

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE
SÚPER SORGO**

Tesis que presenta:
I.Q. Francisco Javier Rodríguez Jaime

Para Obtener el Grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Asesor de Tesis:
Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Co-asesor:
Dra. Ana Alejandra Vargas Tah

MORELIA, MICH.

DICIEMBRE 2018

RESUMEN

Francisco Javier Rodríguez Jaime, Agosto 2018

Dirigida por: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Entidad: Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química

La demanda creciente de energía y el agotamiento de los combustibles fósiles, sitúan a los biocombustibles líquidos como una alternativa energética renovable, en el marco de la creciente valoración de combustibles que tengan bajo impacto en la emisión de carbono, siendo etanol el combustible más importante ya que se puede usar como aditivo de la gasolina o incluso como combustible puro, en máquinas de combustión interna.

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor*), está ganando actualmente la atención mundial, para emplearse como una materia prima para la producción de biocombustibles líquidos, como el etanol. El súper sorgo es una variedad de sorgo dulce con un tallo rico en azúcares fermentables (16-23% Brix), por lo que se puede comparar con otras materias primas, como lo es la caña de azúcar. Estas variedades azucaradas de sorgo, responde a diferentes condiciones climáticas, no discrimina tipos de suelo, amplia área susceptible de cultivo y alta productividad de azúcar y etanol.

El material lignocelulósico y los jugos del súper sorgo nos permite obtener buenos rendimientos para la obtención de biocombustibles líquidos, lo cual lo hace una materia prima redituable en los campos mexicanos. Cabe mencionar que el uso del maíz no resulta factible debido a las restricciones sociales y legales del País, al igual el uso de la caña de azúcar está limitado por sus precios altos.

Palabras clave: Súper sorgo, pretratamiento, hidrólisis, lignocelulósico, bioetanol.

ABSTRACT

Francisco Javier Rodríguez Jaime, February 2018

Directed by: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Entity: Postgraduate of the Faculty of Chemical Engineering

The growing demand for energy and the depletion of fossil fuels, such as liquid biofuels as a renewable energy alternative, within the framework of the growing assessment of fuels that have the impact of carbon emissions, with ethanol being the most important fuel and which can be used as a gasoline additive or even as a pure fuel, in internal combustion engines.

Sorghum sweet (*Sorghum bicolor*), is currently gaining worldwide attention, to be used as a raw material for the production of liquid biofuels, such as ethanol. Super sorghum is a variety of sweet sorghum with a stem rich in fermentable sugars (16-23% Brix), so it can be compared with other raw materials, such as sugarcane. These sweet sorghum varieties, responds to different climatic conditions, does not discriminate soil types, wide area susceptible to cultivation and high productivity of sugar and ethanol.

The lignocellulosic material and the juices of the super sorghum allow us to obtain good yields for obtaining liquid biofuels, which makes it a profitable raw material in the Mexican fields. It is worth mentioning that the use of corn is not feasible due to the country's social and legal restrictions, just as the use of sugarcane is limited by its high prices.

Key words: Super sorghum, pretreatment, hydrolysis, lignocellulosic, bioethanol.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
CONTENIDO	iii
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 Antecedentes.....	8
1.2 Planteamiento del problema.....	9
1.3 Justificación.....	10
1.4 Hipótesis.....	11
1.5 Objetivos	11
1.5.1 Objetivo general	11
1.5.2 Objetivos particulares	11
2 MARCO TEÓRICO	12
2.1 Biocombustibles	12
2.1.1 Biocombustibles primera generación.....	12
2.1.2 Biocombustibles segunda generación	13
2.1.3 Biocombustibles tercera generación.....	14
2.2 Bioetanol	15
2.3 Súper Sorgo	16
2.4 Material lignocelulósicos.....	17
2.4.1 Celulosa	17
2.4.2 Hemicelulosa.....	17
2.4.3 Lignina.....	17
2.5 Pretratamientos para el material lignocelulósico	18
2.5.1 Fisicoquímicos.....	19
2.5.2 Biológicos	19
2.6 Hidrólisis enzimática.....	19
2.7 Fermentación	20
2.8 Condiciones de la fermentación	20
2.8.1 pH.....	20
2.8.2 Temperatura	20

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

2.8.3 Presión	20
2.8.4 Azúcares.....	21
2.9 Microorganismos empleados para la fermentación	21
2.9.1 <i>Saccharomyces</i>	21
2.9.2 <i>Streptococo</i> y <i>Lactobacillus</i>	21
2.9.3 <i>Propionibacterium</i>	21
2.9.4 <i>Escherichia coli</i>	21
2.9.5 <i>Enterobacter</i>	21
2.9.6 <i>Clostridium</i>	21
2.10 Destilación.....	21
3 METODOLOGÍA	23
3.1 Material.....	23
3.2 Microorganismos	23
3.3 Caracterización de los jugos obtenidos del SS	24
3.4 Producción de etanol de primera generación	24
3.4.1 Pre-inóculo	24
3.4.2 Inóculo.....	24
3.4.3 Proceso de fermentación de primera generación	25
3.5 Caracterización del material lignocelulósico	26
3.5.1 Humedad.....	26
3.5.2 Cantidad de cenizas	27
3.5.3 Azúcares estructurales	28
3.6 Producción de bioetanol de segunda generación.....	29
3.6.1 Hidrólisis ácida	29
3.6.2 Hidrólisis enzimática.....	30
3.6.3 Pre-inóculo	31
3.6.4 Inóculo.....	31
3.6.5 Proceso de fermentación de segunda generación	31
3.7 Determinación mediante HPLC	32
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Descripción de la planta de SS	34
4.2 Composición de planta de SS	34
4.3 Balances de materia tallos	35
4.4 Caracterización de jugos de SS	35

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

4.5 Cinéticas de crecimiento (<i>Saccharomyces</i>).....	36
4.6 Fermentación de primera generación.....	38
4.7 Caracterización del material lignocelulósico de SS	41
4.7.1 % Humedad.....	41
4.7.2 % Cenizas	42
4.7.3 % Azúcares estructurales	42
4.8 Hidrólisis ácida	43
4.9 Hidrólisis enzimática.....	45
4.10 Fermentación de segunda generación	47
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
6 PERSPECTIVAS	50
7 BIBLIOGRAFÍA	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Diseño de experimentos.	30
Tabla 2: Balance de materia en la prensa.....	35
Tabla 3: Datos de la cinética.....	37
Tabla 4: Porcentaje promedio de humedad en base seca.	41
Tabla 5: Porcentaje promedio de cenizas.	42
Tabla 6: Composición estructural del material lignocelulósico.	43
Tabla 7: Resultados de superficie de respuesta.	44
Tabla 8: Combinación de los niveles entre los factores de hidrólisis ácida.	45
Tabla 9: Resultados de la hidrólisis enzimática.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Biocombustibles desde la materia prima hasta el uso final.	12
Figura 2: Materia prima para biocombustibles de primera generación.	13
Figura 3: Materia prima para biocombustibles de segunda generación.	14
Figura 4: Materia prima para biocombustibles de tercera generación.	14
Figura 5: Desarrollo del mercado mundial de etanol, FAO [11].	15
Figura 6: Planta de SS. SAGARPA [13].	16
Figura 7: Composición química promedio de tallos de SS [15].	17
Figura 8: Componentes del material lignocelulósico [20].	18
Figura 9: Ruptura del material lignocelulósico mediante tratamientos.	18
Figura 10: Representación de una reacción de hidrólisis [21].	20
Figura 11: Prensa.	23
Figura 12: Diagrama de producción de bioetanol de primera generación.	25
Figura 13: Equipo de fermentación.	25
Figura 14: Herramientas para moler y tamizar el bagazo.	26
Figura 15: Muestras para determinar la humedad.	27
Figura 16: Material para determinar cenizas.	27
Figura 17: Caracterización.	29
Figura 18: Diagrama de producción de bioetanol de segunda generación.	32
Figura 19: HPLC.	33
Figura 20: Composición porcentual de la planta de SS.	34
Figura 21: Cuantificación de azúcares de jugos esterilizados y sin esterilizar.	36
Figura 22: Porcentaje de azúcares en jugos de SS.	36
Figura 23: Cinética de crecimiento.	38
Figura 24: Fermentación de primera generación.	39
Figura 25: Fermentación de jugos de SS.	40
Figura 27: Sacarificación.	45
Figura 28: Hidrólisis enzimática.	46
Figura 29: Fermentación de hidrolizados.	47

1 INTRODUCCIÓN

El etanol en la actualidad se produce a partir de sustratos renovables y a precios muy competitivos, como la caña de azúcar en Brasil y el maíz en Estados Unidos.

Independientemente de la caña de azúcar y del maíz como materia prima, estos son empleados como alimento primordial y al utilizarlos con el fin de producir biocombustible, incrementa no solo su valor si no el de sus derivados. Debido a que en la actualidad la producción de etanol no es suficiente para satisfacer la demanda energética, se están desarrollando nuevos procesos biotecnológicos que utilizan los cultivos agrícolas ricos en celulosa y hemicelulosa, como sustratos para la producción de este biocombustible.

