelulosa) se tiene una variación de $\pm 5\%$ [17-19]. En conjunto la celulosa y hemicelulosa están presentes entre un 15 a 40%.

2.6 LIGNINA

La lignina, Figura 2.5, es un polímero fenólico compuesto de unidades de fenil-propano unido por enlaces C-C y C-O-C que forman una estructura bastante compleja difícil de sintetizar a estructuras simples por métodos convencionales debido a su amorfa tridimensional.

La lignina está conformada por tres unidades básicas estas son: guaiasilo, sinapilo y p-hidroxifenilo. Las unidades estructurales de la lignina son las cinamil alcohol, las cuales son diferenciadas por las varias sustituciones del anillo aromático. La lignina tiene un carácter hidrofóbico y su principal función es actuar como cementante en la pared celular del material.

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 [19, 20].

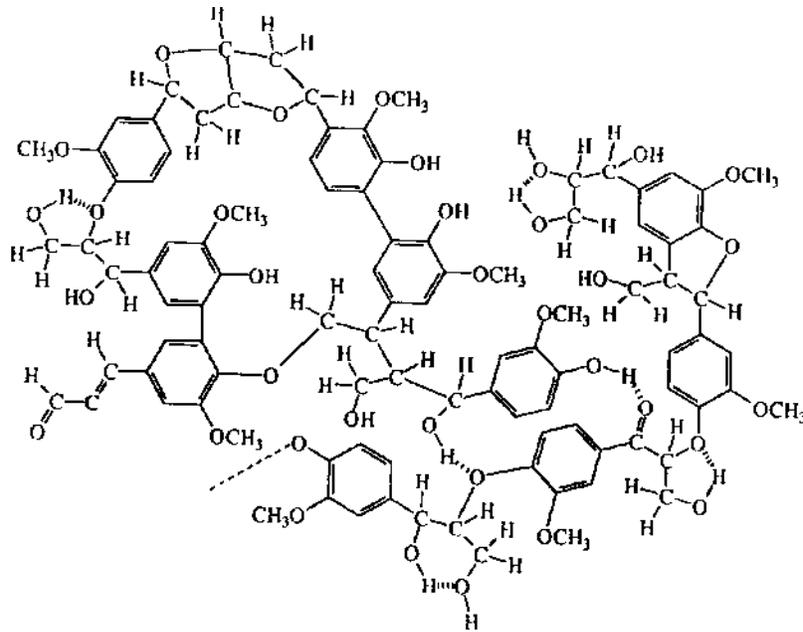


Figura 2.5 Estructura de la lignina.

2.7 CELULOSA

La celulosa es un biopolímero que forma parte de la pared celular y consiste en una unión de β -glucosa mediante enlaces β -1,4-O-glucosídicos. La Figura 2.6 muestra una cadena de celulosa.

Este polímero lineal (compuesto de monómeros de celobiosa) se sintetiza en la naturaleza como moléculas individuales de D-glucosa que se van ensamblando

en el mismo lugar en el que se producen. Las moléculas de celulosa se unen formando moléculas más largas conocidas como protofibrillas que se empaquetan en unidades mayores denominadas microfibrillas [19].

Debido a su estructura lineal y a las interacciones entre los enlaces de hidrógeno y los grupos -OH de una misma cadena o de diferentes cadenas, las moléculas de celulosa están orientadas de manera que forman estructuras cristalinas [21]. Durante el pretratamiento, la pared celular sufre una ruptura liberando la celulosa, la cual, durante el proceso de hidrólisis se descompone en glucosa.

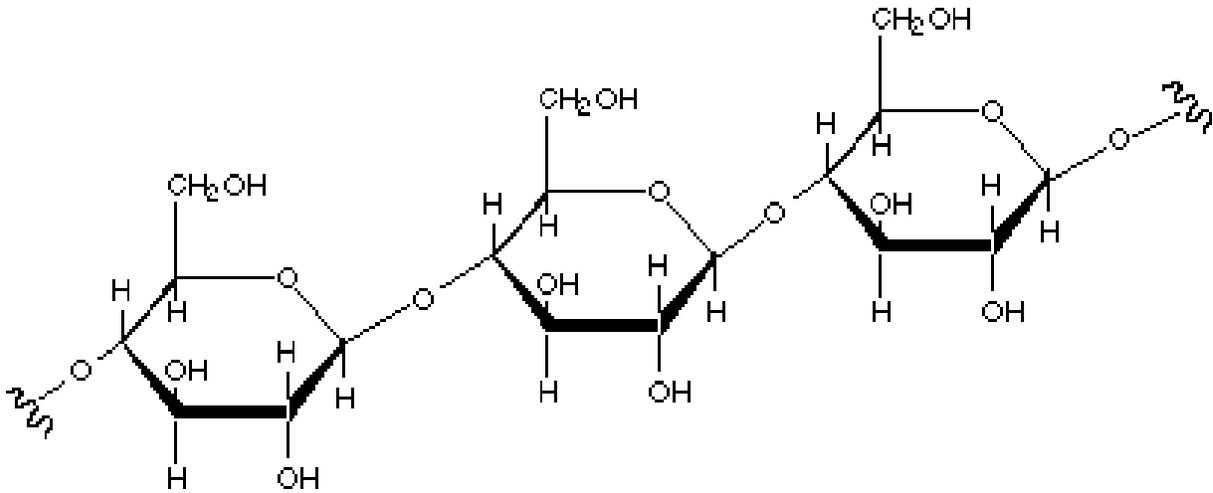


Figura 2.6 Estructura de la celulosa.

2.8 HEMICELULOSA

La hemicelulosa es un heteropolisacárido (polisacáridos compuestos por diferentes tipos de azúcares) y consta de polímeros como la D-galactosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa y por ácidos urónicos. La hemicelulosa no forma estructuras cristalinas, en cambio, forma estructuras amorfas.

Dichas cadenas, a diferencia de la celulosa, pueden presentar ramificaciones y sustituciones mediante enlaces covalentes. La Figura 2.7 muestra la estructura química que presenta la hemicelulosa.

La hemicelulosa puede ser clasificada en pentosanos, los cuales están formados por aldopentosas (monosacáridos de 5 carbonos) y los hexosanos están formados por aldohexosas (monosacáridos de 6 carbonos) [22].

Existen diferencias en la composición y estructura de las hemicelulosas entre los diferentes tipos de biomásas existentes para producir etanol de segunda generación.

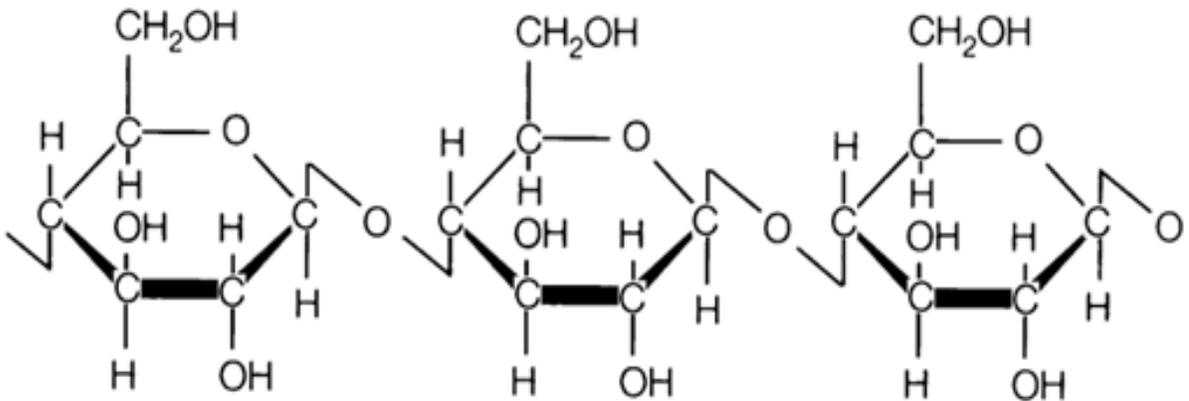


Figura 2.7 Estructura de la hemicelulosa.

2.9 PRETRATAMIENTOS

Los biocombustibles de segunda generación tienen su producción a partir de los materiales lignocelulósicos que se encuentran disponibles como residuos de campo o de industrias y con potencial para su uso, estos materiales presentan una de las fuentes con mayor cantidad de azúcares fermentables disponibles en la naturaleza [22-25].

Como principal objetivo, una de las etapas cruciales en la producción de estos biocombustibles es la ruptura de la pared lignocelulósica y reducir la proporción de sus componentes, función que realizan los pretratamientos.

Como se muestra en la Figura 2.8, esto con el fin de que en una etapa de hidrólisis enzimática, éstas puedan tener mayor acceso a los polisacáridos y convertirlos en azúcares fermentables durante el proceso su proceso, y posteriormente obtener el alcohol mediante algún microorganismo en una etapa de fermentación.

Para poder efectuar todo el proceso de forma exitosa, la materia del cual se partirá para la producción del biocombustible deben emplearse metodologías que puedan aprovechar los monosacáridos y polisacáridos estructurales para que puedan sean susceptibles a la acción de enzimas y de microorganismos fermentadores [24-26].

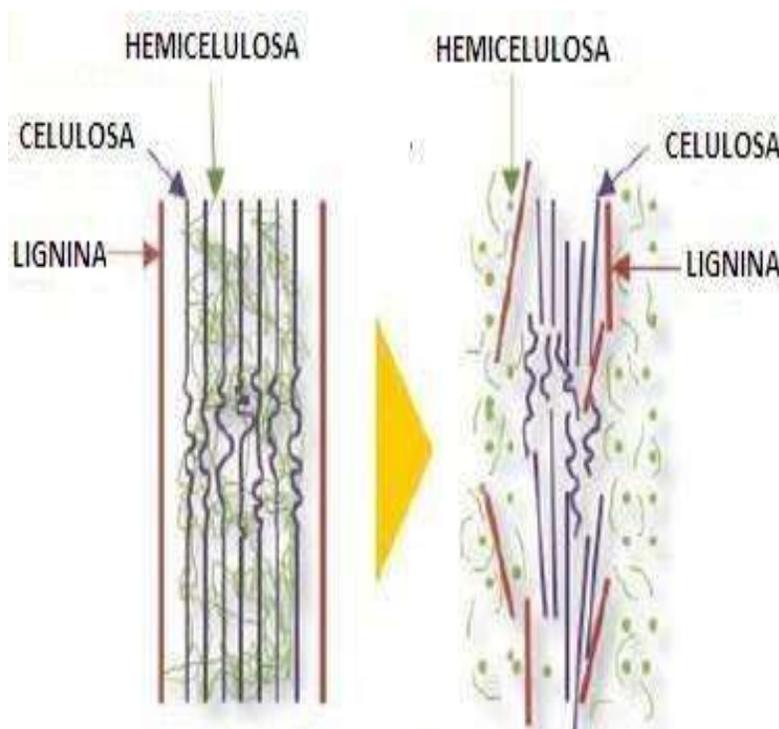


Figura 2.8 Ruptura de la pared celular mediante los pretratamientos.

Como se puede ilustrar en la figura anterior uno de los retos que presenta la estructura lignocelulósica es que tanto la lignina como la hemicelulosa forman un sello que cubre a la celulosa, cuyo polisacárido presenta mayor potencial de liberar glucosa, es por ello necesario emplear procedimientos de alto impacto en este punto.

El pretratamiento debe contribuir a la formación de azúcares simples, tales como las hexosas y pentosas, mediante la hidrólisis de la hemicelulosa y evitar la formación de subproductos inhibidores de los bioprocesos consecutivos tales como los furanos [27].

Las cadenas de hemicelulosa establecen enlaces de hidrógeno con las microfibras de la celulosa formando una matriz reforzada por la lignina, en este punto el pretratamiento debe producir la ruptura de dicha matriz liberando los polisacáridos y posteriormente retirando la lignina ya separada de la biomasa.

Los objetivos de un pretratamiento se basan en los siguientes puntos:

- Hidrólisis de la hemicelulosa.
- Rompimiento de la matriz celulosa-hemicelulosa.
- Liberación y degradación parcial de la lignina.
- Reducción del grado de cristalinidad de la celulosa e incrementar la fracción de celulosa amorfa.

Se han desarrollado diversos métodos para producción de biocombustibles de segunda generación, los cuales pueden ser químicos, físicos o biológicos [28-30].

2.9.1 HIDRÓLISIS CON PRETRATAMIENTO ÁCIDO

Conocida así debido a que implica un componente ácido diluido o concentrado (comúnmente diluido de un 2-5%, siendo el más común al 2%), para su pretratamiento, generalmente se emplea H_2SO_4 a diferentes concentraciones,

tiempos y temperaturas para conocer el comportamiento presente. Dicho proceso genera una cierta cantidad de azúcares fermentables en muy poco tiempo. Sin embargo el inconveniente que presenta es su inhibición con los microorganismos; por consecuencia la conversión de azúcares a alcohol es mínima, además de ser necesaria una detoxificación para efectuar la hidrólisis, lo que aumenta el gasto en el proceso [32].

2.9.2 PRETRATAMIENTO FISICO

En estos procesos los materiales lignocelulósicos son pasados por equipos que ayudan a cambiar la estructura física por medio de métodos de corte, molienda y cocción para reducir la cristalinidad de la celulosa, el objetivo principal es ablandar la estructura que tienen y de esa manera las enzimas puedan penetrar.

Uno de los puntos a resaltar es el gasto energético, debido a que puede parecer una producción bastante costosa debido al principio basado en procesos mecánicos, sin embargo este factor está directamente asociado con el tamaño de partícula que se quiera desear y de las características que estén presentes en la biomasa a estudiar [33].

2.9.3 PRETRATAMIENTO BIOLOGICO

En este tipo de pretratamiento generalmente se emplean microorganismos como hongos de pudrición y enzimas degradadoras de lignina. Son procesos caros y con tiempos de residencia muy largos. Sin embargo, tienen bajos requerimientos de energía y condiciones no tan agresivas como otros métodos.

2.10 HIDRÓLISIS

Para la producción de bioetanol de segunda generación, el proceso consecuente al pretratamiento es la hidrólisis.

Uno de los objetivos principales es liberar la mayor cantidad de monosacáridos de la parte lignocelulósica y degradarlos a azúcares que puedan ser fermentables, obteniendo pentosas y hexosas. La Figura 2.9 muestra la reacción química que se produce en la hidrólisis para descomponer un polisacárido en monosacárido:

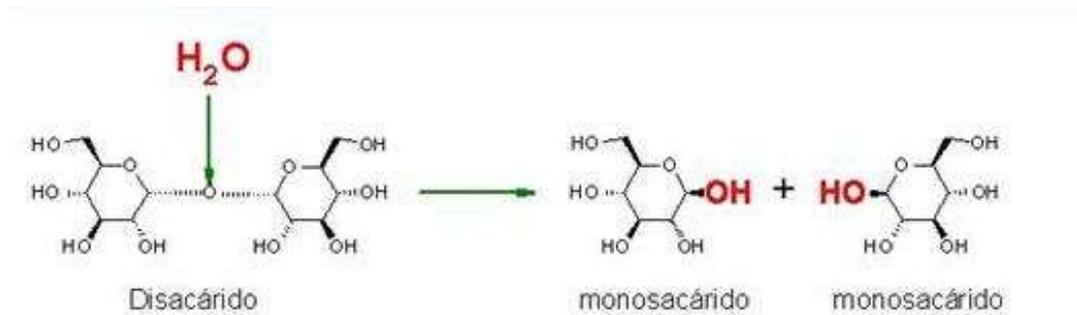


Figura 2.9 Representación de la hidrólisis de un polisacárido.

La Tabla 2.2 muestra la clasificación de las moléculas de 4 a 7 carbonos.

Tabla 2.2 Monosacáridos clasificados respecto al número de carbonos.

No. de carbonos	Categoría	Ejemplos
4	Tetrosa	Eritrosa, Treosa
5	Pentosa	Arabinosa, Ribosa, Ribulosa, Xilosa, Xilulosa, Lixosa
6	Hexosa	Alosa, Altrosa, Fructosa, Galactosa, Glucosa, Gulosa, Idosa, Manosa, Sorbosa, Talosa, Tagatosa
7	Heptosa	Seudoheptulosa, Manoheptulosa

Se conocen 2 tipos principales de hidrólisis:

- Hidrólisis enzimática
- Hidrólisis ácida.

2.11 MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN FERMENTACIÓN

2.11.1 LEVADURAS

Dentro de todos los estudios que se tienen hasta el momento la levadura más conocida a nivel mundial empleada en gran parte de los procesos a obtener alcohol etílico es la *Saccharomyces cerevisiae*. Como levaduras se puede definir en base a su estructura, ya que se muestra como un organismo eucariontes, que contiene en el núcleo dentro un material genético, su constitución celular muestra organelos, membranas, y una pared celular. Los productos que mayor demanda presentan para su uso son el pan, el vino y las bebidas alcohólicas

La fermentación llevada a cabo a escala piloto o industrial tiene su punto crucial en las levaduras, ya que son las responsables de la producción de alcohol para fines industriales y de bebidas alcohólicas. Sin embargo es posible adaptar las condiciones requeridas para poder generar biocombustibles de primera y segunda ya que la manipulación de las *Saccharomyces cerevisiae* no se muestra tan compleja como en otros microorganismos. Las bebidas alcohólicas más importantes que se producen industrialmente con intervención de las levaduras destacando entre ellas el vino, la sidra, la cerveza entre otras [18-19].

En todos estos procesos se utilizan levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae*, misma que se utilizaba en la antigüedad para el mismo fin, sin embargo el factor genético puede jugar un papel importante dentro de los resultados obtenidos lo que puede impedir una reproducibilidad total en los resultados.

2.11.2 BACTERIAS Y HONGOS

A nivel celular las características principales en las bacterias son que su célula es procariota la cual llega a ser típica de una Eubacteria, posee pared celular, membrana citoplasmática y el citoplasma sin organela, el material genético se encuentra suelto en el citoplasma ya que carece de núcleo.

En algunas especies de bacterias y hongos, éstas tienen presente plásmidos, las cuales son pequeñas moléculas circulares de ADN que ayudan a la bacteria para tener ciertas ventajas adaptativas, siendo un caso el hecho de permitir degradar distintas fuentes de carbono siendo uno de los casos a resaltar para los temas de biocombustibles [34].

2.12 FERMENTACIÓN

Se puede definir a la fermentación como el proceso que conlleva un conjunto de etapas en el cual asistido por microorganismos de manera anaerobia produce diferentes compuestos dentro de los cuales el principal es el alcohol y de manera secundaria el bióxido de carbono. Este proceso se efectúa al procesar carbohidratos y además de obtener los etOH Y CO₂, también se tiene presencia de moléculas de ATP que sirven a los microorganismos en su metabolismo celular para el consumo energético anaeróbico.

Si de fermentación se habla es necesario citar a Berzelius quien describe a la fermentación como un fenómeno catalítico, una analogía de este proceso es la descomposición del agua oxigenada por una esponja de platino.

En 1872 Pasteur (1822 – 1895) demostró que existen microorganismos presentes que vivían y se desarrollaban a expensas de las materias primas azucaradas, mientras que a través del tiempo se veía la descomposición de la misma en alcohol y CO₂, otro punto a destacar es que mostro que tales organismos vivientes constituían los fermentos organizados.

Citando parte final de la transición sufrida a lo largo de la historia para la fermentación, Buchner (1860 – 1917) en 1896 efectuó un descubrimiento que compatibilizaba la idea de microorganismos fermentativos de Pasteur y de enzimas de Liebig, demostrando que la acción fermentativa estaba en las células vivas de levaduras, pero que podía ser extraída de ellas destruyendo las células con acetona o triturando con arena, obteniendo un jugo que a pesar de hallarse libre de células, era capaz de reproducir todas las fases de la fermentación alcohólica de la glucosa.