El etanol se perfila como un recurso energético potencialmente sostenible, con alta viabilidad técnica, que ofrece ventajas medioambientales y económicas a largo plazo, a diferencia del petróleo, éste se puede obtener de materias primas renovables, como recursos agrícolas y forestales.

1.1 Antecedentes

En el mundo el etanol ha adquirido un gran valor por la posibilidad de poder usarlo como combustible, ya sea utilizarse directamente o mezclado con gasolinas, de esta manera nos proporciona un combustible limpio y de una calidad mejor, sobre todo porque es una fuente de energía que es renovable [1].

El bioetanol, producto de la fermentación alcohólica de diversos materiales orgánicos a través de la acción de microorganismos, está siendo seriamente estudiado, gracias a la elevación de los precios y disminución de las reservas del petróleo.

En la actualidad se está trabajando en la búsqueda de materias primas baratas, que sustituyan a las tradicionales, esto con el fin de alcanzar una mayor

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

eficiencia en los procesos de fermentación, destilación, purificación del etanol producido, además pueden generar nuevos y grandes mercados para los productores [2].

La dotación de recursos naturales de México como la planta de súper sorgo (SS), la cual se utilizará para realizar dicho trabajo, sugiere que el país puede desarrollar una importante industria de agro-energía y biocombustibles, y contribuir a la disminución de la pobreza en las zonas donde los combustibles fósiles se hacen inalcanzables por sus costos elevados [3].

México posee vastos recursos naturales que pueden incursionar para la producción de bioenergéticos, resultado de su gran diversidad agrícola y de sus condiciones climáticas y geográficas idóneas para este propósito [4].

Es por eso que a nivel nacional se ha optado por buscar fuentes de materias primas baratas que no sean de origen alimenticio, para la producción de etanol anhidro.

1.2 Planteamiento del problema

La problemática del cambio climático que se vive hoy en México y en todo el mundo, han creado la necesidad de buscar materias primas renovables que no sean de origen alimenticio para producir energía.

En tal caso, el bioetanol representa una vía para dar solución a este problema que se vive, ya que se puede obtener de materias primas renovables, como lo es el SS con el que se trabajará en este proyecto, cuyas características fisicoquímicas lo hacen redituable para la producción de este biocombustible en México.

1.3 Justificación

El uso de etanol como fuente de energía se ha convertido en un tema amplio de investigación mundial y su producción ha aumentado notablemente en los últimos años, y la utilización del petróleo como fuente de energía es una amenaza continúa puesto que este es un recurso no renovable.

Hoy en día uno de los retos importantes consiste en satisfacer la demanda energética a nivel mundial. En las últimas décadas está ha sido cubierta con combustibles de origen fósil. Sin embargo, la emisión de gases generados de la extracción, producción y uso de estos combustibles ha provocado un gran daño al medio ambiente. De ahí surge la necesidad de crear nuevos procesos para la producción de bioenergía.

En el presente trabajo se propone la producción de bioetanol a partir del bagazo y de los jugos extraídos del SS. La producción de este biocombustible se hará a nivel laboratorio, desde la parte de caracterización de la materia prima, hasta la producción del etanol.

1.4 Hipótesis

“La planta de súper sorgo es rica en azúcares fermentables, para la producción de bioetanol, que puede usarse como oxigenante de gasolinas o puro”.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar los rendimientos que tiene la planta de SS para la producción de bioetanol, utilizando de manera particular una levadura para etanol de primera generación y una bacteria para segunda generación.

1.5.2 Objetivos particulares

- Caracterización de los jugos y el material lignocelulósico.
- Estudiar la fermentación de los jugos extraídos del SS.
- Determinar las condiciones óptimas de pretratamiento del material lignocelulósico, a fin de recuperar el mayor porcentaje de azúcares fermentables con bajo contenido de furanos.
- Evaluar los rendimientos totales de producción de etanol.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Biocombustibles

Los biocombustibles son energéticos derivados de materias primas agrícolas, biomasa, productos forestales, pesqueros o desechos municipales, así como se muestran en la **Figura 1**, también se obtienen de subproductos y desechos de la agroindustria, la industria alimentaria y los servicios alimentarios, se les clasifica de acuerdo al insumo y a la tecnología empleada para su producción. Pueden ser *sólidos*, como la leña, el carbón vegetal y los gránulos de madera; *líquidos*, como el etanol, el biodiesel y el aceite de pirólisis, o *gaseosos*, como el biogás [5].

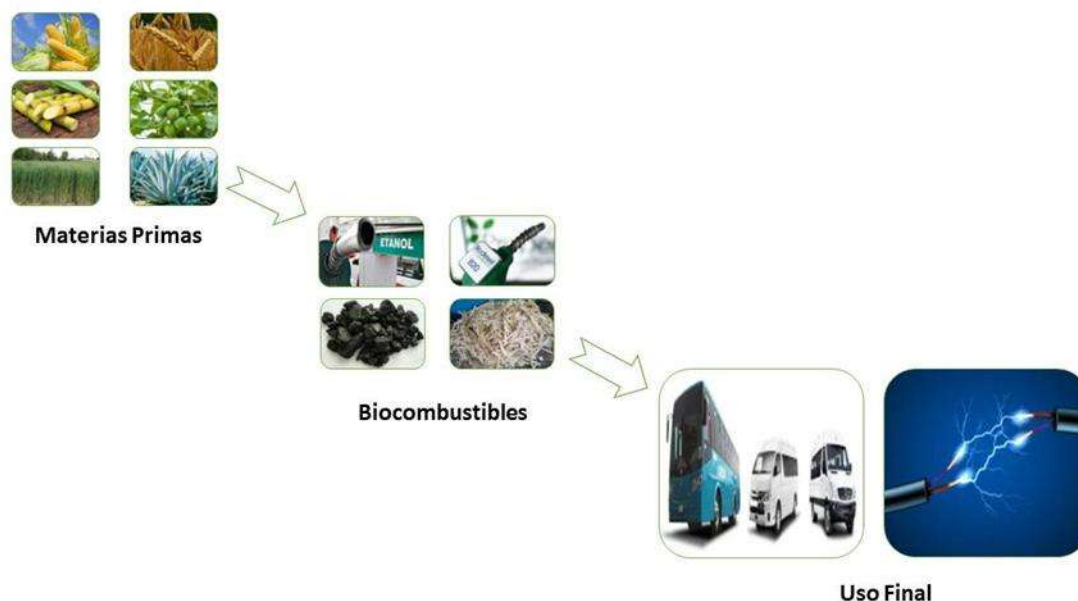


Figura 1: Biocombustibles desde la materia prima hasta el uso final.

2.1.1 Biocombustibles primera generación

Los biocombustibles de primera generación son aquellos combustibles que provienen de la biomasa, particularmente de cosechas (maíz, caña de azúcar, la soja y aceites vegetales vírgenes) destinadas a la alimentación humana o del ganado como las mostradas en la **Figura 2**. En la actualidad, las tecnologías de

producción de estos, son las convencionales usadas en la industria tequilera, son simples y económicas [6].



Figura 2: Materia prima para biocombustibles de primera generación.

2.1.2 Biocombustibles segunda generación

A los combustibles de segunda generación se les conoce como biocombustibles avanzados, son aquellos que se obtienen de los residuos de cultivos, subproductos de la industria alimentaria y forestal, como se muestran en la **Figura 3**. Estos cultivos suelen ser muy abundantes y de crecimiento rápido con lo cual las tierras se pueden recuperar fácilmente para el uso que se les considere o destinarse solamente con fines energéticos, además de que pueden cosecharse en terrenos no agrícolas o marginales [7].



Figura 3: Materia prima para biocombustibles de segunda generación.

2.1.3 Biocombustibles tercera generación

Son aquellos obtenidos de microalgas como las de la **Figura 4** y su obtención está basada principalmente por tecnologías emergentes que ofrecen grandes cantidades de producción por unidad de área y costos menores, debido a su alto contenido de lípidos. Estas son cultivadas en foto-biorreactores, los cuales solo necesitan de algunos nutrientes y luz solar [8].



Figura 4: Materia prima para biocombustibles de tercera generación.

2.2 Bioetanol

El bioetanol, es un compuesto completamente renovable en la naturaleza ha sido ampliamente utilizado como combustible o como oxigenante de gasolinas, ya que mejora su octanaje de manera considerable y al quemarlo presenta algunas ventajas como la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera, lo que ayuda a descontaminar nuestras ciudades [9].

La producción de etanol para el caso de México es muy baja y sin efectos en la oferta global, como lo hace USA (maíz) y Brasil (caña de azúcar). Por eso la necesidad de buscar alternativas en México debido a que no se puede producir a partir de sustratos alimenticios como lo hacen los países mencionados anteriormente, en México se está trabajando con materiales lignocelulósicos que son residuos de cultivos agrícolas y agroindustriales.

Al ser renovable y producido localmente, el etanol permite disminuir la dependencia del petróleo, de esta manera la **Figura 5** nos muestra el desarrollo de este biocombustible, lo que mejora la seguridad energética de los países. Esto es aún más importante para los países no productores de petróleo [10].

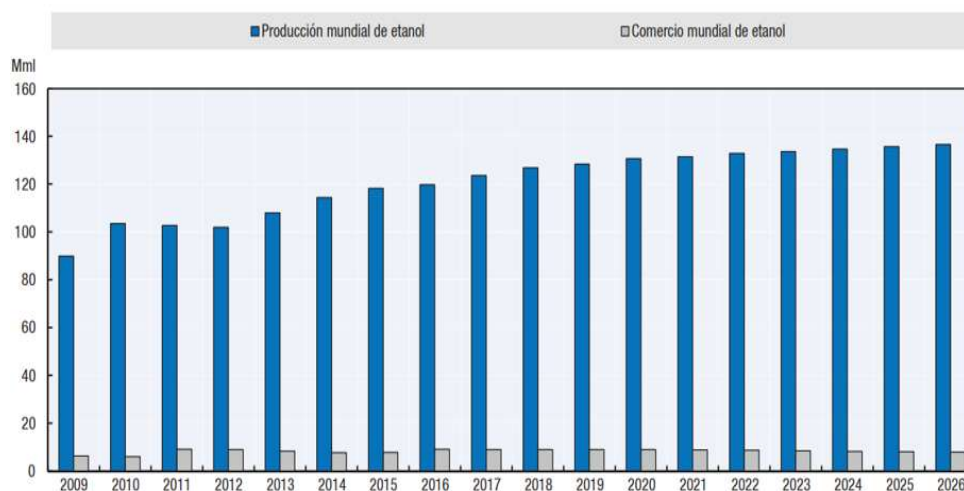


Figura 5: Desarrollo del mercado mundial de etanol, FAO [11].

2.3 Súper Sorgo

El sorgo dulce [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] es uno de los cultivos que ofrece buena rentabilidad en la agricultura convencional, esta planta se muestra en la **Figura 6**; las zonas dedicadas a esta materia prima tienden a crecer ya que la SAGARPA lo está incentivando por ser una alternativa rentable para algunas regiones del trópico mexicano para la producción de etanol, combustible alternativo al uso de combustibles fósiles, que cada vez tienden a ser más escasos [12].



Figura 6: Planta de SS. SAGARPA [13].

El SS es una planta que no requiere un manejo especial o diferente al sorgo común, es tolerante a la sequía, altas temperaturas, inundaciones, salinidad del suelo y toxicidad por acidez. Además, posee amplia adaptabilidad, rápido crecimiento y alta acumulación de azúcar [14].

Es la principal materia prima alternativa que puede suplementar el uso de la caña de azúcar en la producción de etanol.

El súper sorgo es un cultivo que no compite con los granos, ya que puede sembrarse en áreas no aptas para otros cultivos y ofrece en algunos casos grano y forraje, siendo el tallo el principal órgano que se aprovecha, el cual presenta un alto contenido de azúcar tal como se muestra en la **Figura 7**.

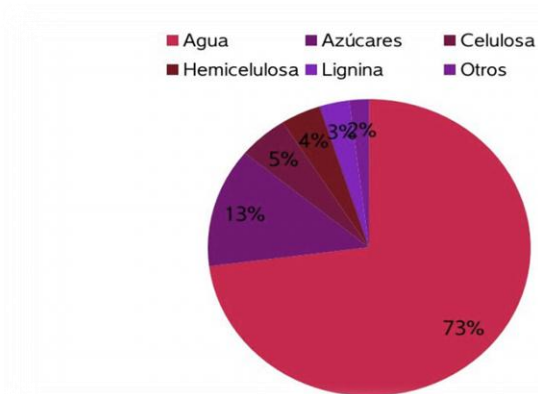


Figura 7: Composición química promedio de tallos de SS [15].

Los tallos de SS concentran grandes cantidades de azúcares, comparado con la caña de azúcar pueden ser más altos o similares, aunque el mecanismo de acumulación del azúcar es diferente [16]; la caña de azúcar requiere de 11 a 17 meses de clima tropical para madurar, mientras que el sorgo requiere de 3.5 a 4 meses [17].

2.4 Material lignocelulósicos

El material lignocelulósico consiste en tres tipos diferentes de polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina, como se muestra en la **Figura 8**, que pueden ser usados para la producción de energía y cubre un amplio rango de fuentes: los residuos de la industria forestal y la agricultura [18].

2.4.1 Celulosa: Es el compuesto orgánico natural más abundante, es el componente fundamental de la pared de las células vegetales en plantas, madera y fibras naturales, se encuentra combinada, generalmente, con sustancias como la lignina y la hemicelulosa [19].

2.4.2 Hemicelulosa: Compuesto abundante en las paredes de las plantas, entremezclada con celulosa y lignina. La hemicelulosa es después de la celulosa el segundo componente más abundante de la pared celular de las plantas.

2.4.3 Lignina: Es un polímero orgánico presente en muchos tejidos vegetales. La

lignina es una sustancia natural que da resistencia y dureza a la madera y estructura de las plantas.

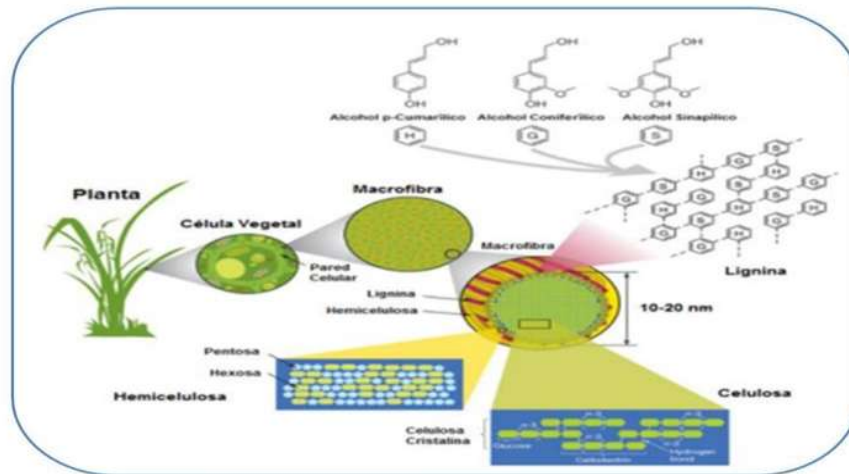


Figura 8: Componentes del material lignocelulósico [20].

2.5 Pretratamientos para el material lignocelulósico

Los tratamientos son una de las etapas más importantes para la conversión del material lignocelulósico. Los objetivos principales de los tratamientos es aumentar la exposición y reducir la cristalinidad de la celulosa, además de intentar eliminar la lignina y la hemicelulosa [20], como se observa en la **Figura 9**.

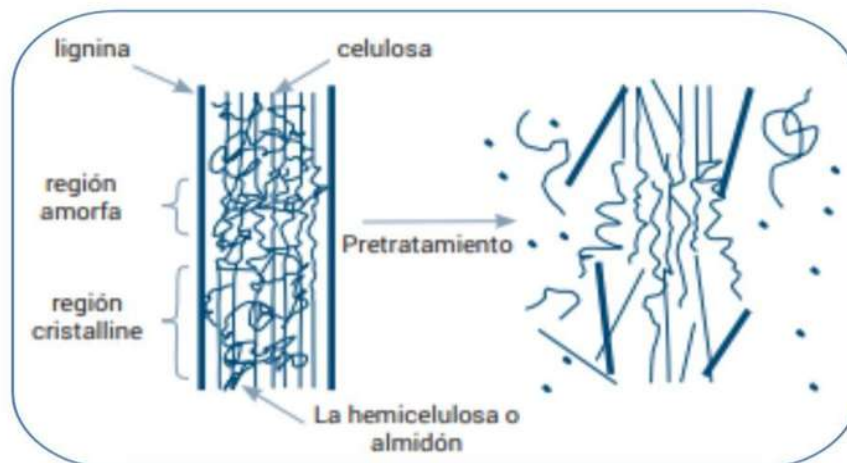


Figura 9: Ruptura del material lignocelulósico mediante tratamientos.

Los métodos de tratamientos se pueden dividir en tres grandes grupos:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

químicos, físicos y biológicos, aunque a veces se requiere una combinación entre ellos para mejores resultados de conversión.

2.5.1 Físicoquímicos:

- Ozonólisis
- Hidrólisis ácida
- Hidrólisis alcalina
- Deslignificación oxidativa
- Procesos con disolventes orgánicos
- Fragmentación mecánica y pirolisis
- Explosión de vapor
- Explosión con amoníaco
- Explosión con dióxido de carbono

2.5.2 Biológicos:

- Utilización de hongos y bacterias de degradación

2.6 Hidrólisis enzimática

La siguiente etapa es la hidrolisis enzimática, ver **Figura 10**, que consiste en degradar los polímeros de celulosa y hemicelulosa restantes al pretratamiento. El objetivo principal es liberar la mayor cantidad de monosacáridos contenidos en las cadenas poliméricas, obteniéndose pentosas y hexosas, disponibles para continuar con la fermentación.