Muchos fueron los pioneros en el proceso de la fermentación, los cuales se involucraron de manera directa. Cabe destacar que desde la antigüedad se obtiene el etanol por fermentación de azúcares con levadura en solución acuosa y posteriormente destilación. La tradicional aplicación principal ha sido la producción de bebidas alcohólicas, sin embargo, debido a los requerimientos de combustibles que no deterioren al ambiente se le ha dado una transformación a lo que hasta hace un tiempo era materia prima única de la producción de una bebida alcohólica de consumo mundial, procesando todos aquellos residuos para producir biocombustibles que sigan los puntos de la química verde y que su calidad sea tan alta como los convencionales derivados del petróleo [35,36]. Hoy en día se utilizan varios tipos de materias primas para la producción a gran escala de Bioetanol:

- Sustancias con alto contenido de celulosa
 - Madera
 - Residuos agrícolas
- Sustancias con alto contenido de sacarosa
 - Dulces
 - Caña de azúcar
 - Sorgo dulce
- Sustancias con alto contenido de almidón
 - Maíz
 - Patata
 - Yuca

A nivel mundial, la fermentación es una de las rutas viables para la producción de Bioetanol, tan solo el 5 % es por vías sintéticas. Las etapas implicadas en la conversión de biomasa a etanol anhidro son los siguientes:

- 1) La conversión de la biomasa en un material de alimentación de fermentación.
- 2) La fermentación de los compuestos intermedios de biomasa utilizando biocatalizadores para producir etanol e hidrólisis de la hemicelulosa.
- 3) El tratamiento del producto de fermentación para producir etanol.
- 4) Liberación y degradación parcial de la lignina.

El microorganismo que más se utiliza es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la cual emplea la ruta de Embden-Meyerhoff. La descripción de esta ruta se basa en obtener un par de moles de ATP por mol de glucosa. Sin embargo la bacteria *Zymomonas mobilis*, es una bacteria gram negativa que pertenece al grupo de las Pseudomonas, utiliza la ruta de Entner-Duordoff de manera anaeróbica, por dicha ruta se produce tan solo una molécula de ATP por mol de glucosa. La Figura 2.10 muestra a detalle la reacción que se tiene durante la fermentación a través de las rutas metabólicas de los microorganismos.

La fermentación es la parte final del proceso para la producir alcohol, el tiempo para que se tenga presente una alta conversión radica entre las 48 y 72 horas.

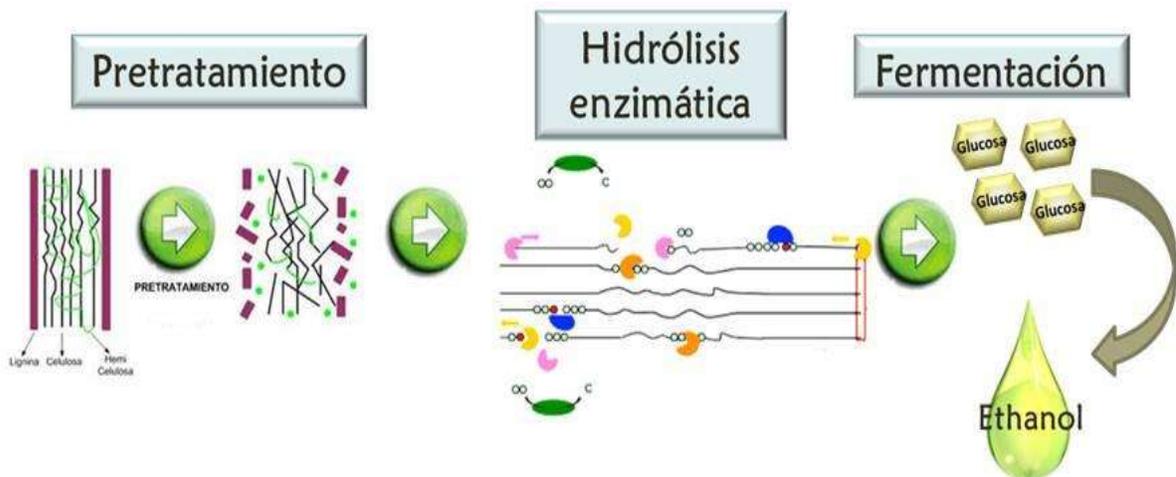


Figura 2.10 Proceso global para convertir los polímeros de la biomasa en Bioetanol.

2.13 DESTILACION

La destilación consiste en la evaporación y recuperación de las sustancias más volátiles, entre ellas el alcohol, de manera que parte del agua y otras materias pesadas quedan como residuo descartable en el fondo. La separación de mezclas azeotrópicas es de gran interés industrial, así como la necesidad de desarrollar una secuencia de nuevos procesos de destilación extractiva o realizar innovaciones en cuanto a su construcción u operación de los equipos, se ha incrementado cada vez más en la actualidad, para atender la gran demanda de procesos económicos y limpios [31-33].

La mezcla etanol-agua forma una mezcla azeotrópica de punto de ebullición mínima de composición de 89,4 % mol de etanol y 10,6 % de agua a 78,2 °C y a presión atmosférica estándar. Existen varios procesos para producir etanol anhidro estos incluyen:

- Proceso químico de deshidratación,
- Deshidratación por destilación a vacío
- Proceso de destilación azeotrópica
- Proceso de destilación extractiva
- Proceso por membranas
- Proceso de adsorción
- Proceso de destilación por difusión.

El etanol contenido en el fermentado puede separarse por cualquiera de estos métodos de destilación; sin embargo, es necesario alcanzar un porcentaje de pureza del 99% para que éste sea empleado como combustible. Generalmente, se requieren dos columnas de destilación para alcanzar hasta un 90% ó 92% de concentración de etanol [32].

2.14 CONVERSIÓN DE AZÚCARES

Los microorganismos empleados principalmente en la producción de bioetanol por su rendimiento son la *Zymomonas mobilis* y las *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo actualmente se está buscando que nuevas especies sean modificadas para estos fines. Tanto de *Zymomonas mobilis* como de *Saccharomyces cerevisiae* se tienen estudios previos respecto a la conversión de azúcares reductores procesados a alcohol en función de los tiempos, realizando corridas experimentales a nivel laboratorio bajo la variable de la concentración. Se han realizado estudios comparando la actividad que presentan ambos microorganismos, los cuales sirven como parámetro para generar modelos experimentales a diferente escala.

Los estudios que se han tenido hasta ahora arrojan comportamientos parecidos a concentración altas de azúcares reductores, sin embargo las *Zymomonas mobilis* tienen una disminución de consumo de estos monosacáridos a concentraciones abajo del 10%. Se ha demostrado que las *Saccharomyces cerevisiae* es poco osmotolerante y fermenta mejor a concentraciones parcialmente bajas de azúcares. Mientras que las *Zymomonas mobilis* toleran mayores concentraciones de azúcares debido a que las enzimas de su ruta metabólica Enter-Doudoroff no se inhiben por las altas concentraciones [19,35].

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 ETAPA 1

- Primeramente se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva de los diferentes procesos empleados en la producción de bioetanol, así como, con los distintos pretratamientos más usados comúnmente para realizar pruebas con la biomasa de Yaca.
- Otro punto a recabar fueron los estudios actuales de la Yaca para poder compararlos con lo obtenido.

3.2 ETAPA 2. BALANCE GENERAL Y CARACTERIZACIÓN

- Separar cada componente de la Yaca (cáscara, fibra, pétalos, pulpa y semilla) tal como se muestra en la Figura 3.1
- Extraer el jugo de la pulpa y posteriormente centrifugarlo para su cuantificación, y cuantificar los azúcares mediante HPLC y patrones de monosacáridos y disacáridos.
- Caracterizar todos los componentes de la Yaca (cáscara, pétalos, fibra y semillas) para efectuar la hidrólisis. Realizando pruebas para la cuantificación de:
 - % Humedad
 - % Lignina
 - % Celulosa
 - % Hemicelulosa
 - Cantidad de cenizas
 - Azúcares estructurales.

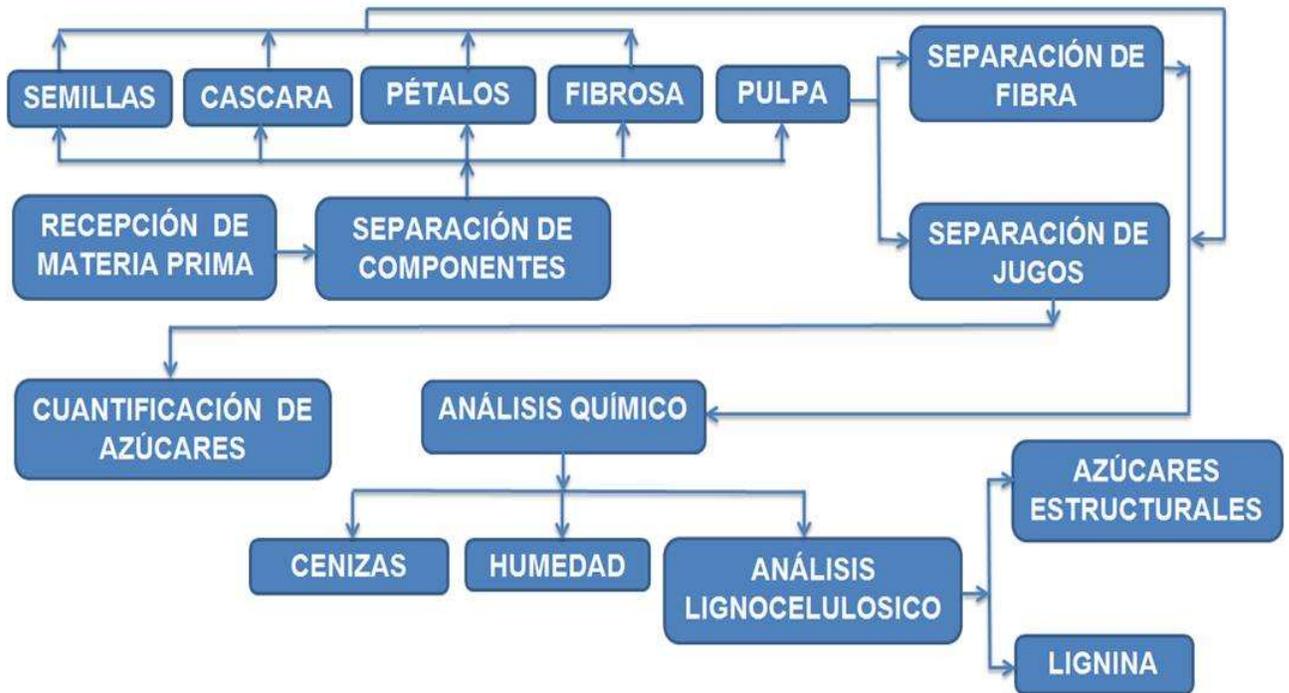


Figura 3.1 Diagrama de bloques del proceso.

- Realizar el balance correspondiente para conocer el porcentaje másico que aporte cada componente de la Yaca.

3.2.1 CARACTERIZACIÓN DE AZÚCARESESTRUCTURALES (HIDRÓLISIS ÁCIDA CUANTITATIVA)

La siguiente metodología describe el proceso realizado para la cuantificación de los azúcares estructurales. Cabe mencionar que toda la técnica descrita corresponde al laboratorio nacional de energía renovable [37].

- Se pesaron 300.0 ± 10.0 mg de cada uno de los componentes de la Yaca en un tubo con rosca. Registrando el peso de manera precisa para los cálculos posteriores. Cada muestra debe ser analizada en triplicado.
- Se añadieron 3 mL de ácido sulfúrico al 72% a cada muestra. Empleando un Vortex para mezclar hasta que la muestra estuviera bien mezclada.

- Se colocaron todas y cada una de las muestras en un baño de agua ajustado a 30°C e incubar la muestra durante 60 minutos. Cada 5 minutos se agitaban las muestras mediante un Vortex, Cabe mencionar que la agitación es esencial para asegurar un contacto uniforme entre el ácido y la muestra.
- Una vez completada la hidrólisis de 60 minutos, se retiró cada uno de los tubos del baño de agua.
- Se pasaron las muestras a un frasco con rosca y se añadieron 84ml de agua destilada para diluir la concentración hasta 4%.
- Se colocaron las muestras en una Autoclave durante una hora a 121 ° C. Después de completar el ciclo de autoclave, se dejaron enfriar hasta llegar a la temperatura ambiente.
- Al llegar a estas condiciones se filtró en vacío la solución de hidrólisis autoclaveada.
- Se transfirió una alícuota, aproximadamente 50 ml, en un matraz de almacenamiento de muestras.
- Se tomó una alícuota de 3 ml del sobrenadante y se detoxificó mediante carbonato de calcio para cada muestra llegando a pH 5-6. Añadiendo el carbonato lentamente después de alcanzar un pH de 4.
- Se prepararon las muestras para el análisis de HPLC pasando el líquido decantado a través de un filtro de 0,2 µm a un vial de muestreo automático. Las muestras neutralizadas se pueden almacenar en el refrigerador durante tres o cuatro días.

3.3 ETAPA 3. BARRIDO EXPERIMENTAL DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Posterior al análisis anterior se optó por un tratamiento químico con ácido sulfúrico diluido. Se mantuvo constante la relación de sólido de la muestra, siendo ésta del 15% y la temperatura de 127°C, la condición térmica fue establecida en

base a la capacidad de la autoclave que se tenía en ese momento. La primera variable a manipular fueron los tiempos dentro de la autoclave.

Para esta primera etapa toda la relación se estableció en base a los factores que se dejaron como fijos:

- Temperatura: 127°C.
- Relación 15% muestra/solución.
- Concentración del ácido: 2%
- Tiempos diversos: 0min, 5min, 10min, 15min, 30min y 60min.

Cada una de las pruebas se realizó por triplicado para conocer el comportamiento de cada uno de los experimentos.

Es necesario resaltar que las condiciones de entrada y salida fueron idénticas en cada una de las pruebas manteniendo el mínimo margen de variación. La entrada de la hidrólisis fue a 60°C aproximadamente, esto con la finalidad de optimizar los tiempos de la prueba y realizarlas en serie evitando que el equipo enfriara y esperar a que nuevamente la temperatura llegue a las condiciones deseadas.

Al retirar los frascos con las hidrólisis, la muestra se dejó enfría hasta temperatura ambiente.

Se pesan y colocan 6 gr de biomasa seca y molida, se agregan 34 g de ácido sulfúrico al 2% w/w (Relación 15% w/w entre materia sólida y el ácido diluido). Se opera a 127°C durante diferentes tiempos, al transcurrir este tiempo, el sólido se debe detoxificar mediante una solución de carbonato de calcio. Posteriormente el sólido se lava con agua destilada y se cuantifica el efluente obtenido. La materia sólida se coloca a 60°C durante 24 horas para su secado. Transcurrido este tiempo la materia sólida se pesa.

El sólido residual es nuevamente caracterizado para conocer la cantidad de azúcares y lignina que se encuentran aún dentro del material. El proceso a seguir es el mismo que en la etapa 3.2.1.

Al obtener el punto óptimo del diseño anterior, se hace un nuevo barrido, dejando ahora el tiempo y la temperatura constante, variando la concentración de ácido. El tiempo óptimo se tomó en 10 min en base a los resultados obtenidos. Ver tabla 3.1.

Tabla 3.1 Diseño experimental a diferentes tiempos.

Temperatura (°C)	Concentraciones (% AS)	Tiempos (min)
127	2	0
127	2	5
127	2	10
127	2	15
127	2	30
127	2	60

En base al barrido anterior y conociendo el punto óptimo a 10 minutos, las nuevas condiciones realizadas por triplicado se muestran a continuación:

- Temperatura: 127°C.
- Relación 15% muestra/solución.
- Tiempo de contacto: 10min.
- Concentraciones de ácido sulfúrico diversas: 1%, 1.5%, 2%, 2.5% y 3%.

El proceso se describe de la siguiente manera: se pesan y colocan 6 gr de biomasa seca y molida, se agregan 34 g de ácido sulfúrico a diferentes concentraciones (Relación 15% w/w entre materia sólida y el ácido diluido). Se opera a 127°C durante 10 minutos, al transcurrir este tiempo, el sólido se debe detoxificar mediante una solución de carbonato de calcio. Al igual que en el barrido anterior, la entrada de la hidrólisis en la autoclave fue a 60°C aproximadamente, esto con la finalidad de optimizar los tiempos de la prueba y realizarlas en serie evitando que el equipo enfriara y esperar a que nuevamente la temperatura llegue a las condiciones deseadas.

Al retirar los frascos con las hidrólisis, la muestra se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.

Posteriormente el sólido se lava con agua destilada y se cuantifica el efluente obtenido. La materia sólida se coloca a 60°C durante 24 horas para su secado. Transcurrido este tiempo la materia sólida se pesa. El sólido nuevamente fue caracterizado mediante la metodología de la NREL, descrita anteriormente. El diseño se muestra en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Diseño experimental a diferentes concentraciones.

Temperatura (°C)	Concentraciones (% AS)	Tiempos (min)
127	1	10
127	1.5	10
127	2	10
127	2.5	10
127	3	10

3.4 ETAPA 4. FERMENTACIÓN DE JUGOS

Realizar medios para el acondicionamiento del microorganismo (medio sólido y medio líquido), inoculando con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Se debe hacer, además, un conteo celular mediante un espectro de luz para determinar la Densidad Óptica a la que se encuentra el microorganismo).

La preparación del medio constante de lo siguiente:

- El medio líquido de conservación sirve como inóculo de activación para la fermentación de los jugos, colocando una concentración de 10g/L de levadura. Posteriormente es transferido a un segundo medio de igual concentración para que se puede llevar a cabo la reproducción de la biomasa. Se prepara mediante los siguientes compuestos y reactivos a las siguientes concentraciones, las cuales solo se adaptan al volumen a trabajar:

➤ Glucosa	40 g/L
➤ Peptona	20 g/L
➤ Extracto de levadura	10 g/L

Previo a estas condiciones es necesario realizar cinéticas de crecimiento para conocer el comportamiento del microorganismo y establecer un proceso estándar.

Antes de llevar a cabo la parte fermentativa y bajo las condiciones anteriores fue necesaria activar al microorganismo mediante una torre de control de temperatura y pH. El sistema consta también de un baño con una base para agitación. El pH era regulado mediante una solución de KCl 3M la cual era suministrada a las muestras mediante un set-point establecido en la columna, el sistema estaba automatizado para esta función. Por su parte los jugos fueron previamente esterilizados a 121°C. El proceso general se muestra en la figura 3.2



Figura 3.2 Diagrama de bloques de la producción de Bioetanol de primera generación.

Es necesario correr estas pruebas al menos por duplicado para conocer el comportamiento y rendimientos del Bioetanol.

Los tiempos de muestreo se establecieron en base a la actividad del microorganismo, sin embargo las primeras horas son cruciales para la cuantificación.

La figura 3.3 muestra el equipo de fermentación empleado.



Figura 3.3 Equipo de fermentación.

3.5 ETAPA 5. CUANTIFICACIONES POR HPLC

Mediante este método se pueden analizar diferentes tipos de muestras para cuantificar la concentración de azúcares y alcohol presentes después de concluir el proceso de fermentación.

La metodología que es la siguiente:

- Tomar 0.2 ml de cada una de las muestras de los jugos obtenidos transcurridas las 72 horas de la sacarificación y fermentación para ambas generaciones, diluirlas a una relación 1:10 (0.2 ml de muestra con 1.8 ml de agua para HPLC) y colocarlas en eppendorfs.
- Se colocan en el carrusel de una centrifuga cuyas condiciones serán 10 minutos a 13300 rpm para que precipite el sólido de la muestra.
- Al concluir ese tiempo, se filtran pasándolo sobre una membrana Milipore de 0.22 μm reteniendo microorganismos que pueden estar presentes y puedan alterar los resultados.
- Finalmente son colocados en viales cónicos, equilibrados a un volumen mayor a la mitad de su capacidad para que el cromatógrafo no succione aire.
- Los viales serán colocados en el carrusel del cromatógrafo y se analizan bajo las siguientes condiciones:
 - Columna Metacarb 87C a 60°C
 - Flujo isocrático de agua a 0.6 mL/min
 - Detector de índice de refracción
 - Tiempo de muestra: 55 minutos

 - Columna Resex a 65°C
 - Flujo isocrático de agua a 0.6 mL/min
 - Detector de índice de refracción
 - Tiempo de muestra: 60 minutos

Previamente se prepararan soluciones estándares de diferentes azúcares, alcoholes y lignina, esto debido a que la muestra que será leída en el equipo deberá integrarse para poder identificar los picos resultantes en la cromatografía. Las concentraciones de los estándares deberán oscilar entre 0.5 y 20 g/L para generar una curva de calibración. Posteriormente, a todas las corridas del cromatógrafo se debe leer el área bajo la curva de los picos para determinar las concentraciones.



Figura 3.4 Equipo HPLC.