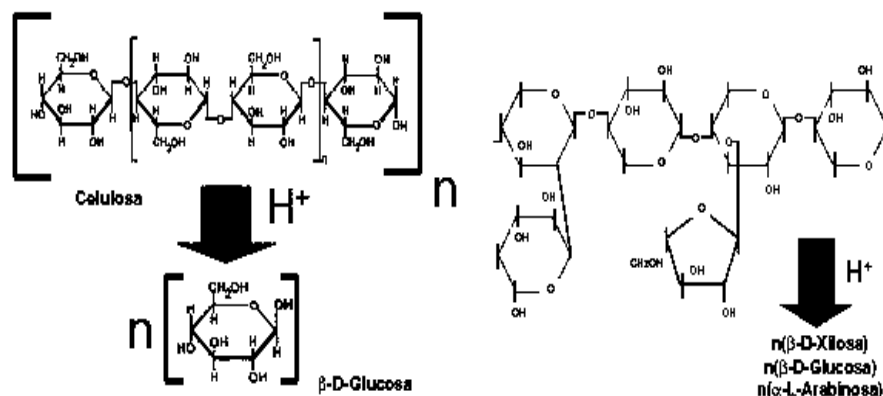


Figura 10: Representación de una reacción de hidrólisis [21].

2.7 Fermentación

Se define como el proceso biológico en plena ausencia de aire el cual asistido por microorganismos (levaduras, hongos, bacterias), que procesan los hidratos de carbono (azúcares) de manera anaerobia, produce diferentes productos finales dentro de los cuales el principal es el alcohol y de manera secundaria el bióxido de carbono. Este proceso también produce moléculas de ATP que consumen los microorganismos en su metabolismo celular [22].

2.8 Condiciones de la fermentación

Los factores a controlar en una fermentación son los siguientes [23]:

2.8.1 pH: La fermentación se realiza entre un rango de 3.0 a 4.0 de pH, a este rango no permite que se desarrollen agentes patógenos.

2.8.2 Temperatura: La actividad de las levaduras es intensa entre 20 y 25°C, máxima a 30°C y por encima de los 40°C disminuye.

2.8.3 Presión: En la actividad fermentativa se forma etanol y gas carbónico, en la medida que su concentración aumenta en el recipiente de fermentación, la presión aumenta y trae como consecuencia una disminución de la actividad celular.

2.8.4 Azúcares: Es la materia prima para las levaduras, la concentración del mosto debe estar entre 14 a 20 grados Brix.

2.9 Microorganismos empleados para la fermentación

Las levaduras son los microorganismos más utilizados para la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a su alta productividad para la producción de bioetanol y a que se separan mejor después de la fermentación.

- **2.9.1 *Saccharomyces*:** alcohol etílico y dióxido de carbono
- **2.9.2 *Streptococo y Lactobacillus*:** el ácido láctico
- **2.9.3 *Propionibacterium*:** ácido propionico, ácido acético, y el dióxido de carbono
- **2.9.4 *Escherichia coli*:** ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, alcohol etílico, dióxido de carbono e hidrógeno
- **2.9.5 *Enterobacter*:** ácido fórmico, alcohol etílico, ácido 2,3 butanodiol y láctico, dióxido de carbono, e hidrógeno.
- **2.9.6 *Clostridium*:** ácido butírico, alcohol butílico, acetona, alcohol de isopropílico, dióxido de carbono, e hidrógeno

2.10 Destilación

La destilación es una técnica que consiste en separar los distintos componentes de una mezcla, mediante la evaporación por calentamiento y posterior condensación, aprovechando sus diferentes puntos de ebullición. Cuanto mayor sea la diferencia entre los puntos de ebullición será más eficaz la separación de sus componentes; es decir, los componentes se obtendrán con un mayor grado de pureza.

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

presión atmosférica estándar. Es por ello que con una destilación simple se obtiene un alcohol con composición definida por el azeótropo y para conseguir un producto más puro es necesario utilizar otro proceso de destilación (extractiva) [24].

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.

3 METODOLOGÍA

3.1 Material

El súper sorgo (SS), variedad MX-SE1, fue traído de un campo experimental de Salvatierra, Guanajuato.

El cuál se separó en sus componentes (tallos, hojas y espiga), para determinar su composición porcentual. Los tallos se exprimieron en una prensa tipo tornillo sin fin como la que se muestra en la **Figura 11**, para extraer los jugos.



Figura 11: Prensa.

El bagazo resultante de la extracción de jugos se puso a secar junto con las hojas, para posteriormente molerlo, y usarse para la producción de etanol de segunda generación.

3.2 Microorganismos

- ***Saccharomyces Cerevisiae***: se trabajó con una levadura llamada Ethanol red, la cual se tenía presente en el posgrado de trabajos anteriores.
- ***E. Coli (MS04)***: bacteria homoetanológica, capaz de consumir pentosas y hexosas, traída bajo convenio con el instituto de biotecnología de la UNAM campus Cuernavaca.

3.3 Caracterización de los jugos obtenidos del SS

- Extracción de los jugos.
- Identificación de los azúcares presentes en el jugo de SS.
- Determinación del porcentaje de azúcares contenidos, mediante cromatografía de líquidos HPLC, usando patrones para hacer curvas de calibración para poder determinar las muestras de jugo.

3.4 Producción de etanol de primera generación

3.4.1 Pre-inóculo

Se inoculó el medio líquido (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 20 g/l de dextrosa) con levaduras liofilizadas previamente hidratadas (35°C, 20 minutos) en un matraz con baffles. Dicho matraz fue incubado a 30°C y 100 rpm por alrededor de 12 horas.

Se realizaron cinéticas de crecimiento para conocer el comportamiento del microorganismo y establecer un proceso estándar, determinando la DO en la que se encuentra el cultivo, para saber exactamente en qué tiempo la levadura se encuentra en condiciones adecuadas de crecimiento para poder inocular los jugos del SS, la **Figura 12** muestra el diagrama para etanol de primera generación.

3.4.2 Inóculo

Antes de llevar a cabo la fermentación, el medio fue inoculado con el volumen de células requerido proveniente del pre-inóculo para iniciar en 0.1 DO. Bajo las condiciones anteriores el medio fue encubado a 30°C, pH de 6 y 100 rpm, al transcurrir el tiempo determinado por las cinéticas (etapa exponencial, 24 hr), las células fueron centrifugadas para posteriormente inocular los jugos (alta DO) que previamente fueron esterilizados (15 min, 121°C).

3.4.3 Proceso de fermentación de primera generación

El proceso se realizó en los reactores (freakers), mediante el uso de una torre de control de pH, una parrilla de agitación y un termo-circulador para el control de temperatura, este equipo fue prestado por el Instituto de Biotecnología de la UNAM campus Cuernavaca, el equipo se muestra en la **Figura 13**.

Se realizaron a nivel laboratorio (200ml) pruebas de fermentación con los jugos de SS, agregando el inóculo de *Saccharomyces* (48 horas).

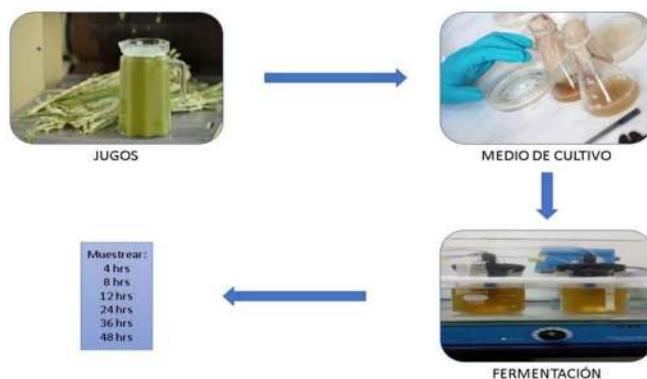


Figura 12: Diagrama de producción de bioetanol de primera generación.

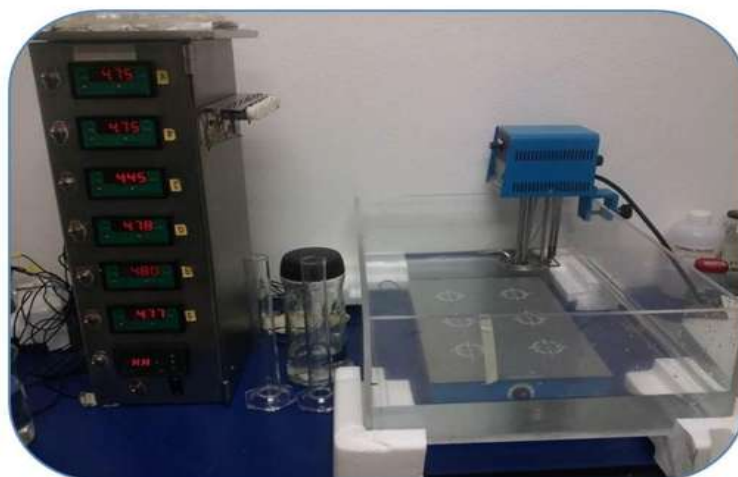


Figura 13: Equipo de fermentación.

3.5 Caracterización del material lignocelulósico

Al bagazo obtenido de la extracción de los jugos y las hojas, se someten a secado, dejándolo bajo los rayos del sol durante tres días, posteriormente se realizó una molienda para reducir más el tamaño de partícula a malla 20-80 (0.841-1.177 mm), con la ayuda de un molino y tamices como los que se muestran en la **Figura 14**.



MOLINO



TAMICES

Figura 14: Herramientas para moler y tamizar el bagazo.

Se determinaron las siguientes pruebas para caracterizar el material lignocelulósico basándose en protocolos del NREL [25]:

3.5.1 Humedad: La cuantificación de humedad se realizará mediante diferencia de pesos, tomando una muestra húmeda la cual se colocará en una estufa a 105°C durante 12hrs, en la **FIGURA 15** se observan las muestras.



Figura 15: Muestras para determinar la humedad.

3.5.2 Cantidad de cenizas: El contenido de cenizas se efectúa de manera gravimétrica, después de quemar cuidadosamente las muestras en las placas de calentamiento, para posteriormente calcinar en una mufla a 525 °C, la **Figura 16** muestra las cenizas obtenidas.



MATERIAL LIGNOCELULÓSICO



CENIZAS

Figura 16: Material para determinar cenizas.

3.5.3 Azúcares estructurales:

- Se pesaron 300.0 ± 10.0 mg de cada uno de los componentes del SS y se vertieron en un tubo con rosca. Cada muestra por triplicado.
- Se colocan 3 mL de ácido sulfúrico al 72% a cada muestra.
- Se colocaron las muestras en un baño maría (30°C, 60 minutos), agitando las muestras cada 5 minutos con un Vortex, cabe señalar que la agitación es esencial para asegurar el contacto ácido-partículas y se tenga hidrólisis uniforme.
- Una vez completada la hidrólisis, se retiró cada una de las muestras del baño y se pasaron a un frasco schott con tapa y se añadieron 84ml de agua destilada para diluir la concentración hasta 4%.
- Las muestras (previamente pesadas) fueron colocadas en una Autoclave (121°C, 60 minutos). Después de completar el ciclo de autoclave, se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente (pesar y ajustar líquidos).
- Al llegar a la temperatura ambiente las muestras fueron filtradas a vacío mediante un embudo buchner y papel filtro de poro chico, se recuperó el sobrenadante en un vial ependorft, esta muestra se utilizará para determinar la lignina soluble en ácido y los azúcares estructurales.
- Se tomó una alícuota de 1 ml del sobrenadante de cada una de las muestras y se leen en el espectrofotómetro a 540nm para determinar la lignina soluble.
- Se tomó una alícuota de 3 ml del sobrenadante de cada una de las muestras y se neutralizo con carbonato de calcio hasta un pH 5-6. Añadiendo el carbonato poco a poco.
- Se prepararon las muestras para el análisis de HPLC (Metacarb 87C, detector IR y H₂SO₄ 5 mili-normal como fase móvil), pasando el líquido a través de un filtro de 0,2 µm a un vial de muestreo, para determinar los azúcares. Las muestras neutralizadas se pueden almacenar en el refrigerador durante tres o cuatro días.

En la **Figura 17** se observa las muestras al realizar la caracterización del material.



Figura 17: Caracterización.

3.6 Producción de bioetanol de segunda generación

3.6.1 Hidrólisis ácida

Para el bagazo (mezcla hojas y tallos), se realizó un diseño de experimentos con ácido diluido, dicho diseño se determinó usando un Software llamado Statgraphics, dónde se introdujeron los intervalos de las variables a manipular, las cuáles son:

- ✓ Temperatura 121-130°C,
- ✓ Tiempo 0-30 minutos,
- ✓ Concentración 1-4% peso/peso.

El programa permitió determinar los experimentos a realizar para poder encontrar el punto óptimo de la hidrólisis ácida. Los experimentos fueron realizados por triplicado con una relación de sólido 15% peso/peso en base a las recomendaciones de la bibliografía. El peso del material a hidrolizar consideró la humedad promedio de la mezcla. En la **Tabla 1** se muestra el bloque de

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

experimentos efectuados, cabe señalar que estos se hicieron por triplicado.

Tabla 1: Diseño de experimentos.

Bloque	Tiempo (Mint)	Concentración (% Peso)	Temperatura (°C)
1	15	2.5	125.5
1	15	1	121
1	30	2.5	130
1	15	2.5	125.5
1	15	4	121
1	30	1	125.5
1	30	4	125.5
1	30	2.5	121
1	15	2.5	125.5
1	0	4	125.5
1	15	1	130
1	0	2.5	130
1	0	1	125.5
1	0	2.5	121
1	15	4	130

Para llevar a cabo la hidrólisis se pesó y colocó 6 gr de material seco previamente tamizado (malla 20-80), y se le agregaron 34 gr de ácido sulfúrico (relación 15% w/w entre materia sólida y el ácido diluido). Los experimentos realizados se realizaron en autoclave a las condiciones obtenidas por el software.

Con los resultados obtenidos se realizó una superficie de respuesta para encontrar las condiciones óptimas de hidrólisis.

3.6.2 Hidrólisis enzimática

Al material obtenido del hidrólisis ácida se pasa al reactor de hidrólisis enzimática. El pH se ajusta a (4.8-5) con KOH 4N, después se le agregan 526 mg de citrato de sodio dibásico para mantener el pH. Finalmente se agregan las enzimas HTec y CTec, en base a la cantidad de glucanos y xilanos presentes. La reacción de hidrólisis se realiza a 50°C y 150 rpm, al finalizar este proceso se

redujo la temperatura a 37°C para efectuar la fermentación inoculando con *E. Coli* (MS04) los fleakers (reactores).

3.6.3 Pre-inóculo

Se inoculó el medio enriquecido (Luria Bertani, LB) (5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de peptona, 5 g/l de cloruro de sodio) con la bacteria *E. Coli* (MS04) en un matraz con baffles. Dicho matraz fue incubado a 37°C y 100 rpm por alrededor de 12 horas. Finalmente se determinó la densidad óptica (DO) y se calculó el volumen necesario para iniciar la adaptación de la cepa en los reactores de fermentación 0.1 DO.

3.6.4 Inóculo

Antes de llevar a cabo la fermentación, el medio fue inoculado con el volumen de células requerido proveniente del pre-inóculo para iniciar en 0.1 DO. Bajo las condiciones anteriores el medio fue encubado en un baño maría a 37°C, pH de 7 y 100 rpm, al transcurrir el tiempo (etapa exponencial, 24 hr) y cerciorarnos de que ya estuvieran crecidas (1 o 2 DO), se calculó el volumen necesario para inocular 0.2 DO (baja densidad), las células fueron centrifugadas para posteriormente inocular los hidrolizados.

3.6.5 Proceso de fermentación de segunda generación

El proceso se realizó en una torre de control de pH, mediante electrodos que se ajustan a los reactores de fermentación (fleakers), que estos a su vez fueron asistidos con agitación, este equipo fue prestado por el Instituto de Biotecnología de la UNAM campus Cuernavaca, el equipo se muestra en la **Figura 13**.

La **Figura 18** muestra el diagrama de obtención de etanol a partir de los residuos lignocelulósicos.

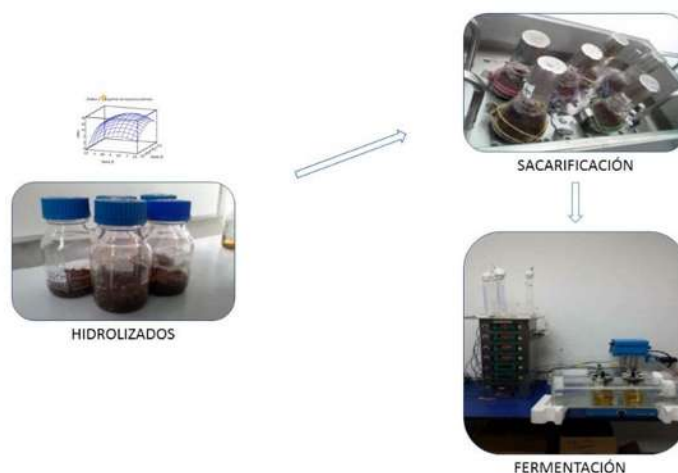


Figura 18: Diagrama de producción de bioetanol de segunda generación.

Se tomaron muestras cada 4 horas durante las primeras 12, después a las 24, 36, 48, 60 horas.