3.6 ETAPA 6. ESCALAMIENTO

Comparar los resultados obtenidos a nivel laboratorio, seleccionando el proceso con los mejores resultados, determinando así las condiciones más óptimas para escalar el proceso a nivel planta piloto.

Cuantificar el etanol obtenido después de la etapa de fermentación para la producción de Bioetanol de primera generación.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DESCRIPCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA YACA

Actualmente la Yaca se encuentra en estudio en diferentes puntos a nivel mundial, esto debido a las características que conllevan esta fruta. Aunque diferentes bibliografías citan que la Yaca es una flor, y no un fruto, lo real es que al conocerla se tienen diferentes componentes que la hacen altamente atractiva. La figura 4.1 muestra el tamaño, color y forma de la Yaca.



Figura 4.1 Imagen de una Yaca de estudio proveniente de Tepic.

Dentro de las características y componentes que se percibieron al conocer la Yaca fueron:

- La cáscara es de color verde, a través de la maduración toma un color café y el fruto como tal expide un aroma característico. Su estructura es parcialmente blanda. Existe una fibra presente entre la cáscara y los

pétalos, de aspecto carnosos pero no muy dulce, tiene un color similar a los pétalos pero fácilmente se oxida como se muestra en la figura 4.2.



Figura 4.2 Cáscara y fibra de la Yaca.

- Un contenido de resina color blanco que a través del tiempo cambia a un tono marrón, se adhiere a cualquier material con el que entre en contacto, sin embargo, dependiendo de la maduración de la fruta y la variedad se puede percibir en mayor o menor cantidad, el volumen dentro de las Yacas que se estudiaron fue de 2.5 ml. Cabe mencionar que esta materia es proveniente de Tepic, Nayarit.
- Cuenta con un corazón en la parte central de la Yaca, es en ese material donde se concentra la mayor cantidad de resina contenida en toda la estructura de la fruta como se muestra en la figura 4.3. Está en contacto directo con los pétalos. Es de consistencia semirrígida.



Figura 4.3 Corazón de la Yaca.

- Lo pétalos cubren totalmente al fruto, tienen azúcares y un color menos intenso que la Pulpa. En la actualidad y sobre todo en lugares donde la Yaca es nativa o silvestre se emplean para la gastronomía en diferentes platillos, sin embargo la mayoría de los consumidores consideran esto como un residuo. El hecho de contener una concentración de azúcares, la hacen un material aprovechable para la generación de biocombustibles. La figura 4.4 muestra el aspecto de los pétalos.



Figura 4.4 Imagen de los pétalos que contienen la Pulpa.

- La Pulpa es el componente de mayor valor en la Yaca, aunque la cantidad que está presente en la Yaca es bajo, oscilando entre un 25 y 30 por ciento

de la masa total. Tiene una consistencia crujiente, con alto °Brix y con diferentes sabores al paladar. Se realizó un experimento en el que de la Pulpa de una misma Yaca, 5 personas la probaron dando su opinión respecto al sabor y su estado anímico en ese momento, la tabla 4.1 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 4.1 Resultado de estudio detección de sabor-estado anímico.

Personas	Sabores	Sabor Predominante	Estado
1	Mango, Piña, Durazno	Dulce	Alegre/Estable
2	Kiwi, Naranja, Plátano	Ácido	Preocupado
3	Plátano, Mango, Melón	Dulce	Preocupado/Estable
4	Mango, durazno, Plátano	Dulce	Ligeramente Estresado
5	Naranja, Toronja, Durazno	Ácido	Estresado/Preocupado

Existe una relación entre el estado anímico que se tenía en ese momento y el sabor percibido al momento de degustarlo. La imagen 4.5 muestra la apariencia de la Pulpa.



Figura 4.5 Pulpa de Yaca.

- La semilla se encuentra dentro de la Pulpa, es color beige y de tamaño considerable, se encuentran de entre 15-25 semillas, si la Yaca está muy madura la semilla germina dentro de la Pulpa, con lo cual las propiedades de la Pulpa cambian. Actualmente la semilla lo consideran para alimentarse sin embargo y siendo este un caso similar a los pétalos es considerado más como un desecho. La figura 4.6 muestra el aspecto de las semillas.

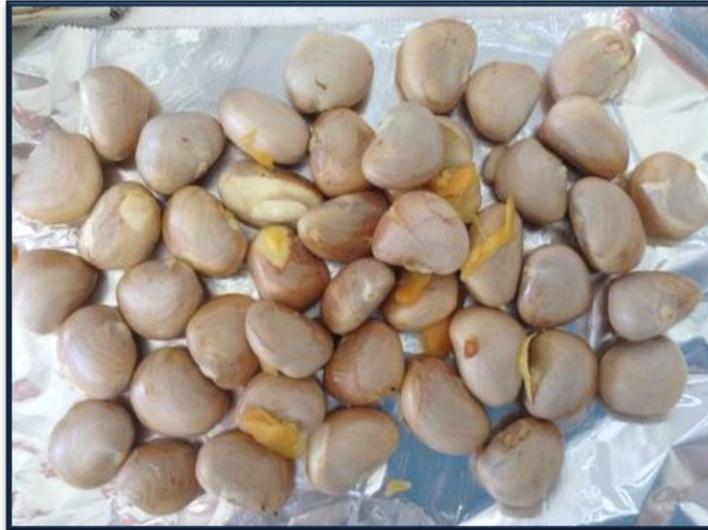


Figura 4.6 Semillas de Yaca.

4.2 BALANCE DE MATERIA

Se realizaron varios tipos de corte para poder obtener cada componente que se quiso estudiar de la Yaca, sin embargo se notó que el corte de manera transversal ayuda a que no se dañe la pulpa que está cubierta por los pétalos. El balance de masa se realizó bajo 2 estudios en base a 2 meses distintos, esto debido a que se contó con Yaca de Agosto y de Octubre, cabe mencionar que las 2 Yacas de Octubre fueron las que se emplearon para toda la experimentación que se explica en el resto de los resultados.

Uno de los puntos a analizar en esta parte es, si cambia la composición porcentual de alguno de los materiales conforme al tiempo o si se tenía una tendencia similar.

La Tabla 4.2 se muestra el porcentaje de semilla, Cáscara, Fibra y Pulpa. En este estudio la fibra se juntó con los pétalos, debido a eso se tiene un mayor porcentaje dentro de la composición total. Por disponibilidad de materiales se contaban con 2 Yacas únicamente.

Tabla 4.2 Composición porcentual de la Yaca en Octubre.

Pesos en kg de Yacas de Octubre									
Yaca	Masa total	Masa semilla	Masa cáscara	Masa fibra	Masa pulpa	%Semilla	%Cáscara	%Fibra	%Pulpa
1	6.97	0.40	1.78	3.04	1.75	5.74	25.54	43.62	25.11
2	7.36	0.42	1.81	3.27	1.86	5.71	24.59	44.43	25.27

La figura 4.7 muestra gráficamente los resultados reportados en la tabla anterior, como es de notarse la fibra más pétalos tienen una composición considerable, con lo que podemos mencionar que su uso para la producción de biocombustibles respecto al aporte masico es factible.

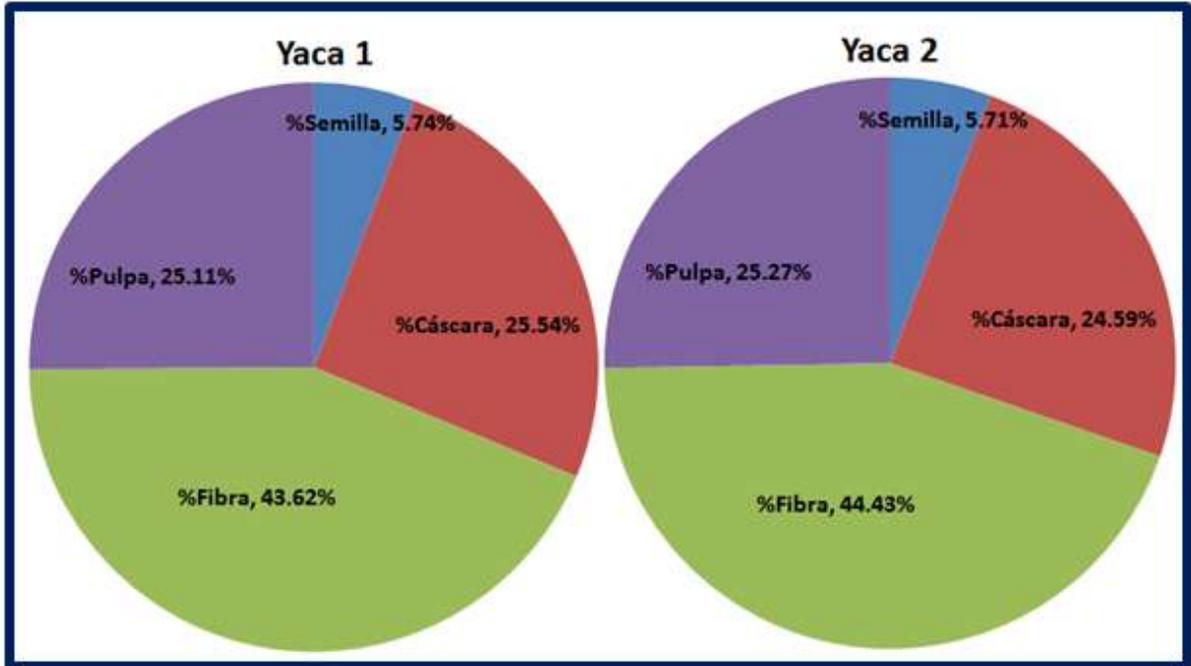


Figura 4.7 Gráfica de Pastel de Yaca 1 y Yaca 2.

En cuanto al balance realizado para las Yacas del mes de Agosto se efectuaron cuantificaciones para los siguientes componentes: semilla, cáscara más fibra, corazón y la pulpa. Este estudio a diferencia del anterior se hizo de esa manera ya que fueron con las primeras Yacas que se tuvieron, por ende al ser material de estudio poco conocido fue necesario conocer el aporte de todas y cada una de sus partes. La tabla siguiente muestra los resultados en cada una de las Yacas. Los elementos a cuantificar fueron:

- En el estudio 1, 2 y 3, el porcentaje de semilla, cáscara y fibra juntas, el corazón y la pulpa.
- En el cuarto sólo fue el porcentaje de semilla, la cáscara y fibra (también incluyendo el corazón) y la cantidad de pulpa.

Tabla 4.3 Composición porcentual de la Yaca en Agosto

Composición porcentual de Yacas de Octubre				
Yaca	%Semilla	% Cáscara/fibra	% Corazón	%Pulpa
1	5.54	53.14	8.49	32.84
2	5.84	56.35	7.11	30.71
3	5.70	55.33	8.64	30.33
4	5.85	64.07	N/A	30.08

La figura 4.8 muestra graficamente los resultados reportados e la tabla anterior.

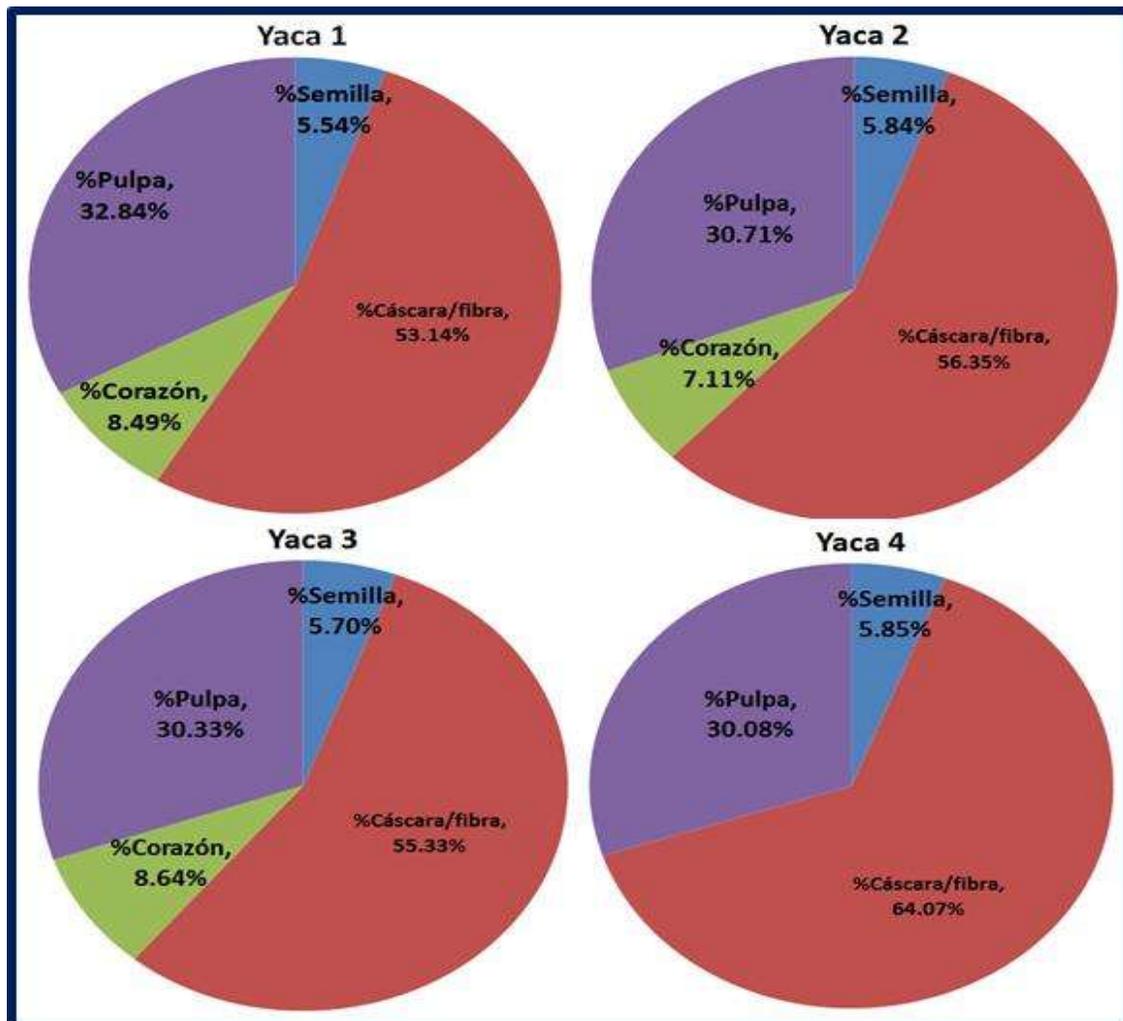


Figura 4.8 Gráfica de Pastel de las 4 Yacas.

4.3 PORCENTAJE DE HUMEDAD

El cálculo del porcentaje de humedad se realizó por triplicado y para cada una de las 2 Yacas empleadas en la experimentación. Se tomó humedad de la fibra y pétalos juntos, la cáscara y la pulpa, cada uno de los componentes se molió para fines prácticos. Las tablas siguientes muestran el resultado de cada análisis por triplicado.

$$\%H = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \times 100$$

Tabla 4.4 Muestras de humedad Yaca 1.

Yaca 1			
	Muestra (gr)	Muestra seca (gr)	% Humedad
Fibra Y1	0.500	0.093	81.500
	0.500	0.093	81.380
	0.500	0.104	79.300
Cáscara Y1	0.500	0.102	79.700
	0.500	0.099	80.180
	0.500	0.106	78.720
Pulpa Y1	0.500	0.121	75.860
	0.490	0.123	74.816
	0.500	0.119	76.260

Tabla 4.5 Muestras de humedad Yaca 2.

Yaca 2			
	Muestra (gr)	Muestra seca (gr)	% Humedad
Fibra Y2	0.514	0.081	84.306
	0.535	0.089	83.333
	0.500	0.080	83.960
Cáscara Y2	0.597	0.139	76.642
	0.627	0.144	76.993
	0.594	0.129	78.352
Pulpa Y2	0.555	0.135	75.582
	0.509	0.127	75.103
	0.590	0.153	74.114

Para el caso de la pulpa, fue necesario incorporar un proceso de extracción de jugo para obtener la fibra sobrante, la fruta se tomó compuesta de ambas Yacas. Se tomaron 2 muestras, una de la fibra resultante de la centrifugación y otra más de la pulpa completa sin extraerle nada, ambas fueron por duplicado. Los resultados podemos verlos en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Muestras de humedad de pulpa y fibra.

	Muestra (gr)	Muestra seca (gr)	% Humedad
pulpa de fibra	1.275	0.314	75.402
	0.866	0.210	75.773
pulpa de jugo	0.959	0.231	75.962
	0.555	0.134	75.833

La siguiente grafica muestra los resultados promedios de la humedad en cada componente de cada Yaca.

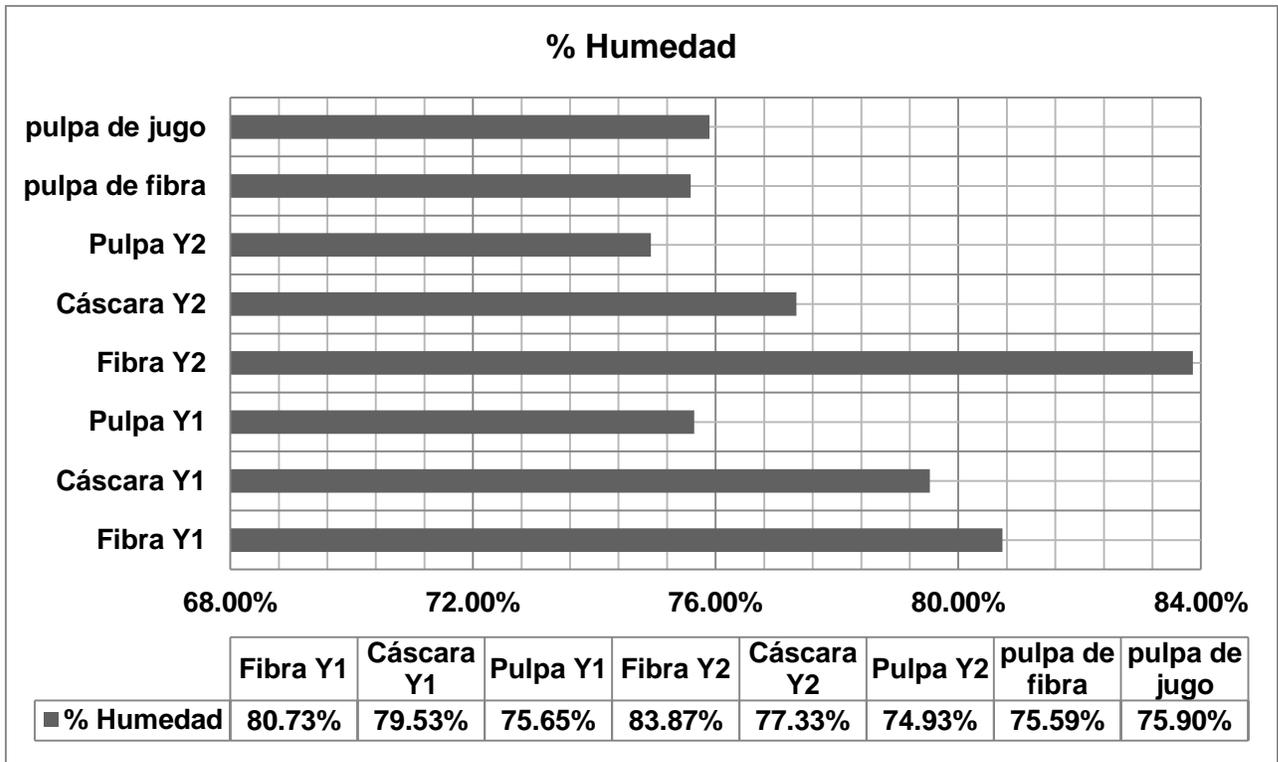


Figura 4.9 Gráfica de humedad promedio por componente.

4.4 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO Y JUGOS DE YACA

La metodología que maneja el laboratorio nacional de energía renovable (NREL por sus siglas en Ingles) describe el procedimiento a emplear para la caracterización de los materiales lignocelulósicos, cabe mencionar que a partir de esta etapa ya no se considera un análisis por Yaca, sino un análisis de ambas respecto a cada componente, esto debido a que los primeros resultados no mostraron una desviación considerable entre ellos. Todos los resultados son generados a través de la técnica por ácido concentrado, en la cual se pueden tener diversos análisis y resultados respecto del mismo procedimiento inicial. Esto nos ayudará a definir la factibilidad de todo el material lignocelulósico de la Yaca para su aprovechamiento a Bioetanol.