3.7 Determinación mediante 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:

- ✓ Se colocan las muestras en el carrusel de una centrifuga cuyas condiciones serán 8 minutos a 13300 rpm para que precipite el sólido de la muestra.
- ✓ Hacer diluciones de la muestra, dependiendo si cae dentro de la curva de calibración, colocarlas en eppendorfs.
- ✓ Se agitan y posteriormente se filtran en viales para cromatografía, pasando la muestra por una membrana Milipore de 0.22 μm reteniendo partículas que pueden estar presentes.
- ✓ Los viales serán colocados en el automuestreador del cromatógrafo y se analizan bajo las siguientes condiciones:

- Columna Metacarb 87C a 60°C

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

- Flujo de fase móvil (H_2SO_4 5 Mn) a 0.6 mL/min
- Detector de índice de refracción
- Tiempo de muestra: 25 a 50 minutos

Previamente se prepararán soluciones estándares de diferentes azúcares y etanol, 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 5 y 50 g/L. Posteriormente, a todas las corridas del cromatógrafo se debe leer el área bajo la curva de los picos para determinar las concentraciones, el equipo se muestra en la **Figura 19**.



Figura 19: HPLC.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el rendimiento que tiene el SS para la producción de biocombustibles en México, como una alternativa de agro-negocios.

4.1 Descripción de la planta de SS

El SS, es una planta (ver **Figura 6**) con una tasa de crecimiento que llega a ser de 5.3 cm por día, lo que lo hace eficiente para la producción de biomasa; dando así, la oportunidad de aprovecharlo como insumo para la obtención de biocombustibles.

Esta variedad de planta llega a alcanzar una altura de 4.3 metros de altura [12], publicado en un estudio de evaluación por parte de SAGARPA en Tecomán, Colima.

4.2 Composición de planta de SS

La planta de SS variedad MX-SE1 se separó en sus tres componentes principales (hojas, tallos y espiga), posteriormente fueron pesadas para determinar su composición porcentual de aporte a la planta, los resultados son los mostrados en la **Figura 20**.

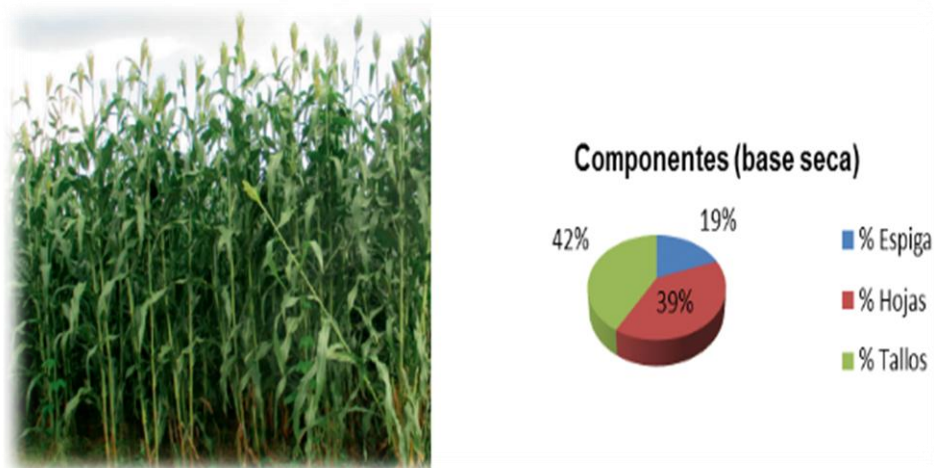


Figura 20: Composición porcentual de la planta de SS.

4.3 Balances de materia tallos

Los balances de masa se realizaron con la finalidad de determinar el porcentaje de jugo y bagazo, para el balance de masa se utilizó como referencia una tonelada de materia prima, del cual el 61% corresponde a los tallos (base húmeda), por ende 610 kg entraron a la prensa ($F = 610 \text{ Kg}$), repartiéndose en dos corrientes nuevas ($B = 396.5 \text{ Kg}$) para el bagazo resultante, ($J = 213.5 \text{ Kg}$) para los jugos obtenido, los resultados se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Balance de materia en la prensa.

ETAPA	
Entrada Prensa	610 Kg
Salida Prensa	
Bagazo	396.5 Kg
Jugo	213.5 Kg

En el cual se obtienen 213.5 Kg de jugos los cuales se aprovechan para obtener etanol de primera generación, cabe destacar que el rendimiento adecuado para la producción de biocombustibles se centra antes de que empiece a brotar la espiga, ya que es cuando se encuentra la mayor cantidad de azúcares en los tallos, así como, mayor porcentaje de jugos.

4.4 Caracterización de jugos de SS

Para la determinación de azúcares presentes en las muestras se determinaron mediante un equipo HPLC. Los resultados se muestran en la **Figura 21**, cuyos porcentajes **Sacarosa 61%**, **Glucosa 24%** y **Fructosa 15%** (ver **Figura 22**), se encuentran dentro del rango reportado en el artículo de Phowchinda y colaboradores [26].

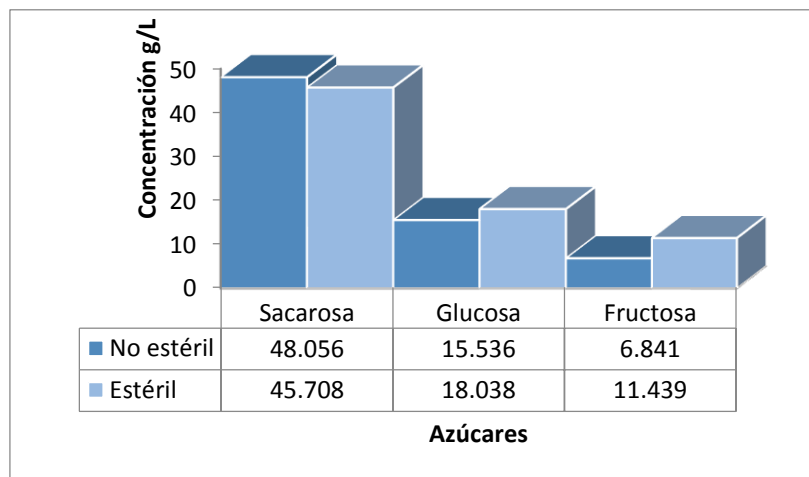


Figura 21: Cuantificación de azúcares de jugos esterilizados y sin esterilizar.

Cabe destacar que al esterilizarse la sacarosa se hidroliza dependiendo del tiempo que dura en la autoclave (121°C, 15 minutos), por ende, aumentó un poco la concentración.

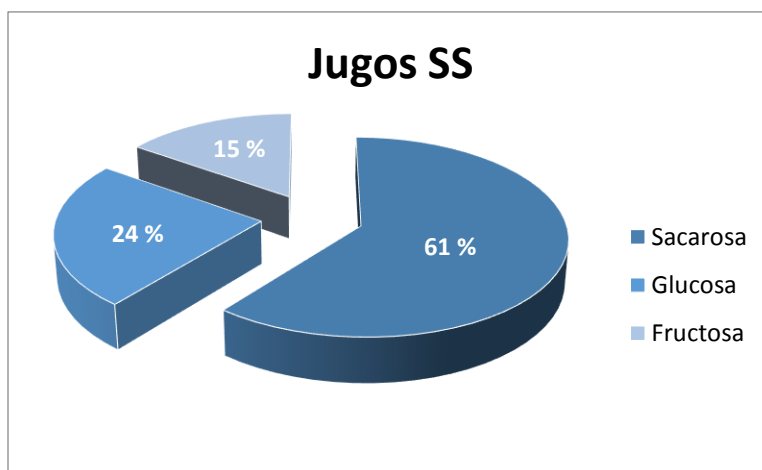


Figura 22: Porcentaje de azúcares en jugos de SS.

4.5 Cinéticas de crecimiento (*Saccharomyces*)

Para proseguir con el proceso de fermentación fue necesario conocer el comportamiento de la levadura, para ello se efectuaron cinéticas del microorganismo, para determinar el punto óptimo de inoculación de los jugos de SS.

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Los resultados de una cinética de un jugo de fermentación sintético, fue inoculado a 0.4 DO, se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Datos de la cinética.

Horas	E (0.4 DO)	F (0.4 DO)
0	0.215	0.203
4	0.454	0.532
8	0.895	0.95
12	1.13	1.39
18	2.62	2.58
24	4.01	3.96
30	5.16	5.76
36	7.14	6.92
42	4.69	5.04
48	3.68	4.24

Como se muestra en la **Figura 23**, la mayor cantidad alcanzada en el desarrollo de las células antes de pasar a la fase estacionaria se encuentra en el rango de 12-30 horas, lo que conviene en estos casos es inocular a alta densidad óptica para que las células no consuman azúcares de los jugos para su crecimiento, si no, para realizar la conversión a etanol.