4.4.1 CUANTIFICACIÓN DE CENIZAS

En cuanto a las cenizas, se siguió la metodología correspondiente, siendo los resultados obtenidos los que se muestran en la tabla 4.7.

$$\%C = \left(\frac{C_f}{C_i} \right) \times 100$$

Tabla 4.7 Resumen de resultados de cenizas.

	Muestra antes (gr)	Muestra después (gr)	% Cenizas
Cáscara	0.5098	0.0285	5.590
	0.5427	0.0321	5.914
	0.5229	0.03	5.737
Pétalos	0.5137	0.034	6.618
	0.5041	0.0322	6.387
	0.5066	0.0327	6.454
	0.5084	0.016	3.147

Semillas	0.5143	0.0151	2.936
	0.5272	0.0145	2.750
Fibra	0.5857	0.0445	7.597
	0.6398	0.0508	7.939
	0.6078	0.0515	8.473

Se realizaron por triplicado para la cáscara, los pétalos, las semillas y la Fibra. Como se puede notar, en la fibra es donde se presenta una mayor cantidad de cenizas. A primera instancia se esperaba lo mismo de la cáscara esto en base a la estructura física que tiene. Las semillas, dentro del análisis mostraron un bajo porcentaje de cenizas presentes.

La figura 4.10 muestra los resultados promedios de la cantidad de cenizas en la fibra, semillas, pétalos y cáscara.

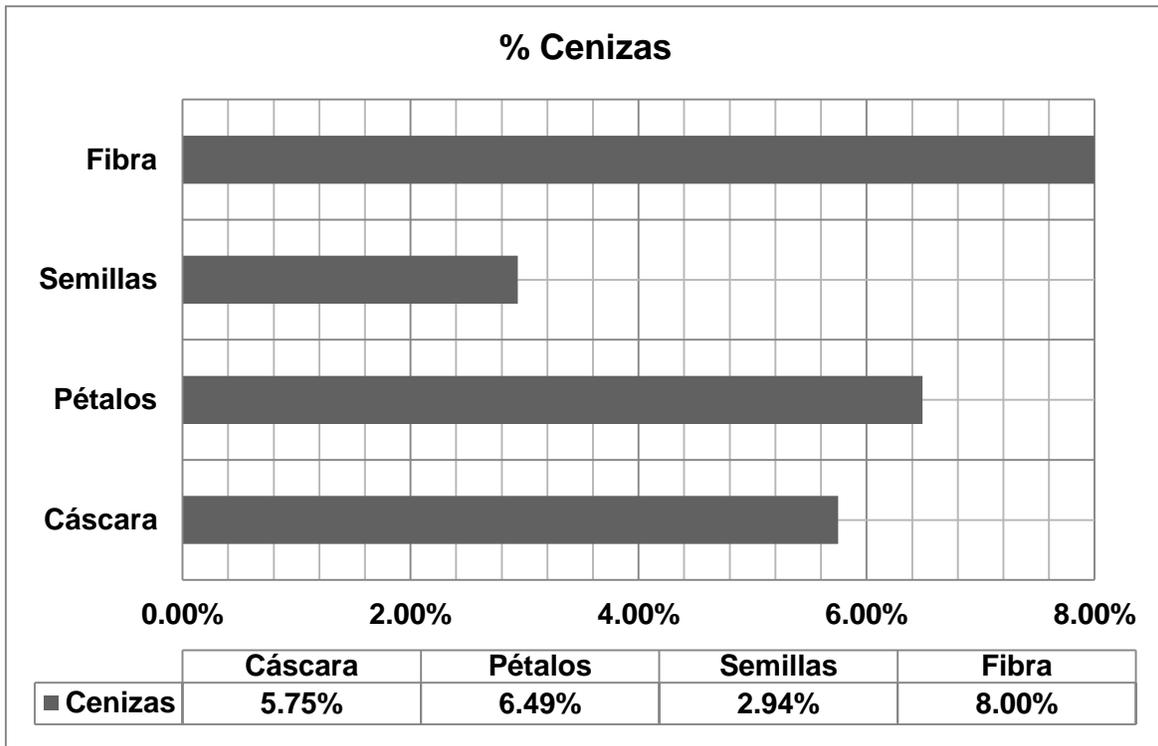


Figura 4.10 Gráfica de cenizas promedio por componente.

4.4.2 CUANTIFICACIÓN DE LIGNINA INSOLUBLE

La lignina insoluble no queda inmersa dentro de la muestra que se analiza, a diferencia de la lignina soluble, ésta puede ser observada por su color oscuro y una técnica de cuantificación por diferencia de pesos.

Para esta parte, la muestra se colocó en papel aluminio a seco peso constante para tener un dato más preciso de este cálculo, sin que afecte en demasía la humedad del ambiente.

Para el cálculo de la lignina insoluble

$$\%LI = \left(\frac{L_f}{L_i}\right) \times 100$$

La tabla muestra el resultado de la caracterización de la lignina en cada componente y a su vez cada prueba por triplicado.

Tabla 4.8 Resumen de resultados de la lignina insoluble.

	Muestra antes (gr)	Muestra después (gr)	%Lignina Insoluble
Pétalos	0.3022	0.0237	7.842%
	0.3008	0.0219	7.281%
	0.3008	0.02929	9.737%
Semillas	0.3003	0.048	15.984%
	0.3014	0.0559	18.547%
	0.3012	0.0334	11.089%
Pulpa	0.3012	0.013	4.316%
	0.3014	0.0137	4.545%
	0.3017	0.0134	4.441%
Fibra	0.3015	0.0775	25.705%
	0.3006	0.0792	26.347%
	0.3011	0.0814	27.034%
Cáscara	0.3008	0.0944	31.383%
	0.3009	0.0949	31.539%
	0.3012	0.0925	30.710%

La figura 4.11 muestra los resultados promedios de la cantidad de lignina insoluble en la fibra, semillas, pétalos, pulpa y cáscara.

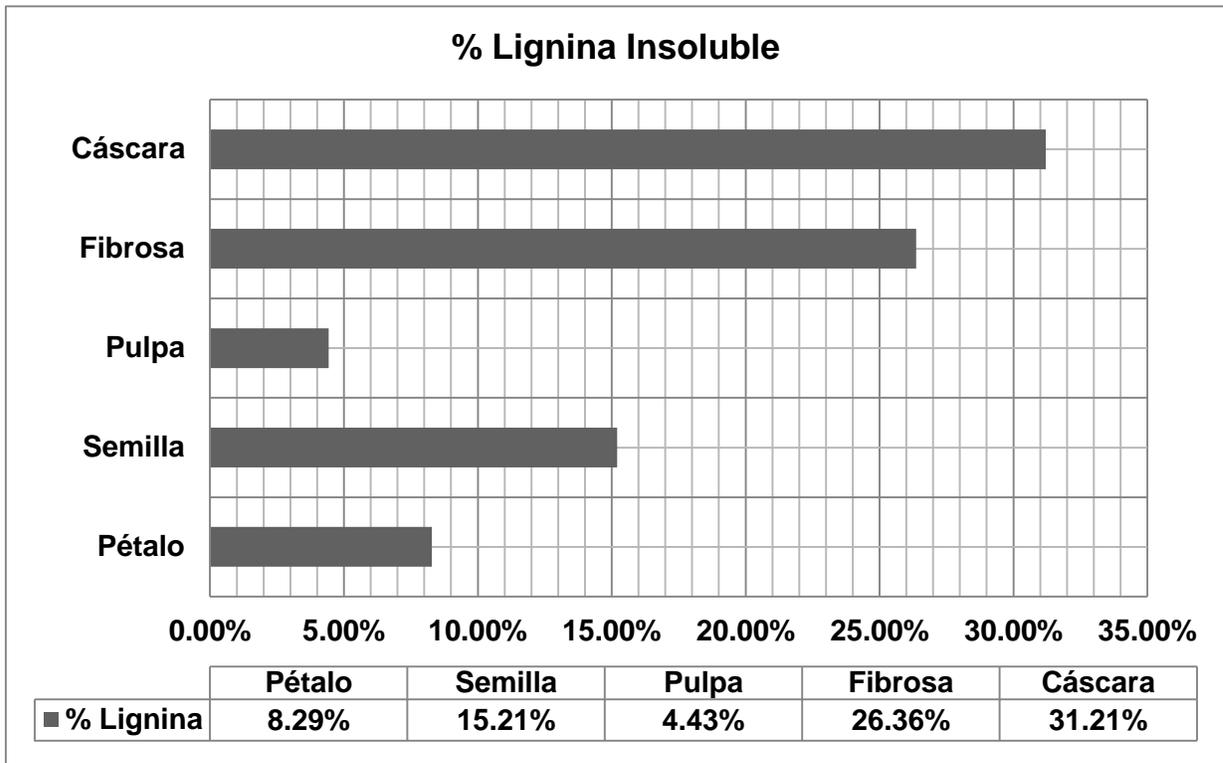


Figura 4.11 Gráfica de lignina insoluble promedio por componente.

Los resultados arrojan un porcentaje alto en la cáscara y la fibra, esto es de esperarse debido a que en la estructura que presentan esos materiales generalmente predomina la lignina en un mayor aporte porcentual. La madera tiene una composición general de entre 15 y 20 % de lignina según lo que se reporta en la bibliografía, mientras que, como podemos observar la cáscara tiene hasta un 31.21% de Lignina.

La pulpa por su parte, tiene un muy bajo contenido de este biopolimero dentro de su composición.

Este material también puede aprovecharse para la obtención de diferentes productos aromaticos de alta demanda o interes nivel industrial.

4.4.3 CUANTIFICACIÓN DE LIGNINA SOLUBLE

En bibliografía es poca la información disponible y bajo estudio a estos niveles sobre la Yaca, por esa razón los resultados para la lignina que se encuentra homogénea dentro de nuestra muestra serán de gran importancia para líneas de investigación posteriores.

$$\%LS = \left(\frac{ABS * r * A}{B * L * d} \right) * 100$$

Las condiciones de cálculo y factores que se emplearon en base a las condiciones y materiales empleados, fueron los siguientes:

- ABS = Dato de absorbancia obtenida del espectro.
- r = Factor de dilución, 5
- A = Volumen de dilución, 86.73ml.
- B = peso de muestra, 300mg.
- L = Longitud de onda, 320nm.
- d = Distancia de celda, 1.5 cm.

La longitud de onda que se usó para la cuantificación fue de 320nm, esto debido a que en el apartado 11.3, página 10 del artículo “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomas” del laboratorio nacional de energía renovable se encuentra un cuadro comparativo que muestra distintas materias primas y las condiciones a usar para los análisis de la lignina soluble.

Tabla 4.9 Resumen de resultados de la lignina soluble.

	%ABS	%Transmitancia	%Lignina Soluble
Pétalos	0.309	49	0.0931%
	0.298	50.3	0.0897%
	0.276	52.9	0.0831%
Semilla	0.2	63.1	0.0602%
	0.206	62.3	0.0620%

	0.205	62.3	0.0617%
Piel	0.245	56.89	0.0738%
	0.236	58.1	0.0711%
	0.227	59.29	0.0684%
Cáscara	0.078	83.56	0.0235%
	0.084	82.4	0.0253%
	0.09	81.28	0.0271%
Pulpa	0.206	62.23	0.0620%
	0.23	58.8	0.0693%
	0.254	55.72	0.0765%

La figura 4.12 muestra los resultados promedios de la cantidad de lignina soluble presente en la fibra, semillas, pétalos, pulpa y cáscara.

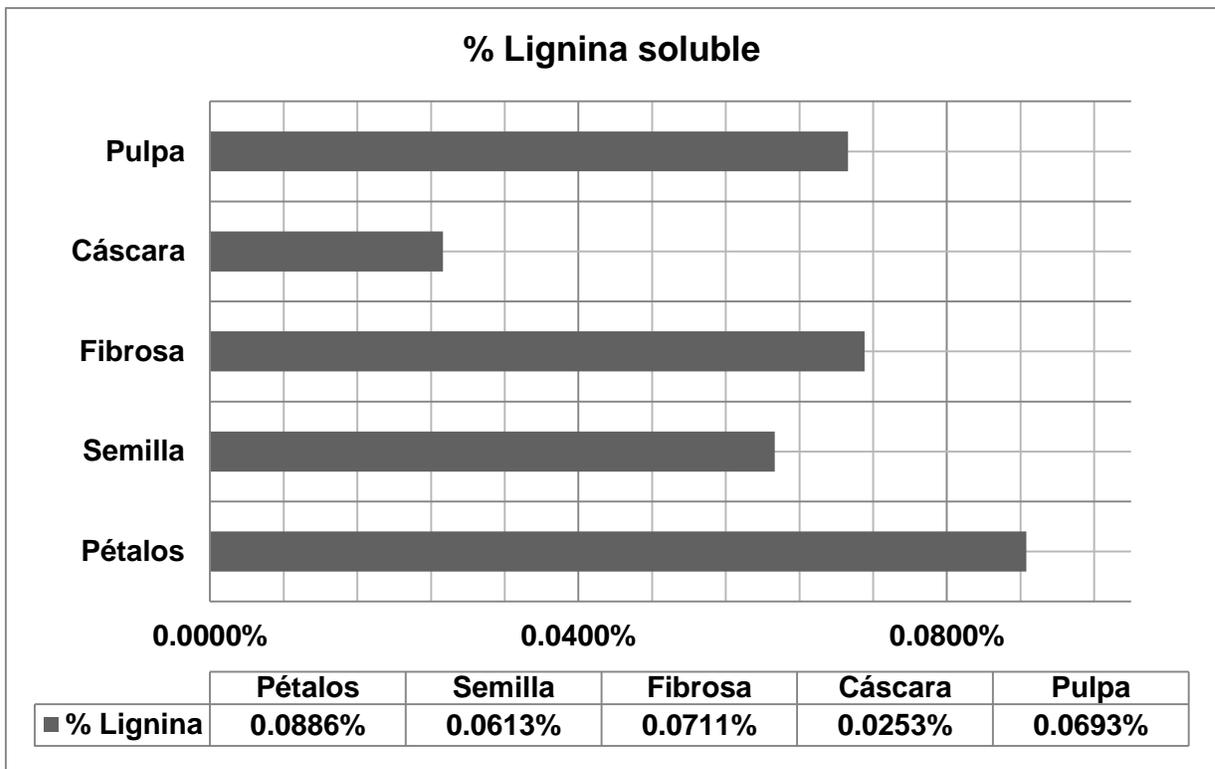


Figura 4.12 Gráfica de lignina soluble promedio por componente.

4.4.4 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES ESTRUCTURALES POR COMPONENTE

Uno de los puntos fundamentales dentro de la caracterización es la cantidad de azúcares estructurales que componen nuestro material lignocelulósico. Los resultados mostrados en la tabla 4.10 definen la cantidad que componen a cada una de las partes de la Yaca. Para su cálculo fue necesaria una curva de calibración arrojada por el equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) marca Varian, el cual cuenta con un lector de IR y UV. La corrida se realizó mediante la columna Metacarb 87C, tomando diferentes patrones afines y correspondientes a carbohidratos de 5 y 6 carbonos. Posterior a esto, se empleó una formula definida por la NREL, en la cual tenemos:

$$\%Glu = (((((C * 87 * 162)/1000)/180)/0.3))x100$$

$$\%Xil = (((((C * 87 * 132)/1000)/150)/0.3))x100$$

El valor de la variable C en cada una de las formulas corresponde a la concentración obtenida mediante los datos obtenidos en el HPLC, calculando el área bajo la curva.

Tabla 4.10 Resultados por triplicado del %Glucanos y %Xilanos.

	%Glucanos	%Xilanos
Semilla	80.55%	14.99%
	80.97%	14.89%
	81.39%	14.90%
Fibra	45.04%	8.50%
	45.14%	8.38%
	45.67%	8.18%
Cáscara	8.98%	3.02%
	8.85%	2.34%
	8.52%	2.48%
	49.34%	8.31%

Pulpa	49.85%	8.92%
	50.59%	8.81%
Pétalos	49.08%	9.31%
	49.00%	9.18%
	49.61%	9.14%

La figura 4.13 muestra los resultados promedios de la cantidad de glucanos y xilanos identificados en base a esta técnica. Aunque la semilla reporta un porcentaje muy alto de azúcares la realidad es que también está compuesta por una cantidad considerable de proteína. Dentro de la búsqueda bibliográfica que se realizó en su momento, datos para comparar son muy escasos, sólo se manejan resultados muy generales reportados en diferentes artículos. La información y cálculos aquí mostrados pueden servir de referencia para siguientes estudios.

Cabe mencionar que, aunque el HPLC es uno de los métodos más precisos para identificación y cuantificación de muestras, la realidad es que puede existir cierta variabilidad entre muestras.

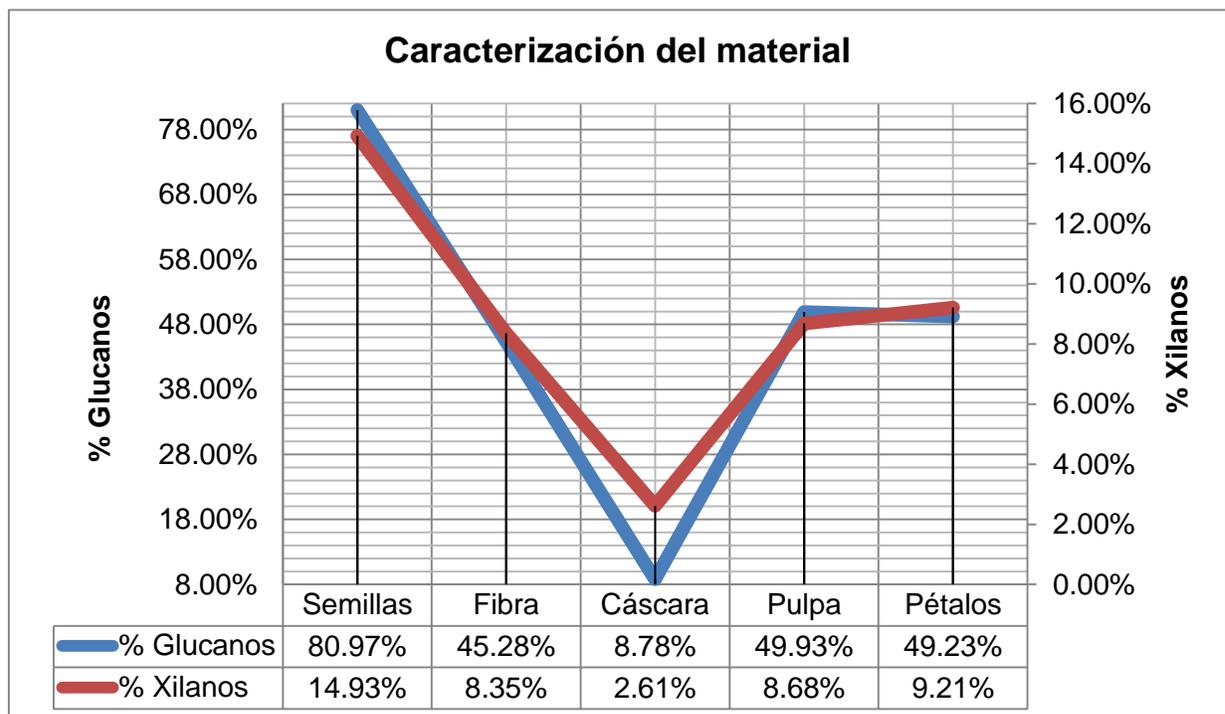


Figura 4.13 Gráfica de los porcentajes promedios del glucanos y xilanos.

4.4.5 CUANTIFICACIÓN DE JUGOS

Para poder obtener el jugo de la pulpa fue necesario emplear una extracción de la fruta, para posteriormente centrifugar el residuo de modo que se aproveche lo máximo de este material y además conocer el porcentaje de jugo fermentable que se puede procesar. La centrifugación primero se realizó a 4,000rpm, sin embargo durante un rango de entre 10 y 15 minutos el rendimiento de jugo era cercano a un 50%. Se hizo otra prueba a 13,300rpm por 8 minutos, alcanzando el resultado mostrado en la tabla 4.11. Cabe mencionar que todos los cálculos se hicieron en función de la masa y no del volumen y por triplicado.