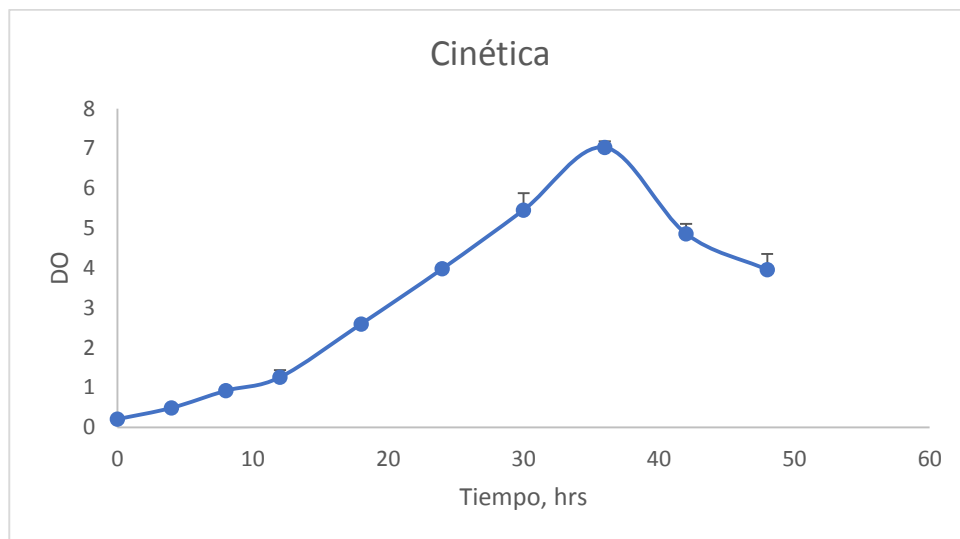


Figura 23: Cinética de crecimiento.

4.6 Fermentación de primera generación

La fermentación es llevada a cabo por distintos microorganismos, en este caso para los jugos se realizó con una levadura (*Saccharomyces Cerevisia*), las condiciones que se requieren, es 150 rpm, pH de 6 y una temperatura de 30°C, para evitar que la levadura contenida en el medio líquido sea destruida, esta se centrifugo y se vertió, en el reactor (condiciones estériles), ya que puede ser susceptible a contaminación. El tiempo de fermentación inició en cuanto el inoculo entra al reactor. La fermentación fue montada como se muestra en la siguiente **Figura 24**.

Dentro del proceso se monitorearon los parámetros, pH mediante la adición de una base (KOH, 4N), agitación sin presencia de vórtice para evitar la aireación y la temperatura del baño para evitar la inhibición o destrucción del microorganismo.

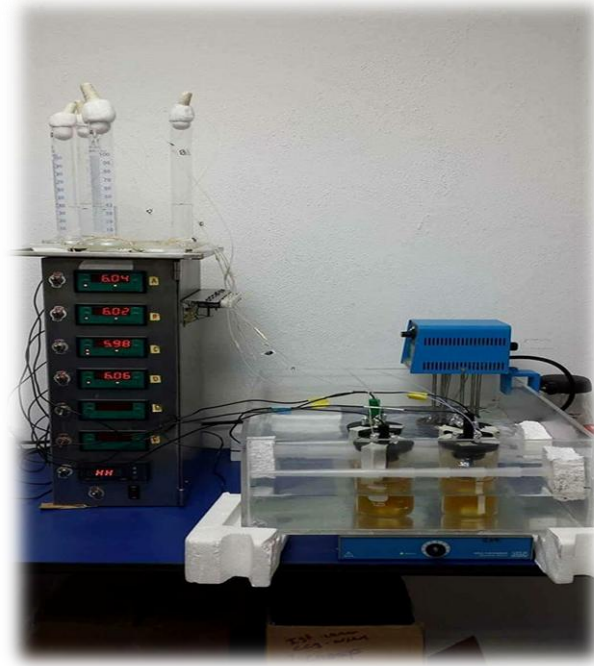


Figura 24: Fermentación de primera generación.

El tiempo de fermentación es de 48 horas, y se muestreo cada 2 horas durante las primeras 12, después a las 24, 36 y 48 horas para tener un control de la conversión de azúcares a etanol.

Pasando las 48 horas, se cuantifica tanto el etanol obtenido como la conversión de los azucares que se tienen al final del proceso.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 25:**

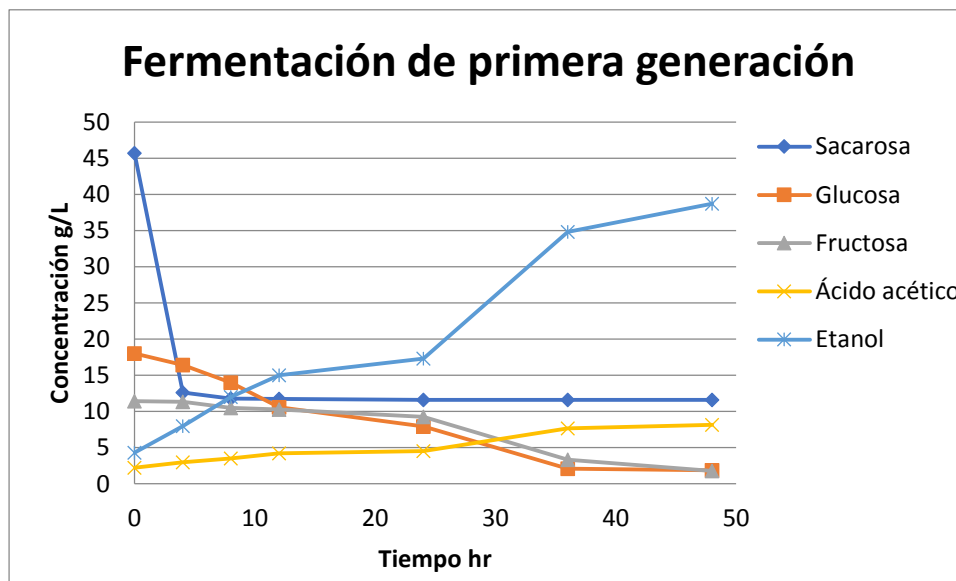


Figura 25: Fermentación de jugos de SS.

Obteniéndose:

$$Y_{\frac{OH}{Azúcares\ tot}} = 0.5454$$

Este resultado indica un rendimiento de fermentación contabilizando el total de azúcares presentes en los jugos del SS, lo que nos indica que el **54%** de los azúcares presentes se convirtieron en etanol, lo que nos indica un buen rendimiento, comparado con el obtenido por Peña y col, que es de **53%**.

Basándose en una hectárea (primer corte, 100 toneladas), se obtienen 15803.11 L de jugos ($\rho = 1.351 \text{ Kg/L}$) que estos a su vez contienen 75 g/L de azúcares con lo que se puede producir 1.5 m^3 de etanol, para esta variedad (MX-SE1) y tiempo de cosecha, cabe destacar que la mayor cantidad de jugos y de azúcares se alcanza antes de empiece a brotar la espiga, por lo que la cantidad obtenida en este proyecto no están dentro de los reportados en literatura como lo indica Yerbes [27], donde indica que para una hectárea se obtienen 3.4 m^3 de etanol, que está por encima del reportado en este trabajo.

4.7 Caracterización del material lignocelulósico de SS

La caracterización del material lignocelulósico se llevó a cabo mediante los protocolos del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL por sus siglas en Ingles) [25].

4.7.1 % Humedad

Haciéndolo por triplicado, la cuantificación de humedad de los componentes (hojas, tallos, espiga y mezcla), se realizó mediante diferencia de pesos, tomando una muestra húmeda la cual se colocó en una estufa a 105°C durante 12hrs, la **Tabla 4** muestra los resultados. La humedad se determinó mediante la siguiente formula:

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

M_i = Masa inicial, gramos

M_f = Masa final, gramos

$\% H$ = Porcentaje de humedad

Tabla 4: Porcentaje promedio de humedad en base seca.

Componente	% Humedad
Hojas	8.416 ± 0.1580
Tallos	6.685 ± 0.1626
Espiga	17.248 ± 0.0453
Mezcla	8.235 ± 0.4031

4.7.2 % Cenizas

Haciéndolo por triplicado, la cuantificación de cenizas se realizó mediante diferencia de pesos, tomando una muestra seca la cual se colocó en una mufla a $550 \pm 25^\circ\text{C}$ durante 12hrs, la **Tabla 5** muestra los resultados. Las cenizas se determinaron con la siguiente formula:

$$\% C = \left(\frac{D - A}{B - A} \right) (100)$$

A = Masa crisol vacío, gramos

B = Masa crisol + muestra seca, gramos

D = Masa crisol + muestra calcinada, gramos

% C = Porcentaje de cenizas

Tabla 5: Porcentaje promedio de cenizas.

Componente	% Cenizas
Hojas	18.670 ± 0.0687
Tallos	3.660 ± 0.1474
Espiga	4.157 ± 0.1661
Mezcla	10.127 ± 0.2164

4.7.3 % Azúcares estructurales

El punto fundamental dentro de la caracterización es la cantidad de azúcares que componen el material lignocelulósico, los resultados obtenidos en la caracterización del bagazo de SS se reportan en la **Tabla 6**, en la que se presenta la composición de glucanos, xilanos y lignina obtenida experimentalmente, los resultados fueron calculados siguiendo los protocolos del NREL.