Tabla 4.11 Rendimiento Jugo y Fibra de la Pulpa.

	%Jugo	%Fibra
Pulpa	66.318%	33.682%

Dentro del estudio bibliográfico se menciona que el jugo de la Yaca contiene Glucosa, Fructosa y Sacarosa, siendo esta última la de mayor presencia dentro del cuerpo de la pulpa. La figura 4.14 resume los resultados de la cantidad azúcares sin esterilizar en los jugos de la Yaca.

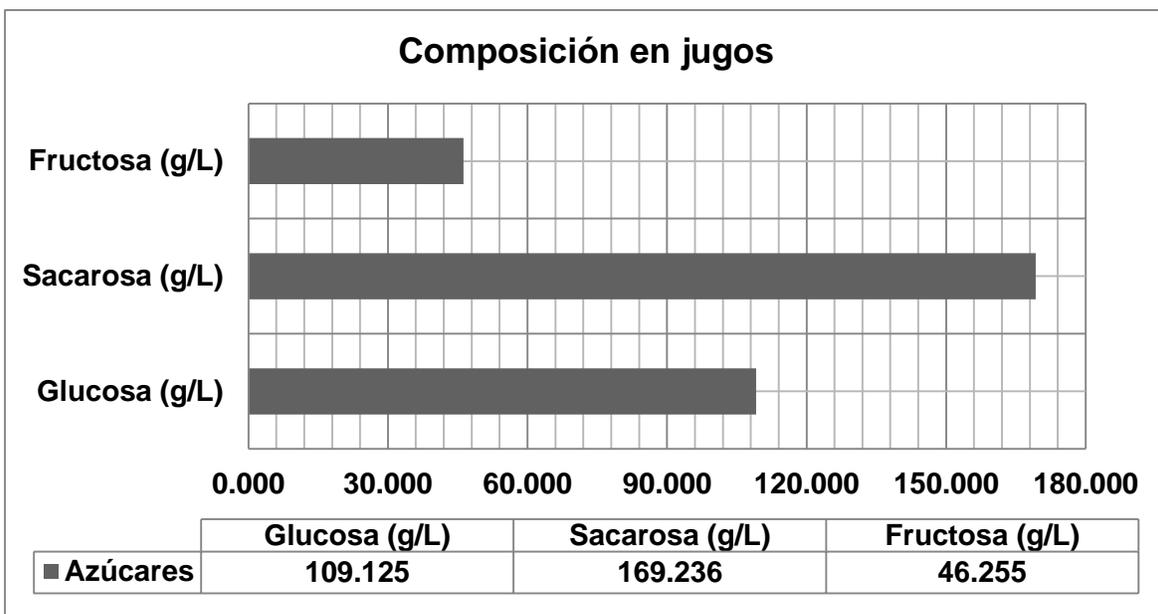


Figura 4.14 Composición de los jugos de la Yaca.

La figura 4.15 muestra el porcentaje de sacarosa, fructosa y glucosa, teniendo un 52.13% de Sacarosa.

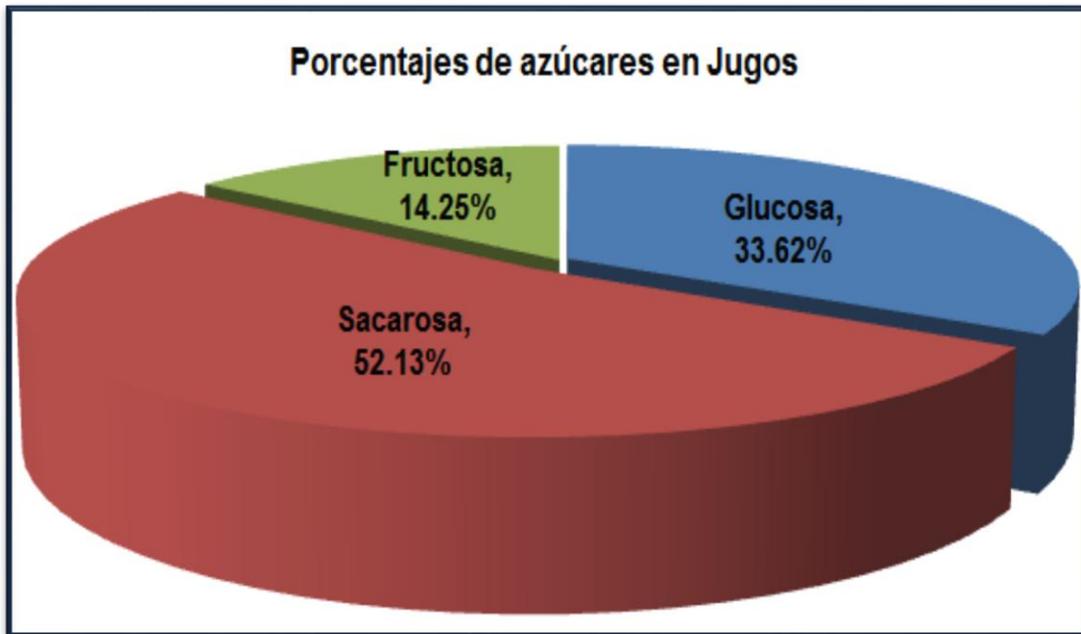


Figura 4.15 Porcentajes de azúcar en jugos de la Yaca.

4.5 CORRIDAS EXPLORATORIAS

Debido a que no se tenía conocimiento certero del comportamiento que podía llegar a tener la pulpa para obtener los jugos a fermentar se hicieron pruebas preliminares para observar la tendencia que se tenía y buscar la forma de ahorrar un proceso de extracción. Cabe mencionar que estas pruebas se corrieron al momento que se estaba caracterizando todo el material lignocelulósico y los jugos, es por ello que no son datos tan precisos que siguieran una metodología estandarizada, siendo simplemente resultados exploratorios con relaciones pulpa/agua a cierta temperatura y tiempos, cuantificado los azúcares por HPLC. Las pruebas que se realizaron fueron: A) Tratamiento térmico 45 min, 121°C, relación=1:1. B) Tratamiento térmico 30 min, 121°C, relación=1:1. C) Tratamiento térmico 60 min, 121°C, relación=1:2. D) Tratamiento térmico 60 min, 121°C, relación=1:1. La figura 4.16 muestra una gráfica con los resultados de las pruebas exploratorias. Como era de esperarse estas condiciones térmicas ayudaron al desdoblamiento parcial del disacárido.

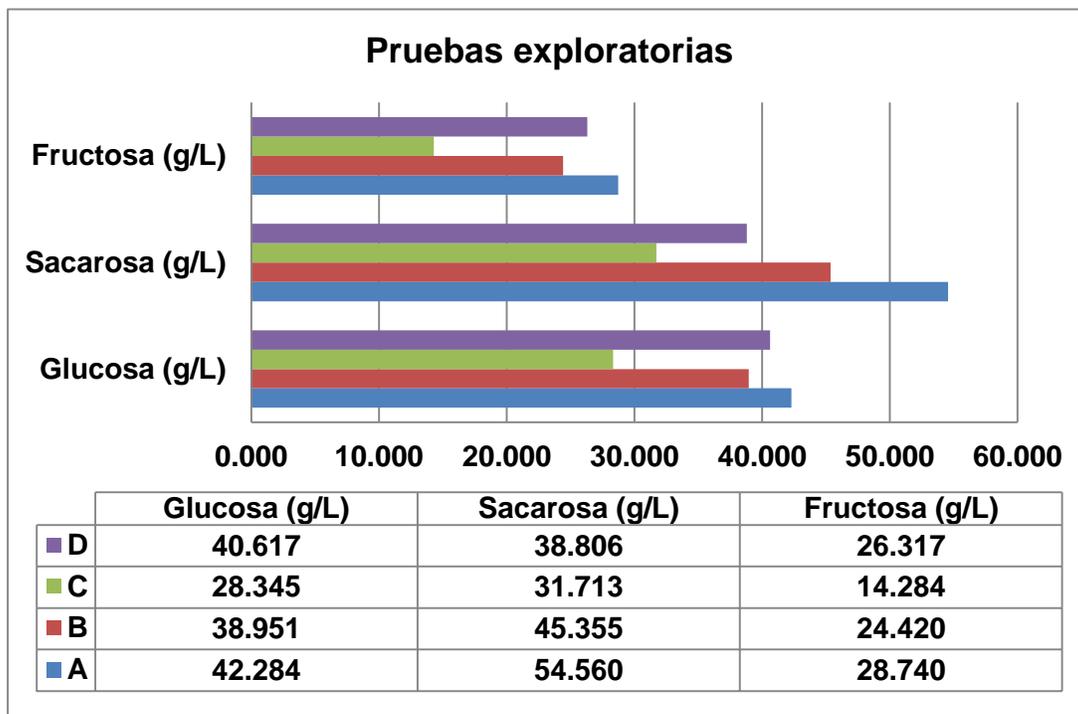


Figura 4.16 Resultados de pruebas exploratorias.

4.6 HIDROLISIS ÁCIDA.

En base a los resultados que se obtuvieron durante la caracterización del material lignocelulósico, se realizó un barrido experimental mediante una hidrólisis con ácido diluido (ácido sulfúrico). El diseño constó de manipular 2 variables, la concentración de ácido y el tiempo de contacto. Se usó una autoclave Felisa a 127°C debido a que fue la temperatura máxima que alcanza el equipo, y una relación de sólido del 15% peso/peso en base a recomendaciones bibliográficas. La finalidad de sólo manipular 2 variables fue para reducir la cantidad de experimentos, además de que se realizó un análisis de caracterización al residuo sólido de la hidrólisis. Se partió con la manipulación por tiempos con la finalidad de obtener un punto óptimo que se empleará como constante para la siguiente corrida a diferentes concentraciones. Otro método que hubiera mostrado una abanico más amplio de resultados fuese una matriz de los 6 tiempos y las 5 concentraciones, sin embargo los experimentos a elaborar serían bastantes ya que se deben elaborar por triplicado para tener un mayor grado de confianza y se debe considerar que los sólidos residuales también deben ser analizados.

Se manejaron 6 tiempos distintos, 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min y 60 min. Mientras que para la concentración de ácido se tuvieron los puntos 1%, 1.5%, 2%, 2.5% y 3%.

Todos los resultados presentes se llevaron a cabo con muestra unificada de las 2 Yacas y la combinación de todos los componentes exceptuando a la semilla, esto por la cantidad considerable de proteína que se tiene. Además de que este material se encuentra en estudio para darle un mejor aprovechamiento.

La muestra en todos los casos se ajustó ya que tiene en promedio una humedad al ambiente del 6.87%.

**4.6.1 BARRIDO: TEMPERATURA-CONCENTRACIÓN CONSTANTE
Y TIEMPO VARIABLE.**

La tabla 4.12 resume los resultados obtenidos mediante HPLC, al variar los tiempos de la corrida, dejando constante una concentración de ácido sulfúrico al 2%. Los azúcares obtenidos fueron la glucosa, la xilosa y la arabinosa.

Tabla 4.12 Resultados de la hidrolisis a diferentes tiempos.

	Temp °C	Tiempo (min)	Relación sólido	Conc. H2SO4	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)
h1	127.0	0.0	15%	2%	10.174	18.508	1.994
h2	127.0	0.0	15%	2%	11.135	18.823	2.078
h3	127.0	0.0	15%	2%	10.435	19.033	2.185
h4	127.0	5.0	15%	2%	10.794	17.436	2.821
h5	127.0	5.0	15%	2%	10.857	18.126	2.651
h6	127.0	5.0	15%	2%	11.502	22.747	3.096
h7	127.0	10.0	15%	2%	11.896	20.364	2.971
h8	127.0	10.0	15%	2%	11.046	19.510	2.988
h9	127.0	10.0	15%	2%	11.482	20.190	3.058
h10	127.0	15.0	15%	2%	11.457	20.928	3.715
h11	127.0	15.0	15%	2%	12.477	20.161	3.361
h12	127.0	15.0	15%	2%	13.044	21.756	3.904
h13	127.0	30.0	15%	2%	13.777	26.309	3.992
h14	127.0	30.0	15%	2%	13.095	21.986	3.570
h15	127.0	30.0	15%	2%	13.276	24.210	3.893
h16	127.0	60.0	15%	2%	12.710	24.068	3.811
h17	127.0	60.0	15%	2%	12.342	21.684	3.587
h18	127.0	60.0	15%	2%	12.608	22.830	3.546

Cabe mencionar que estas muestras se corrieron con una curva estándar que constó de 7 puntos con la finalidad de tener mayor confianza en las lecturas en caso de tener concentraciones pequeñas de algún azúcar en las muestras. Debido a diferentes situaciones que se presentaron con el comportamiento del HPLC al momento de realizar las corridas, se hicieron replicas para obtener puntos reproducibles dentro del análisis. La tabla 4.13 señala la desviación estándar presente durante los resultados de cada tiempo corridos por triplicado.

Tabla 4.13 Desviación estándar de los resultados en cada tiempo.

T (min)	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
0.0	0.497	0.264	0.096
5.0	0.392	2.888	0.225
10.0	0.425	0.452	0.046
15.0	0.804	0.798	0.275
30.0	0.353	2.162	0.221
60.0	0.190	1.192	0.143

La figura 4.17 muestra la comparativa entre los resultados obtenidos de cada tiempo y los azúcares reportados de manera gráfica.

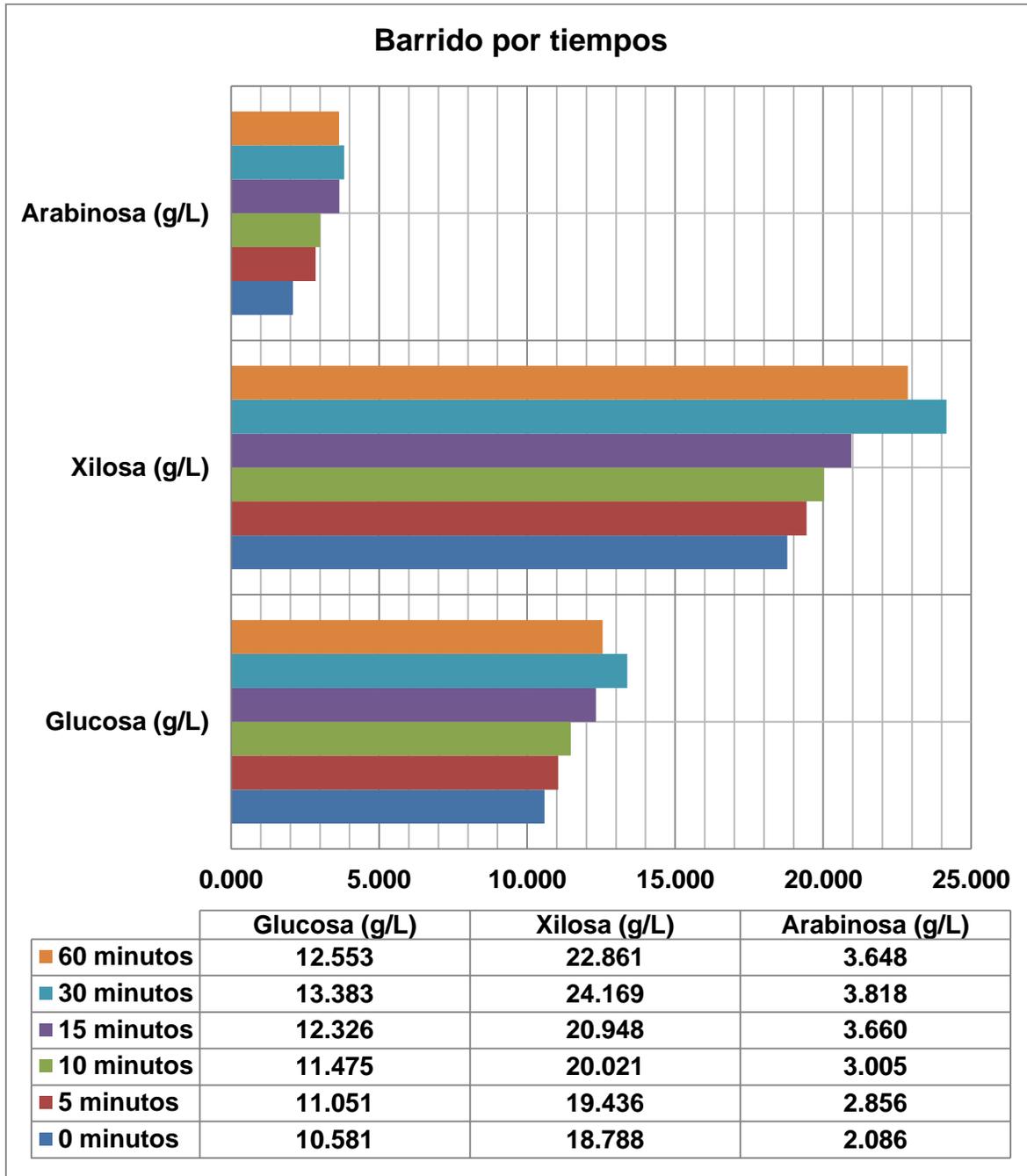


Figura 4.17 Gráfica comparativa en los resultados del barrido por tiempos.

La concentración mayor de azúcares totales es a los 30 minutos teniendo 41.370 g/L. Sin embargo a los 10 minutos tenemos una concentración total de azúcares del 34.501g/L. La ganancia de casi 7g/L que se tendrían dejando un tiempo de 30 minutos no resultaría factible en caso de escalar el proceso a un

nivel piloto, es por ello que es factible tomar un tiempo de 10 minutos porque generaría un costo-beneficio en cuestión energética.

La figura 4.18 señala las composiciones de cada uno de los azúcares lo largo de los tiempos estudiados, como era de esperarse el porcentaje de xilosa es el que se encuentra en mayor proporción dentro de todas las corridas experimentales.

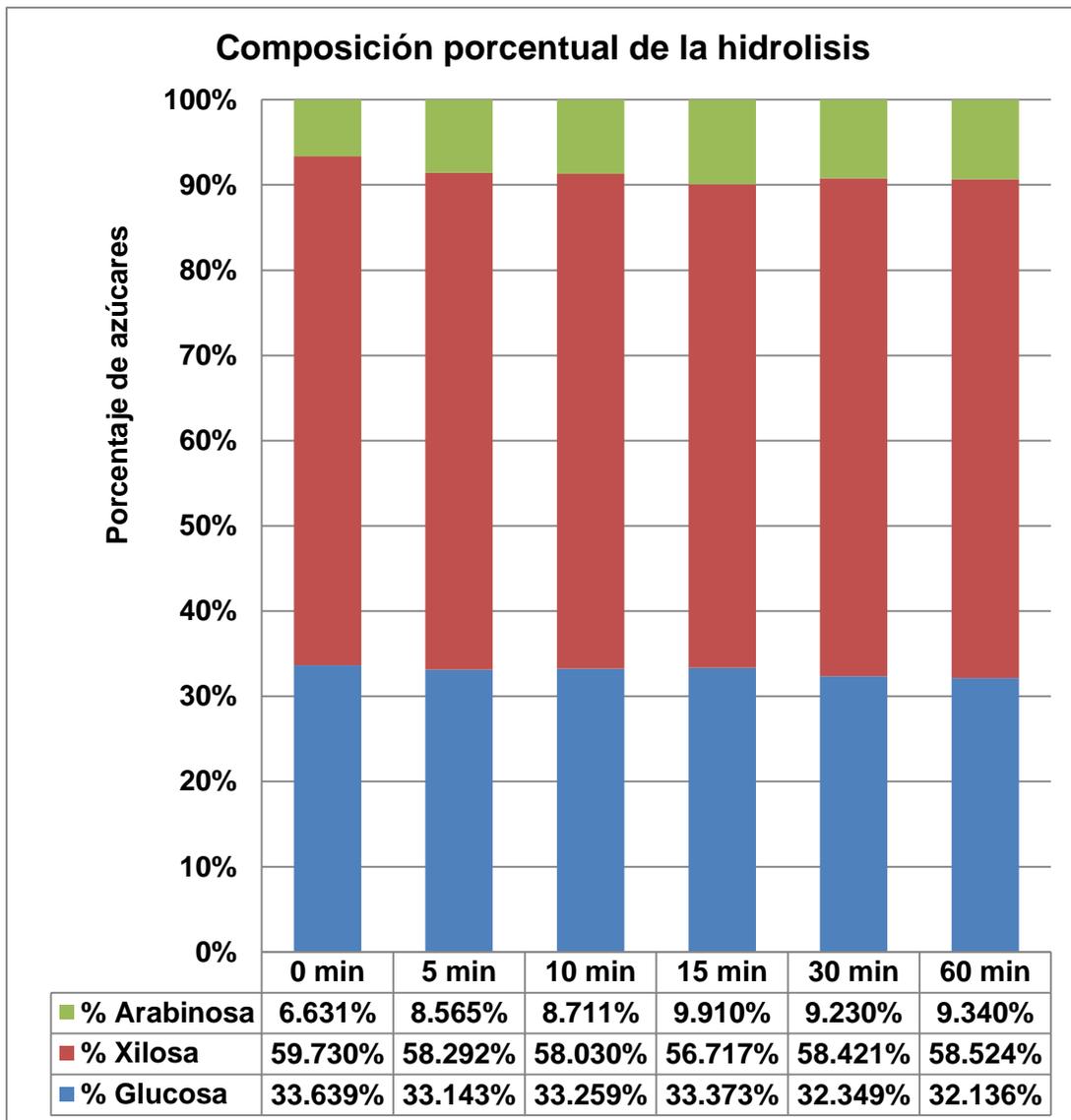


Figura 4.18 Composición porcentual de azúcares en cada tiempo.

La tabla 4.14 resume los valores promedios en cada uno de los tiempos estimados para el estudio y encierra el punto óptimo que se empleó para el siguiente barrido.

Tabla 4.14 Resultados de la hidrolisis a diferentes tiempos.

T (min)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)
0.0	10.581	18.788	2.086
5.0	11.051	19.436	2.856
10.0	11.475	20.021	3.005
15.0	12.326	20.948	3.660
30.0	13.383	24.169	3.818
60.0	12.553	22.861	3.648

Cabe mencionar que la selección puede ser muy subjetiva y sometida a discusión por los diferentes puntos de vista que se tienen respecto del aprovechamiento de los carbohidratos.

Podemos resaltar que en base a lo que se reporta se pueden tomar puntos de partida que servirán como referencia para la comparación de futuras reproducibilidades del proceso.

**4.6.2 BARRIDO: TEMPERATURA-TIEMPO CONSTANTE Y
CONCENTRACIÓN VARIABLE.**

En base al punto óptimo que se obtuvo del barrido anterior, se hizo una nueva corrida pero manteniendo constante la temperatura, la relación de sólidos, y el tiempo que fue de 10 minutos, variando la concentración de ácido sulfúrico tomando 2 puntos por encima y 2 por debajo del 2% con una dispersión de 0.5%.

La tabla 4.15 reporta los resultados que se obtuvieron en el barrido con las distintas concentraciones por triplicado.

Tabla 4.15 Resultados de la hidrólisis a diferentes concentraciones.

	Temp °C	Tiempo (min)	Relación sólido	Conc. H2SO4	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)
t1	127.0	10.0	15%	3.00%	8.5543	16.0838	2.8025
t2	127.0	10.0	15%	3.00%	8.7381	16.7072	2.8165
t3	127.0	10.0	15%	3.00%	8.6288	16.3693	2.8345
t4	127.0	10.0	15%	2.50%	9.0046	16.4603	3.0898
t5	127.0	10.0	15%	2.50%	9.3468	16.6732	2.9644
t6	127.0	10.0	15%	2.50%	8.7735	16.5827	3.0255
t7	127.0	10.0	15%	2.00%	11.8962	20.3640	2.9705
t8	127.0	10.0	15%	2.00%	11.0456	19.5096	2.9878
t9	127.0	10.0	15%	2.00%	11.4821	20.1899	3.0581
t10	127.0	10.0	15%	1.50%	9.3459	17.6569	1.8601
t11	127.0	10.0	15%	1.50%	10.0070	18.6969	2.0081
t12	127.0	10.0	15%	1.50%	9.8998	17.7315	2.0188
t13	127.0	10.0	15%	1.00%	9.3183	15.1753	1.4982
t14	127.0	10.0	15%	1.00%	9.0992	15.4804	1.5882
t15	127.0	10.0	15%	1.00%	8.6203	12.4772	1.5119

Al igual que en el estudio anterior se contó con una curva estándar de 7 puntos distintos de concentraciones con la finalidad de tener mayor confiabilidad en las lecturas del HPLC.

La tabla 4.16 señala la desviación estándar que se tuvo durante los resultados de las muestras en cada concentración.

Tabla 4.16 Desviación estándar de los resultados en cada concentración.

Conc. H2SO4	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
3.00%	0.0924	0.3120	0.0160
2.50%	0.2884	0.1069	0.0627
2.00%	0.4253	0.4515	0.0464
1.50%	0.3548	0.5801	0.0887
1.00%	0.3570	1.6529	0.8921

La figura 4.19 muestra la comparativa entre los resultados promedio obtenidos de cada concentración y los azúcares reportados de manera gráfica.

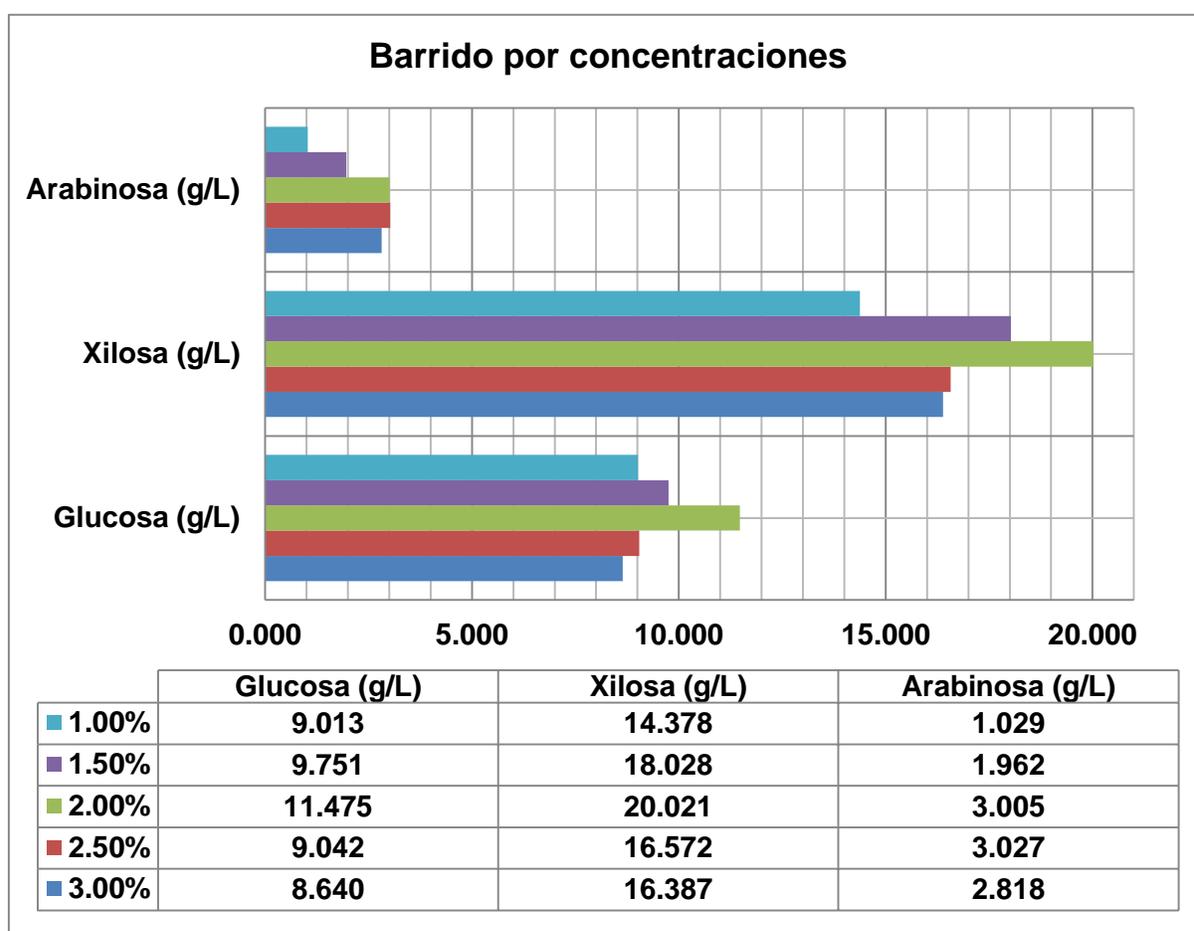


Figura 4.19 Gráfica comparativa en los resultados del barrido por concentraciones.

Al igual que en el primer barrido la concentración de ácido sulfúrico del 2% arroja el mayor aprovechamiento de azúcares totales, teniendo una concentración total de 34.501g/L, mientras que el que precede es de 29.742g/L a una concentración de 1.5% de ácido. Se debe hacer un análisis preciso del costo y el impacto ambiental que sufriría el uso de estas 2 condiciones para definir el mejor punto a tomar como óptimo. Bajo la perspectiva de lo que se analizó se tomará como la mejor condición un 2% de ácido sulfúrico y 10 minutos de tiempo a una temperatura de 127°C.

La figura 4.20 señala las composiciones de cada uno de los azúcares a cada concentración analizada.

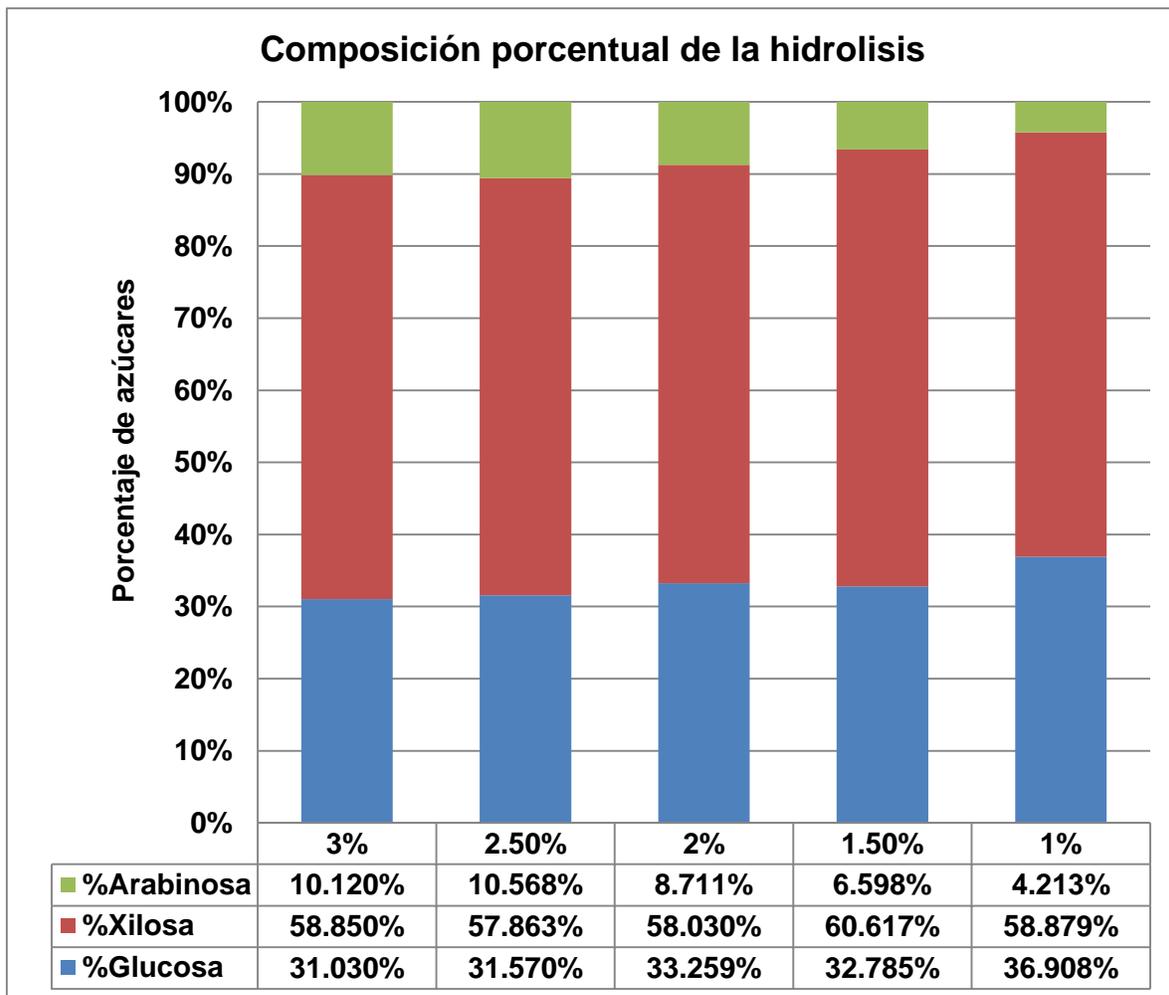


Figura 4.20 Composición porcentual en cada concentración de ácido.

La tabla 4.17 resume los valores promedios en cada uno de los resultados obtenidos dentro del barrido, señalando el punto considerado como óptimo.

Tabla 4.17 Resultados de la hidrolisis a diferentes concentraciones por triplicado.

Conc. H ₂ SO ₄	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)
3.00%	8.640	16.387	2.818
2.50%	9.042	16.572	3.027
2.00%	11.475	20.021	3.005
1.50%	9.751	18.028	1.962
1.00%	9.013	14.378	1.029

Uno de los retos fuertes que se deben mencionar fue que los tiempos de contacto deben ser lo más parecido posibles y bajo las mismas condiciones para poder ser reproducibles. La mínima variación inconsciente genera una desviación en los datos reportados. Bajo las veces que se reprodujeron estas pruebas se notó una variación por estas situaciones de hasta un 15% según las variables que intervengan. Hay que considerar todas estas situaciones al momento de reproducir las corridas.

Otro factor que influyó fue el tipo de columna y pre columna empleada, pese a que cada vez que se optaba por probar una columna diferente, la curva estándar se corría a esas nuevas condiciones y posteriormente se efectuaban las lecturas de las muestras, esto debido a que cada método tiene su margen de error y las lecturas pueden distorsionarse si no se hace una nueva evaluación previa de los patrones. Pese a estas consideraciones las diferencias entre los resultados de columna y columna llegaban a variar de un 5% a un 8%.

Con estos datos asumimos que el material lignocelulósico de la Yaca tiene potencial para la producción de biocombustibles gracias a su porcentaje de carbohidratos.

4.7 CARACTERIZACIÓN DE AZÚCARES ESTRUCTURALES DEL SÓLIDO RESIDUAL DE LAS HIDROLISIS.

Al finalizar la etapa de hidrolisis ácida resulta una cantidad considerable de sólido, la cual es retirada al finalizar este proceso. Uno de los objetivos presentes en la caracterización de este sólido es conocer la cantidad de azúcares estructurales que no queden inmersos en la fase líquida y por el contrario tienden a quedarse retenidos en esta fracción de la muestra, de esa manera se puede aprovechar el sólido sin necesidad de filtrar el hidrolizado. El rendimiento de sólidos que están presentes al final de la hidrolisis (en ambos barridos) en relación con los gramos de muestra inicial se resumen en la tabla 4.18 y 4.19.

Tabla 4.18 Rendimiento de sólidos en barrido a diferentes tiempos.

Tiempo (min)	0	5	10	15	30	60
Rendimiento de sólido	42.96%	48.09%	48.58%	46.06%	46.08%	47.93%

Tabla 4.19 Rendimiento de sólidos en barrido a diferentes concentraciones.

Concentración de ácido	3.00%	2.50%	2%	1.50%	1.00%
Rendimiento de sólido	51.91%	52.01%	48.58%	52.14%	51.41%

Al analizar los datos obtenidos se puede observar que la mayor cantidad de sólidos presentes al finalizar las hidrolisis se encuentran en el barrido a diferentes concentraciones de ácido. El resultado de estos datos está en relación directa con su aprovechamiento en base a la cantidad de azúcares presentes en la hidrolisis ácida.

4.7.1 CARACTERIZACIÓN DEL SÓLIDO DEL BARRIDO A DIFERENTES TIEMPOS.

A continuación se presentan los resultados respecto del porcentaje de glucanos y xilanos obtenidos en el sólido de cada una de los experimentos presentes en la corrida a diferentes tiempos de hidrolisis.

La metodología empleada para la determinación de los azúcares estructurales es la misma que marca el protocolo de la NREL, empleando las mismas ecuaciones y el mismo método de cromatografía.

$$\%Glu = (((((C * 87 * 162)/1000)/180)/0.3))x100$$

$$\%Xil = (((((C * 87 * 132)/1000)/150)/0.3))x100$$

La tabla 4.20 resume los datos obtenidos de la cantidad de azúcares estructurales en cada una de las pruebas respecto de su tiempo.

Tabla 4.20 Porcentaje de azúcares respecto de los tiempos.

Muestra	Tiempo	%Glucanos	%Xilanos
h1	0	19.67%	8.45%
h2	0	20.61%	8.76%
h3	0	17.36%	8.36%
h4	5	19.34%	3.13%
h5	5	21.97%	6.96%
h6	5	21.11%	6.42%
h7	10	22.64%	3.43%
h8	10	24.46%	3.26%
h9	10	23.69%	3.59%
h10	15	25.55%	3.29%
h11	15	25.96%	3.49%
h12	15	30.11%	4.11%
h13	30	28.01%	2.50%

h14	30	29.60%	3.92%
h15	30	25.76%	3.05%
h16	60	33.36%	3.73%
h17	60	23.81%	2.17%
h18	60	30.91%	3.24%

La figura 4.21 describe el comportamiento grafico de los porcentajes de glucanos y xilanos presentes en la estructura de este residuo.

Anexo a la gráfica está una tabla con los datos promedio de cada uno de los porcentajes de azúcares en los tiempos de estudio.

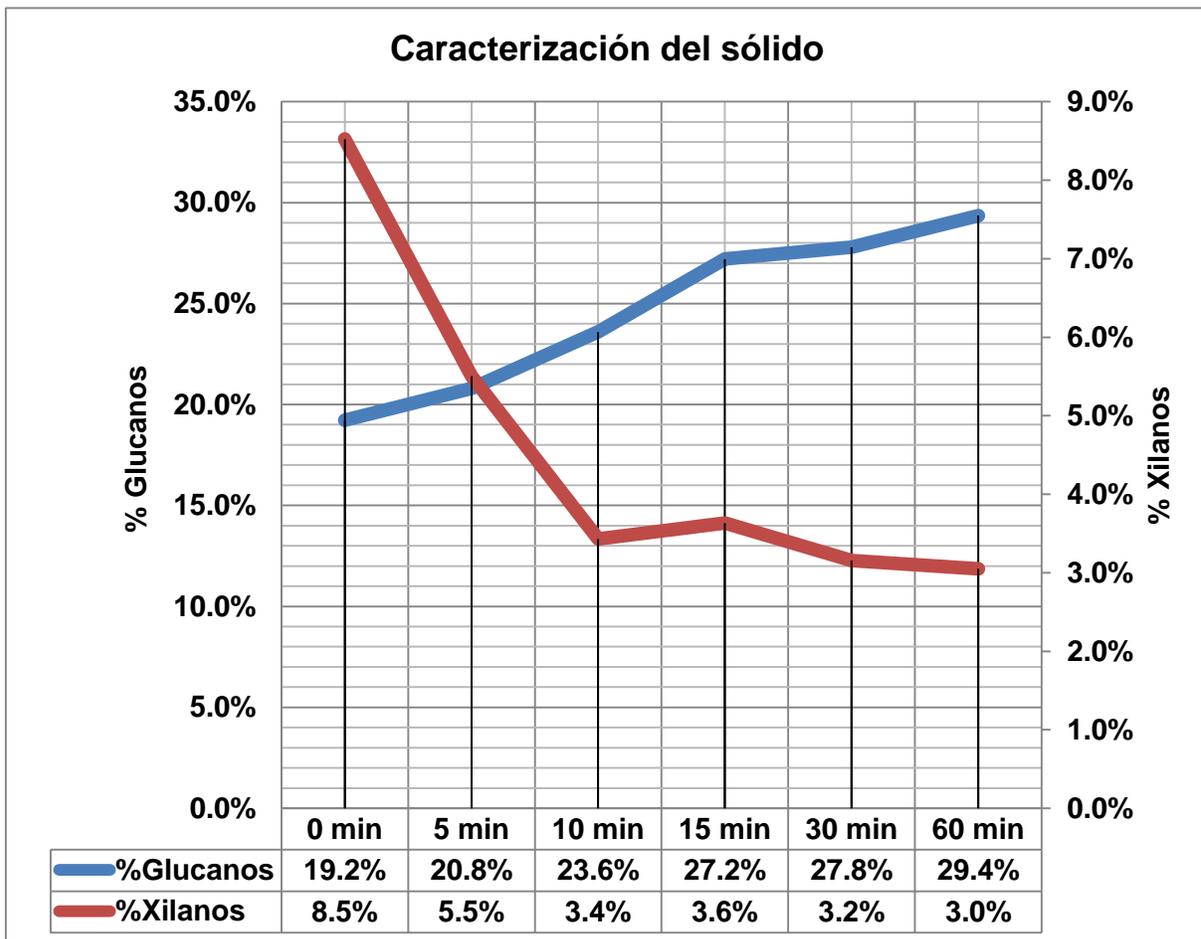


Figura 4.21 Gráfica de los porcentajes promedios del glucanos y xilanos en el sólido residual de cada tiempo.

4.7.2 CARACTERIZACIÓN DEL SÓLIDO DEL BARRIDO A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

Al igual que en los resultados anteriores, a continuación se resumen los resultados de la caracterización del porcentaje de sólidos en la estructura de cada uno de los sólidos sobrantes. El método de cálculo de rige por las mismas ecuaciones.

$$\%Glu = (((((C * 87 * 162)/1000)/180)/0.3))x100$$

$$\%Xil = (((((C * 87 * 132)/1000)/150)/0.3))x100$$

El resume los resultados obtenidos se encuentra en la siguiente tabla mostrando el porcentaje de azúcares estructurales en cada una de las pruebas respecto a cada concentración.

Tabla 4.21 Porcentaje de azúcares respecto de cada concentración.

Muestra	Concentración de ácido	%Glucanos	%Xilanos
t1	3.0%	12.01%	6.21%
t2	3.0%	13.66%	5.97%
t3	3.0%	15.21%	6.12%
t4	2.5%	17.23%	3.41%
t5	2.5%	16.74%	4.07%
t6	2.5%	18.73%	3.92%
t7	2.0%	22.64%	3.43%
t8	2.0%	24.46%	3.26%
t9	2.0%	23.69%	3.59%
t10	1.5%	22.64%	3.71%
t11	1.5%	21.69%	3.99%
t12	1.5%	22.33%	3.87%
t13	1.0%	28.10%	4.02%
t14	1.0%	28.51%	3.49%
t15	1.0%	25.70%	4.46%

En la figura 4.22 se muestra el comportamiento de cada una de las distintas concentraciones en relación con su cantidad de glucanos y xilanos presentes.

Anexo a la gráfica se muestra también la tabla con los cálculos promedio de cada uno de los porcentajes de azúcares en las concentraciones de estudio.

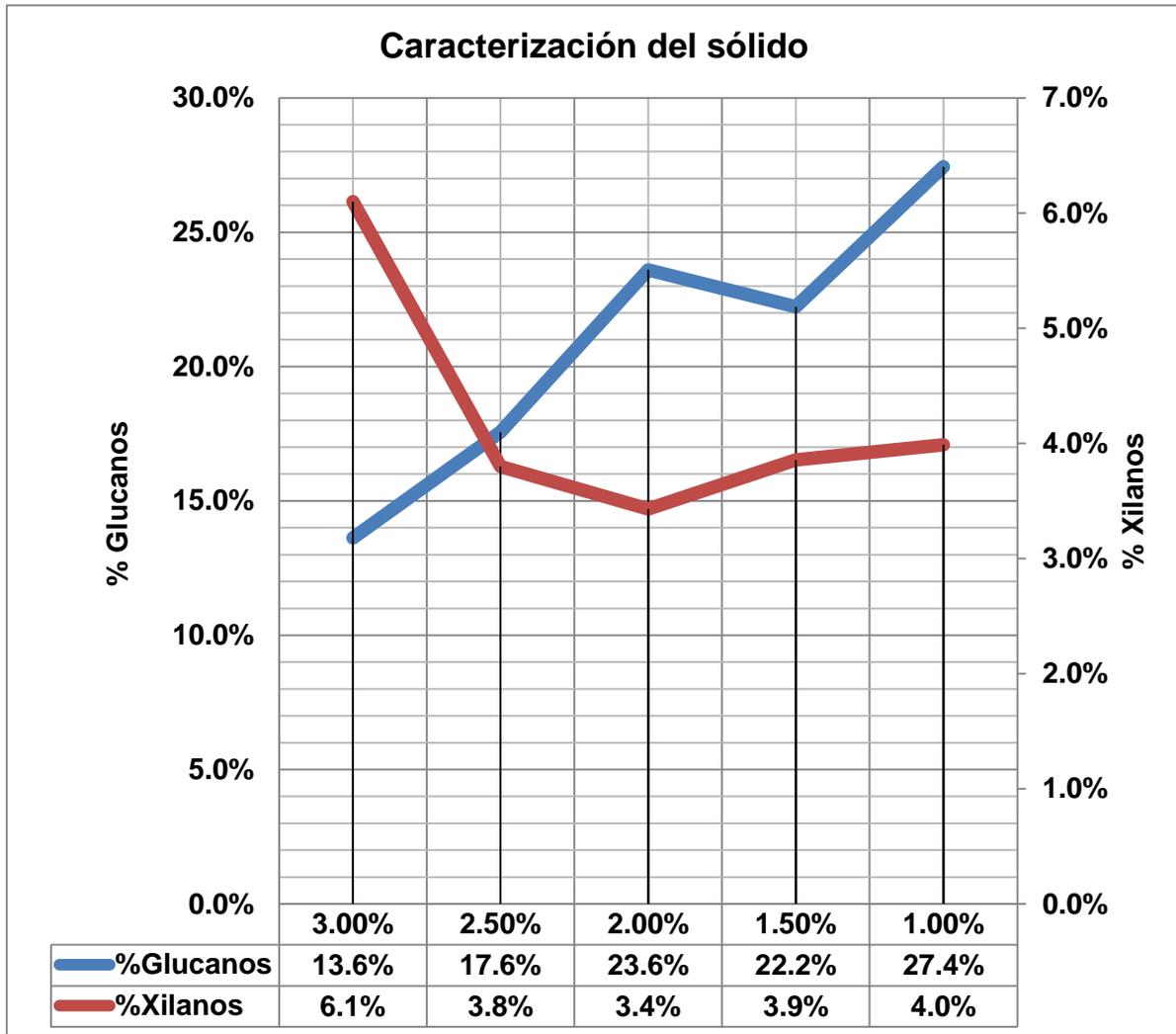


Figura 4.22 Gráfica de los porcentajes promedios del glucanos y xilanos en el sólido residual de cada concentración de ácido.

4.8 FERMENTACIÓN.

Uno de los puntos importantes dentro de esta investigación es la conversión de los azúcares del jugo a Bioetanol mediante fermentación asistida por una levadura, la *Saccharomyces cerevisia*. El proceso se realizó mediante una torre de control que contaba de 6 fuente de lectura mediante electrodos conectados a flekers que fungieron la operación de un bioreactor con agitación asistida por uno tipo cruz magnetico, este equipo fue prestado por el Instituto de biotecnología de la UNAM campus Cuernavaca. Todo el material se esterilizó previamente a 121°C por un tiempo de 25 a 30 minutos. Cada fleker tenía en su tapa un orificio para muestrear y otro para evitar la acumulación de bióxido de carbono dentro del reactor. El baño se atemperó a 30°C de manera constante.

Dentro del proceso se cuidaron parámetros como son el pH mediante la adición de una base, agitación sin una presencia de vórtice para evitar la aireación y la temperatura del baño para evitar la inhibición o destrucción del microorganismo.

4.8.1 CINETICAS DE CRECIMIENTO

Fue necesario conocer el comportamiento de la levadura *Saccharomyces cerevisia*, para esto se realizaron varias corridas de crecimiento y así tomar un punto con las condiciones adecuadas para la inoculación en los jugos.

La tabla 4.22 muestra los resultados de uno de los estudios realizados, se hizo por duplicado partiendo de 2 densidades ópticas distintas, uno de 0.4 y otra de 0.6 durante un periodo de 48 horas. Se empleó medio líquido para su desarrollo.

Tabla 4.22 Crecimiento de la levadura.

Horas	C (0.6 DO)	D (0.6 DO)	E (0.4 DO)	F (0.4 DO)
0	0.341	0.319	0.215	0.203

2	0.597	0.604	0.332	0.392
4	0.782	0.784	0.454	0.532
6	1.182	1.188	0.795	0.804
8	1.42	1.31	0.895	0.95
10	1.94	1.86	1.08	1.3
12	1.96	1.93	1.13	1.39
18	2.92	2.88	2.62	2.58
24	4.12	4.03	4.01	3.96
30	5.6	5.56	5.16	5.76
36	5.36	5.52	7.14	6.92
42	5.2	4.16	4.69	5.04
48	5.04	3.68	3.68	4.24

Como se muestra en la figura 4.23, la mayor concentración alcanzada en el desarrollo de la levadura antes de pasar a la fase estacionaria fue a las 7 horas para una concentración inicial 0.4 densidades ópticas y de aproximadamente 5.5 horas partiendo de 0.6 densidades ópticas.

Posterior a estos tiempos se nota el descenso que sufre este microorganismo debido a la naturaleza de su proceso. Si a un tiempo establecido no se aprovecha la levadura, éste muere y el rendimiento de conversión de azúcares a etanol se ve afectado.

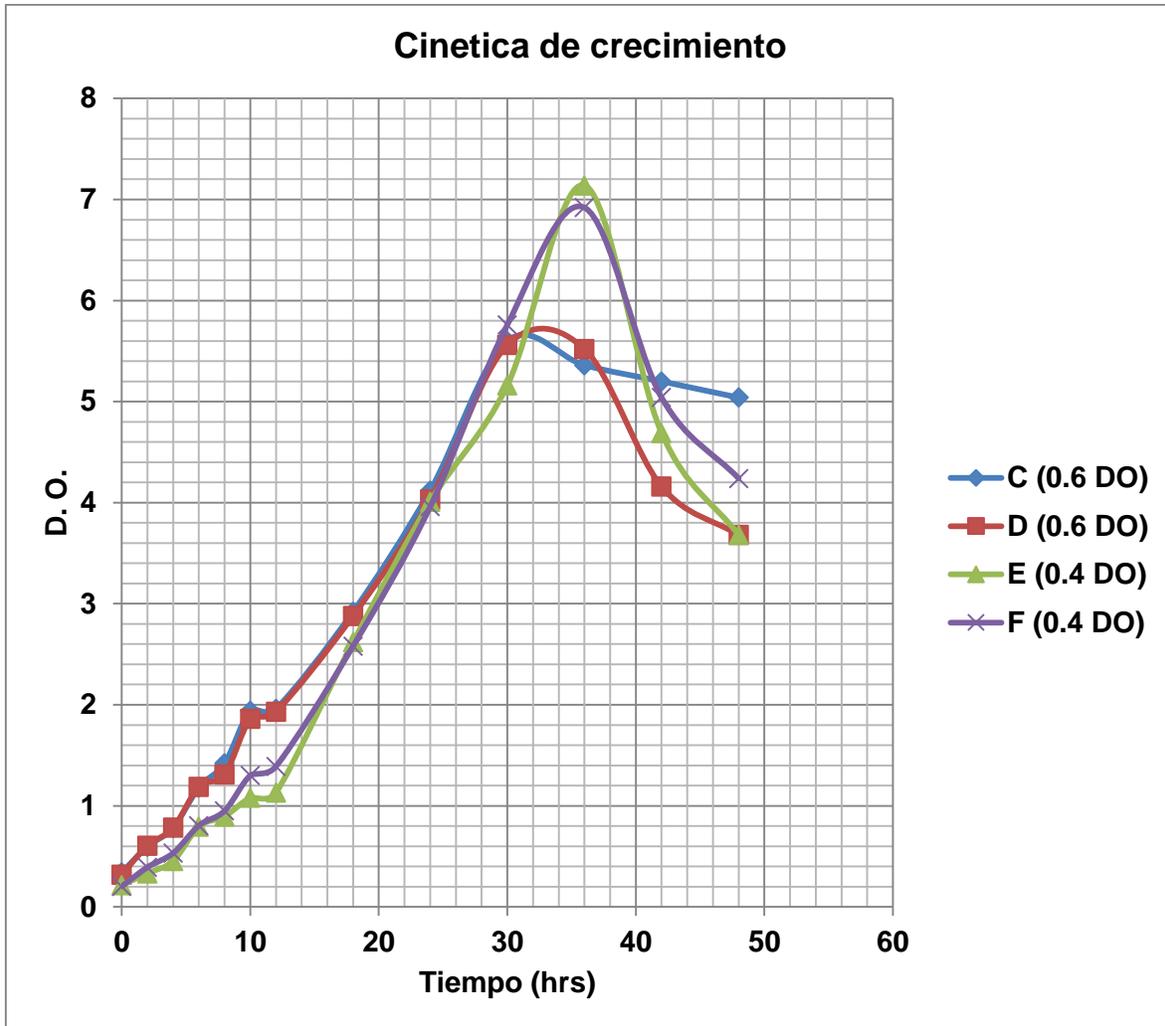


Figura 4.23 Comportamiento gráfico de la *Saccharomyces cerevisia*.

4.8.2 FERMENTACIÓN DE LOS JUGOS.

A continuación se muestra el resultado de 3 fermentaciones, las 2 últimas se corrieron a la par, mientras que la primera se llevó a cabo a condiciones diferentes que sirvieron para modificar el equipo de fermentación y así mejorar la conversión de los azúcares. Los jugos fueron esterilizados a 121°C, en donde se mostró la desnaturalización de proteína dentro del jugo al precipitar cierta cantidad de sólidos identificados en el fondo del frasco. Esto tiene 2 explicaciones, una es que el jugo contenga proteína o la otra es que alguna semilla estaba aún dentro de

la pulpa al momento de realizar la extracción del jugo. Debido a esto fue necesario centrifugar los jugos estériles bajo condiciones controladas para evitar una posible contaminación.

La grafica de la figura 4.24 muestra el comportamiento de la primera fermentación, llamada A. Se puede notar que, aunque la cantidad de azúcares iniciales es alta, la cantidad de etanol es muy baja.

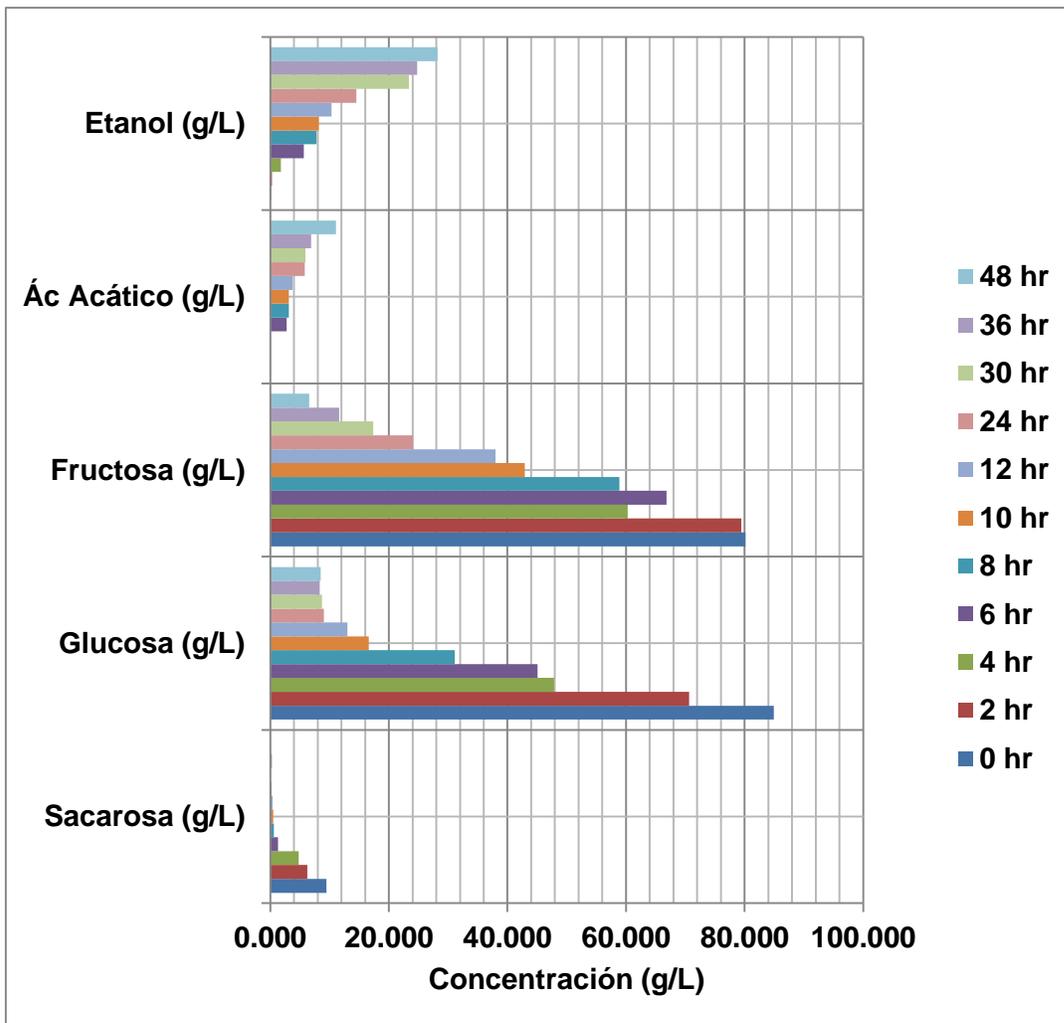


Figura 4.24 Fermentación A.

Cabe resaltar que esta corrida se realizó en el equipo de fermentación tomando las medidas necesarias, sin embargo una de las fallas identificadas fue un vórtice muy pronunciado que cambió la ruta metabólica del microorganismo ya

que pasó de un sistema aerobio a uno anaerobio, favoreciendo la producción de ácido acético o la concentración de etanol producida, y que debido a la turbulencia del flujo de agua dentro del baño los flekers tendían a moverse porque el peso de la solución no era suficiente para mantenerlos inmóviles, y por ende la agitación se detenía. Otro punto más observado es que la levadura ocupó azúcares del jugo para continuar su crecimiento, por lo cual el rendimiento también fue afectado.

En base a estos resultados mostrados en la tabla 4.23 se hicieron correcciones al diseño de la plancha de agitación para evitar un sistema con aireación disminuyendo la velocidad de agitación. Para el caso del movimiento de los flekers se propuso un arreglo tipo gato para mantener fijos los bioreactores y así garantizar la agitación constante del proceso.

Tabla 4.23 Concentraciones de fermentación A.

Tiempo	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Ác. Acético (g/L)	Etanol (g/L)
0 hr	9.475	84.913	80.163	0.043	0.152
2 hr	6.223	70.618	79.440	0.074	0.290
4 hr	4.788	47.876	60.280	0.081	1.784
6 hr	1.292	45.049	66.845	2.730	5.634
8 hr	0.610	31.129	58.904	3.136	7.822
10 hr	0.523	16.586	42.906	3.158	8.165
12 hr	0.392	13.001	37.966	3.772	10.318
24 hr	0.207	9.062	24.058	5.808	14.507
30 hr	0.070	8.736	17.373	5.939	23.395
36 hr	0.261	8.350	11.609	6.915	24.766
48 hr	0.036	8.507	6.582	11.099	28.236

En este caso el rendimiento que se tuvo de la conversión del total de azúcares iniciales a etanol fue de 17.711% y de 6.962% para la producción del ácido acético.

Con los arreglos elaborados descritos en el experimento anterior, la tabla 4.24 resumen los resultados de dicha fermentación, donde se observa una mejoría significativa en la producción del Bioetanol.

Tabla 4.24 Concentraciones de fermentación B.

	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Ác. Acético (g/L)	Etanol (g/L)
t1	15.587	63.670	54.214	0.679	1.388
t2	5.292	60.837	59.662	1.542	7.103
t3	4.754	62.421	69.374	3.016	13.389
t4	4.439	49.433	65.503	5.156	21.209
t5	4.439	35.676	56.298	6.984	27.393
t6	4.439	9.156	18.127	15.708	59.722
t7	4.439	5.984	1.663	11.206	59.850

La figura 4.25 señala el comportamiento grafico del consumo de azúcares y la producción del alcohol. Se observa una concentración de 59.850 g/L para el caso de etanol. En este caso el rendimiento que se tuvo de la conversión del total de azúcares iniciales al Bioetanol fue de 49.306% y de 8.396% para la producción del ácido acético.

Cabe mencionar que la producción se alcanzó rápido gracias a que la levadura estaba completamente activa y el tiempo de crecimiento fue el adecuado, por lo tanto sólo ocupó un poco cantidad de azúcares para seguir creciendo en los jugos y posteriormente la producción de nuestro producto principal.

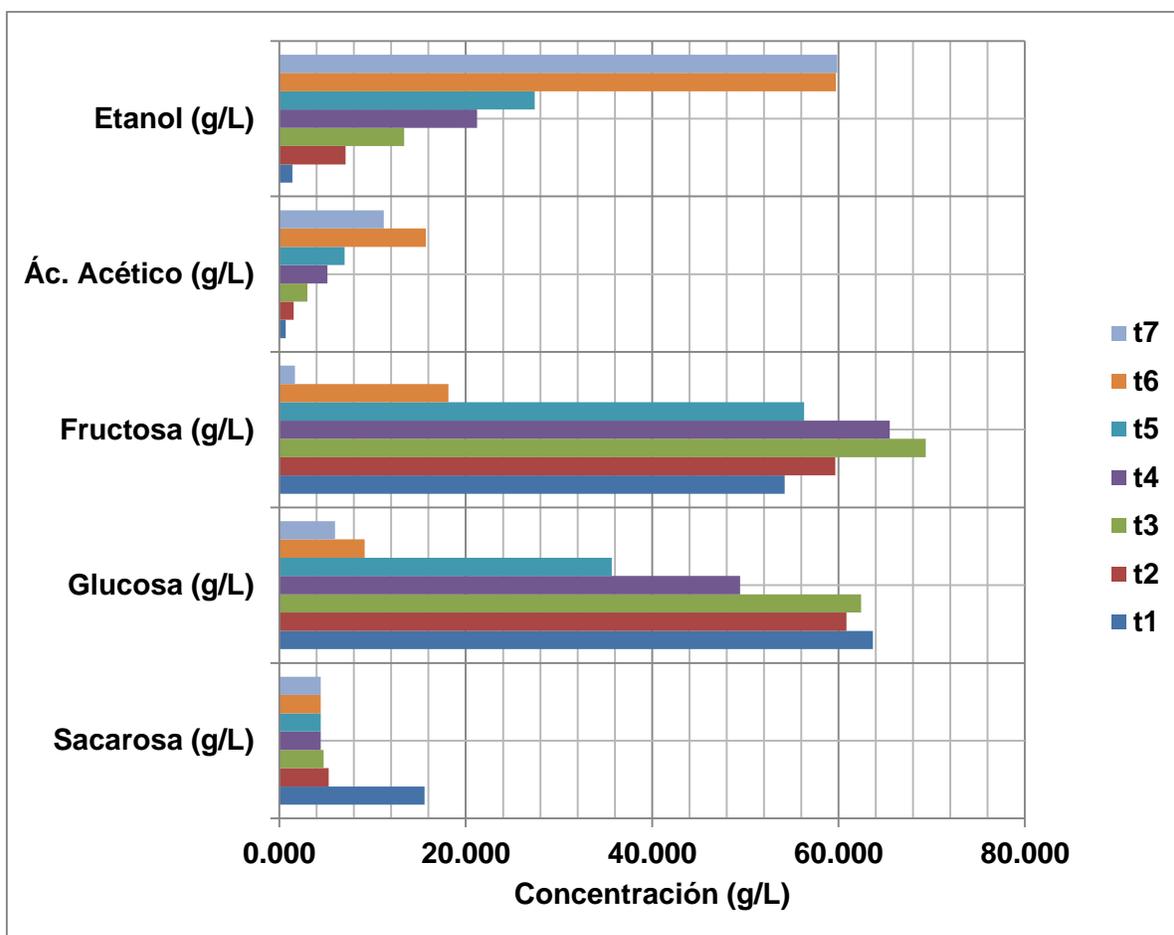


Figura 4.25 Fermentación B.

Por último la Fermentación C se muestra en la tabla 4.25, donde se alcanzó una producción de 80.434 g/L de etanol.

Tabla 4.25 Concentraciones de fermentación C.

	Sacarosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Ác. Acético (g/L)	Etanol (g/L)
t1	52.584	62.191	56.597	0.679	3.570
t2	11.574	56.465	58.032	0.679	7.115
t3	16.856	39.119	47.379	1.349	12.494
t4	6.473	34.135	52.096	5.190	22.020
t5	5.400	25.864	52.882	8.207	33.949

t6	4.439	7.517	1.540	18.347	79.799
t7	4.439	6.951	1.950	17.700	80.434

La figura 4.26 muestra gráficamente el consumo de fructosa, glucosa y sacarosa, así como la producción del alcohol. De las 3 corridas realizadas, en esta es donde el rendimiento que se tuvo de la conversión del total de azúcares iniciales a etanol fue de 50.897% y de 10.328% para la producción del ácido acético, siendo la de mayor aprovechamiento.

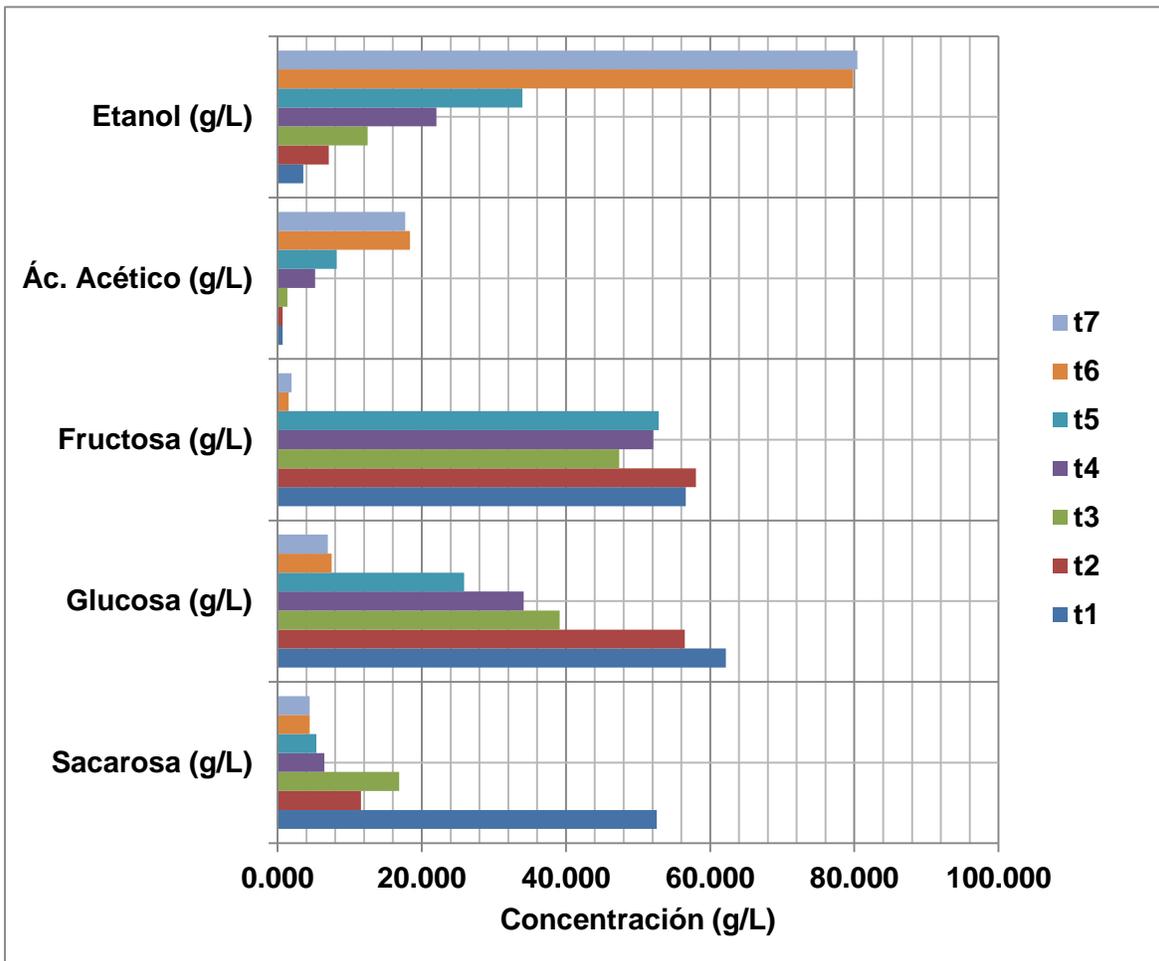


Figura 4.26 Fermentación C.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIÓN DEL TRABAJO PRESENTE.

En este trabajo se estudió la factibilidad del residuo lignocelulósico de la Yaca como sustrato para la producción de Bioetanol mediante la caracterización de cada uno de sus componentes. A primera instancia los resultados obtenidos arrojan datos bastante favorables para el aprovechamiento en biocombustibles de segunda generación, sin embargo es necesario hacer más estudios exploratorios que arrojen un margen mayor de resultados y tomar el modelo correcto para realizar la escala a nivel piloto.

Del balance másico podemos resaltar el hecho de que según corresponda la temporada y la variedad de la Yaca es el porcentaje de fruta que tendrá, siendo el rango de entre 25%-32%. Y el resto actualmente es destinado como desecho, en base a estos análisis podemos justificar que, aunque el mayor valor se encuentra en la pulpa podemos aprovechar este 68%-75% restante del balance.

Cada componente de la Yaca tiene propiedades diferentes que hacen un aporte significativo dentro del proceso. Particularmente los materiales que se encuentran directamente en contacto con la pulpa son los que tienen una cantidad de azúcares considerable. La cáscara por su parte, presenta un alto contenido de Lignina insolubles siendo del 31.21% por encima de materiales provenientes de residuos forestales. El corazón de la Yaca tiene una resina que actualmente se encuentra en estudio en el centro de investigación de la Universidad de Tepic, este material se presenta en la unión de los pétalos con el corazón.

La metodología de la NREL es un proceso utilizado para generar resultados del material de estudio y definir los mejores procesos consiguientes a realizar, sin

embargo metodologías como la ASTM D 1103-60 son también ampliamente utilizadas.

Todas las pruebas que aquí se mostraron fueron corroboradas varias veces debido a múltiples imprevistos que se tuvieron con el equipo de HPLC, además de que se probaron métodos diferentes, así como distintas columnas y pre-columnas para los estudio, con la finalidad de estandarizar una metodología para estas técnicas.

Cada una de las pruebas efectuadas en el barrido experimental del material lignocelulósico muestra resultados destacados para proseguir con una hidrolisis enzimática, una fermentación con algún otro microorganismo y la destilación.

Se determinó como punto óptimo una relación de sólidos del 15% w/w, ácido sulfúrico al 2% w/w, un tiempo de exposición en la autoclave de 10 minutos y una temperatura de 127°C. Los resultados muestran un contenido de azúcares en el sólido suficiente como para incorporarlo al proceso de hidrolizado evitando las etapas del lavado y la separación del sólido, con esto se buscaría aprovechar más este material.

Cada uno de los resultados puede ser subjetivo a quien consulte estos resultados, el análisis bajo el cual se decidió por estos puntos como los mejores fue por la diferencia de tiempos y a su vez el consumo energético y la diferencia de gramos sobre litro de solución obtenidos.

Los jugos de Yaca presentan altos contenidos de azúcares siendo los 3 primeros fructosa, glucosa y sacarosa. Posterior a la esterilización que se realizó, la cantidad de sacarosa disminuye, esto debido a que el disacárido a condiciones arriba de 70°C aproximadamente tiende a desdoblarse, disminuyendo el porcentaje presente en los jugos. Sin embargo y como se comentó en los resultados, después de someter los jugos a un tratamientos térmico a esas condiciones también se notó la precipitación de un sólido el cual fue consecuencia de la desnaturalización de las proteínas que ahí se muestran. Pese a las 3

pruebas realizadas los mejores resultados obtenidos fueron en la última experimentación obteniendo un rendimiento del 50.897% de los azúcares totales previos a la fermentación, este resultado fue debido a que se mejoró el proceso para aumentar el rendimiento. En la primer prueba el hecho de tener presencia de un vórtice mostró una producción considerable del ácido acético, siendo del 6.962% y 17.711% de Bioetanol, otro factor dentro del comportamiento de estos resultados fue que el microorganismo siguió creciendo a partir de los azúcares del jugo, bajando completamente el rendimiento.

El control de los microorganismos presenta un margen de discrepancia para evitar que, al momento de ser inoculados su ruta vaya directamente a la producción del alcohol y no un porcentaje a su crecimiento.

5.2 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN POSTERIOR.

El estudio que aquí se mostró está en base a sistema de caracterización que marca la NREL, sin embargo diversas metodologías encontradas en bibliografías describen otros procedimientos que se basan en cuantificaciones de peso para la determinación de celulosa, hemicelulosa y lignina, esta situación muestra un panorama para comparar los resultados que se pueden obtener en ambos procedimientos.

Otro punto importante son los pretratamientos, una hidrólisis ácida arroja los resultados que se mostraron anteriormente, sin embargo un punto importante es el análisis de otros tratamientos químicos en los que esté implicado un procedimiento alcalino para comparar el comportamiento de esto. Como se mostró en las caracterización de los componentes, la cáscara tiene el mayor contenido de lignina insoluble y fue parte de la mezcla compuesta con la que se realizó el estudio, cabe mencionar que otro estudio posterior sería corriendo nuevamente este diseño pero sin integrar este componente.

Un punto primordial es la fermentación del material lignocelulósico, se recomienda que a partir de los datos aquí obtenidos se proceda con el estudio de la producción e Bioetanol.

Uno de las propuestas es explorar el análisis de los rendimientos en base a diferentes microorganismos, hoy en día se tiene conocimiento de que diferentes institutos realizan modificaciones genéticas para acondicionarlas a cierto ambiente para generar algún producto deseado.

La Yaca es una fruta muy poco conocida de la cual, se tienen cuestionamientos en base a sus características, de gran ayuda sería los estudios bromatológicos de cada componente, en especial en la etapa fermentativa de los jugos extraídos de la pulpa.

Esta situación tiene un gran énfasis debido a que, dentro de la información recabada la Yaca es empleada también en la medicina alternativa y es necesarios conocer a detalle cada una de sus propiedades, así como evaluar si ocurre algún cambio en el momento de efectuar una fermentación, en caso de no presentarse variación alguna y conservarse es de alto impacto para el consumo humano con fines benéficos para la salud.

Por último y en base a todas las etapas del proceso la destilación es la culminación al proyecto posterior a esta investigación. Actualmente se ha estado investigando mejoras en este proceso, así como optimizar la producción de un alcohol anhidro. La Yaca es un nuevo reto a superar para un proceso de destilación bajo las características particulares que contiene esta fruta.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] García Bustamante C.A., Masera Cerutti O., Estado del arte de la bioenergía en México (2016).
- [2] Sheehan, J. & M. Himmel (1999) Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the US Department of Energy's research and development Activities for bioethanol. Biotechnology Progress.
- [2] F.O. Licht, cited in Renewable Fuels Association, Ethanol Industry Outlook 2008-2013 reports. Available at www.ethanolrfa.org/pages/annual-industry-outlook
- [3] Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2007). Preguntas y respuestas más frecuentes sobre biocombustibles. San José, Costa Rica.
- [4] Datos estadísticos de agave tequilana a nivel nacional. SAGARPA.
- [5] Méndez Romero T. (2015) Evaluación del potencial productivo del agave tequilana como materia prima en la producción de etanol combustible.
- [6] C. A. Cardona, Ó. J. Sánchez, L. F. Gutiérrez, "Process synthesis for fuel ethanol production"
- [7] Dufey A. (2011). Estudio Regional sobre economía de los biocombustibles 2010: Temas clave para los países de América Latina y el Caribe. Santiago de Chile.
- [8] Álvarez, M. C. (2009) Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional.

[9] Castro Montoya A. J., 1ra Reunión Red Temática de Bioenergía, X Reunión Nacional REMBIO Bioetanol, Estado del Arte (2014).

[10] U.B. Jagtap, V.A. Bapat. Artocarpus. A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. (2010).

[11] A.C. Kumoro, D.R. Sari, A.P.P. Pinandita. Preparation of Wine from Jackfruit (Artocarpus heterophyllus lam) Juice Using Baker yeast: Effect of Yeast and Initial Sugar Concentrations(2012).

[12] José L. Montañez, Juan C. Victoria, Rebeca Flores y María Á. Vivar Fermentation of Agave tequilana Weber Azul fructans by Zymomonas mobilis and Sacchamomyces cerevisiae in the production of bioethanol.

[13] S. B. Swami, N.J. Thakor, P.M. Haldankar, S.B. Kalse Jackfruit and Its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review; (2012)

[14] Laser M., Schulman D., Allen SG., Lichwa J., A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol; (2002); Bioresource Technology.

[15] José Alejandro Martínez Sepúlveda, Nancy Johana Montoya Gómez. Preliminary analysis of the feasibility to obtain bioethanol from the organic fraction of municipal solid waste. (2013)

[16] Michael Fernando Rondón, Juan Miguel Mantilla González, Alejandro Muñoz Rodríguez. Solubility analysis of gasoline-ethanol-water mixtures at different pressures and temperatures. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia (2014)

[17] Iñiguez, G., R. Díaz, R. Sanjuan, J. Anzaldo y R. Rowell. Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of Agave tequilana Weber azul leaves. *Bio-resource Technology*, (2001).

[18] Farías Sánchez J.C. (2014), Evaluación y optimización de pretratamientos para obtención de bioetanol a partir de aserrín de pino.

[19] Velázquez Valadez U. "Producción de etanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos de Agave Tequilana"

[20] Winter, J., M. Loret y J. Uribelarrea, Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* (1989).

[21] Alfenore, S., L. Benbadis, C. Bideux y G. Goma. Improving ethanol production and viability of *Sacharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed batch process. *Appl Microbial Biotechnol.* (2002).

[22] Delgado C., Saucedo Luna J., Salcedo Estrada L. I., Castro Montoya A.J. Manual de Operaciones de planta piloto para la producción de Bioetanol

[23] LINDE M., GALBE, M., ZACCHI, G. (2007). Simultaneous saccharification and Fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast. *Enzyme Microb Technol.*

[24] Talebnia F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol*

[25] Ward, O.P. *Biotecnología de la fermentación*. Acribia, S.A. Zaragoza, 1991.

[26] Gupta, Ram B. y col., *Gasoline, Diesel and Ethanol Biofuels from grasses and plants*, Cambridge University Press. First Edition, New York, 2010.

[27] Madigan, Michael T. y col., Biología de los microorganismos, Prentice Hall, Décima edición, 2003.

[28] Sánchez O., Cardona C., “Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas.”(2005).

[29] Mendoza Rojas C., Enciso López B., Estandarización de parámetros de operación para obtener bioetanol anhidro por destilación extractiva

[30] Uyazan, A. M., Gil. I.U.D., Aguler, J. L, Rodríguez, G. Calcedo, L. A., “Producción de alcohol carburante por destilación extractiva: simulación de proceso con glicerol”, Publicación en revista Ingeniería e Investigación Universidad Nacional de Colombia (2006).

[31] Al-Amer, A. M., Investigating polymeric entrainers for azeotropic distillation of the ethanol/water and MTBE/methanol Systems. En: Industrial & Engineering Chemistry Research, Vol. 39. (2000)

[32] Winter, J., M. Loret y J. Uribelarrea, Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* . Curr. Microbiol., (1989).

[33] Alfenore, S., L. Benbadis, C. Bideux y G. Goma. Improving ethanol production and viability of *Sacharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed batch processs. Appl Microbial Biotechnol. (2002).

[38] Sheehan, J. & M. Himmel (1999) Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the US Department of Energy's research and development activities for bioethanol. Biotechnology Progress.

[35] F.O. Licht, cited in Renewable Fuels Association, Ethanol Industry Outlook 2008-2013 reports. Available at www.ethanolrfa.org/pages/annual-industry-outlook

[36] Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2007). Preguntas y respuestas más frecuentes sobre biocombustibles. San José, Costa Rica.

[37] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass (2012).