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

El material lignocelulósico de cada una de sus partes primeramente fue secado a temperatura ambiente, para determinar los porcentajes, se hacen por triplicado.

Tabla 6: Composición estructural del material lignocelulósico.

Composición (%)	Espiga	Hojas	Tallos	Mezcla
Glucanos	49.79 ± 3.986	24.56 ± 0.295	37.92 ± 1.010	33.82 ± 0.565
Xilanos	11.03 ± 0.467	14.1 ± 0.229	16.81 ± 0.545	16.17 ± 0.224
Arabinanos	4.48 ± 0.883	3.54 ± 0.189	2.53 ± 0.053	3.12 ± 0.119
Lignina	18.112 ± 1.026	30.93 ± 0.552	20.59 ± 0.935	26.27 ± 2.616
HMF	0.01	0.03	0.06	0.05
Furfural	0.00	0.05	0.09	0.06

La literatura muestra que para los tallos los rangos de glucanos, xilanos y lignina son de, 34-44%, 25-27% y 18-20%, respectivamente [15]. Los resultados extraídos en ésta investigación muestran que la caracterización arroja resultados de acuerdo a estos rangos; el porcentaje de xilanos está por debajo y es de **16.81%**, esto es debido a que la cantidad de estos azúcares estructurales dependen de la variedad, tiempo de cosecha y madurez de la planta. La planta usada para la investigación ya estaba muy madura (con espiga).

4.8 Hidrólisis ácida

De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización del material, se realizó un diseño de experimentos manipulando 3 variables (tiempo, temperatura y concentración de ácido), se utilizó una autoclave como se mencionó en la metodología. Los resultados de la superficie de respuesta se muestran en la **Tabla 7**.

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Los resultados obtenidos se realizaron por triplicado. Lo que se quiere en una hidrólisis ácida es liberar la hemicelulosa en forma de xilosa, es por ello que es la que se encuentra en mayor concentración. De acuerdo con la caracterización la máxima concentración de xilosa esperada es de **27.56 g/L**, ningún experimento recupera toda la xilosa, la mayor recuperación se centra en ($T = 130^{\circ}\text{C}$, $t = 30$ minutos, $C = 2.5\%$) que es de **25.41 g/L**, lo que indica que se está recuperando el **92%** de la xilosa presente en el material.

Tabla 7: Resultados de superficie de respuesta.

Tiempo (Mint)	Concentración (% Peso)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)
15	2.5	125.5	8.13 ± 0.34	22.37 ± 0.69	4.18 ± 0.12
15	1	121	4.14 ± 0.10	6.23 ± 0.14	5.27 ± 0.05
30	2.5	130	8.13 ± 0.04	25.41 ± 0.08	3.16 ± 0.14
15	2.5	125.5	8.30 ± 0.21	22.32 ± 0.85	4.18 ± 0.09
15	4	121	9.14 ± 0.28	24.11 ± 0.64	3.99 ± 0.03
30	1	125.5	4.54 ± 1.48	11.98 ± 1.73	4.87 ± 0.00
30	4	125.5	9.99 ± 0.01	25.35 ± 0.56	3.55 ± 0.18
30	2.5	121	8.39 ± 0.04	23.55 ± 0.08	4.56 ± 0.14
15	2.5	125.5	8.22 ± 0.27	22.35 ± 0.77	4.18 ± 0.10
0	4	125.5	8.52 ± 0.01	23.03 ± 0.56	3.72 ± 0.18
15	1	130	5.18 ± 0.34	11.66 ± 0.69	5.07 ± 0.12
0	2.5	130	7.42 ± 0.04	21.27 ± 0.08	4.32 ± 0.14
0	1	125.5	4.12 ± 0.34	4.90 ± 0.69	5.01 ± 0.12
0	2.5	121	5.69 ± 0.04	17.82 ± 0.08	4.91 ± 0.14
15	4	130	9.67 ± 0.01	25.02 ± 0.56	3.30 ± 0.18

Los resultados obtenidos se alimentan al software para determinar el punto óptimo de la hidrólisis, considerando que nuestra variable principal es la liberación de xilosa. Los resultados obtenidos por el software para optimización se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Combinación de los niveles entre los factores de hidrólisis ácida.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Tiempo	0	30	30
Concentración	1	4	3.16
Temperatura	121	130	130

Con el óptimo se recupera el **96%**, lo que indica que se obtienen **26.42 g/L** de xilosa, lo restante se puede obtener al hacer la hidrólisis enzimática.

4.9 Hidrólisis enzimática

Al material obtenido de la hidrólisis ácida (40 gr) se pasa al de hidrólisis enzimática. Finalmente se agregan las enzimas HTec y CTec , 35 y 209 uL respectivamente, en base a la cantidad de glucanos y xilanos presentes. La reacción de hidrólisis se realizó a 50°C y 150 rpm.

Posteriormente al inicio de la hidrolisis enzimática se muestreo cada 4 horas durante las primeras 12, después 24, 36 y 48, para tener el control de liberación de los azúcares, se hicieron dos pruebas, una a **20 UPF** y otra a la recomendada por el fabricante (**6%** en peso de CTec3 y **1%** en peso de HTec3), los resultados se muestran en la **Figura 27**.

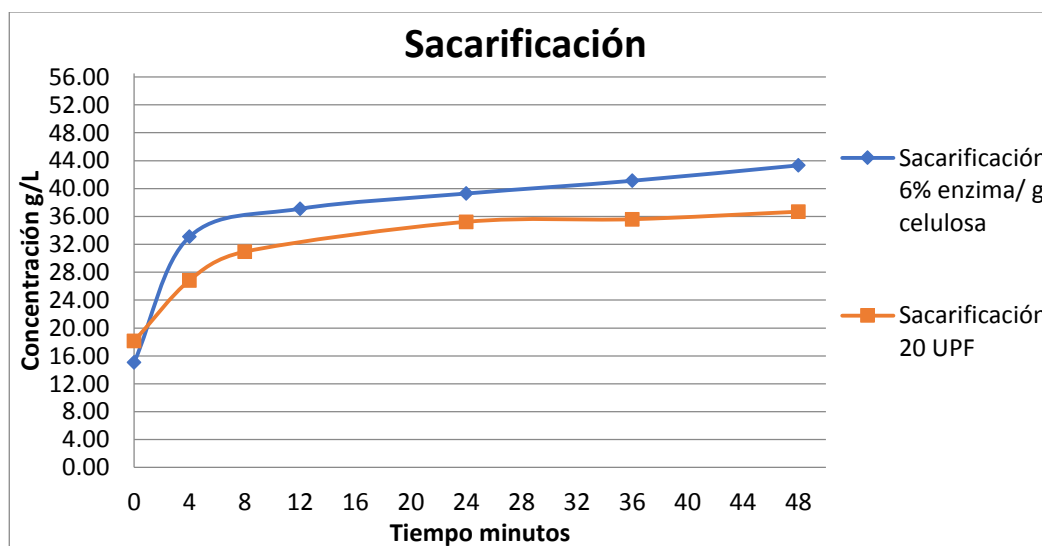


Figura 26: Sacarificación.

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Cabe destacar que después de las 12 horas el cambio de liberación de azúcares no es significativo en las demás horas, lo que se puede concluir es que a las 12 horas es cuando se encuentra la mayor liberación por lo cual se tomó como punto óptimo y la cantidad especificada por el fabricante de enzimas, los resultados se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Resultados de la hidrólisis enzimática.

Tiempo hr	Glucosa g/L	Xilosa g/L	Arabinosa g/L	Acetato g/L	HMF g/L	Furfural g/L
0	18.98 ± 0.54	25.27 ± 0.40	3.93 ± 0.07	2.69 ± 0.03	0.87 ± 0.02	1.29 ± 0.03
4	26.61 ± 0.12	24.93 ± 0.12	3.86 ± 0.22	2.62 ± 0.10	0.86 ± 0.03	1.30 ± 0.02
8	30.38 ± 0.38	25.54 ± 0.57	3.86 ± 0.07	2.73 ± 0.03	0.85 ± 0.03	1.26 ± 0.01
12	29.50 ± 0.21	23.92 ± 0.04	3.61 ± 0.05	2.58 ± 0.02	0.81 ± 0.01	1.22 ± 0.01
24	34.78 ± 0.32	26.54 ± 0.02	4.04 ± 0.01	2.84 ± 0.01	0.85 ± 0.03	1.20 ± 0.01
36	35.25 ± 0.26	26.41 ± 0.03	4.05 ± 0.02	2.83 ± 0.03	0.82 ± 0.01	1.17 ± 0.01
48	36.04 ± 0.76	25.15 ± 0.49	4.62 ± 0	2.36 ± 0.03	0.84 ± 0.03	1.00 ± 0.01

La **Figura 28** muestra los resultados de la hidrólisis enzimática para ver el comportamiento de la liberación, y cómo se comportan los otros componentes.

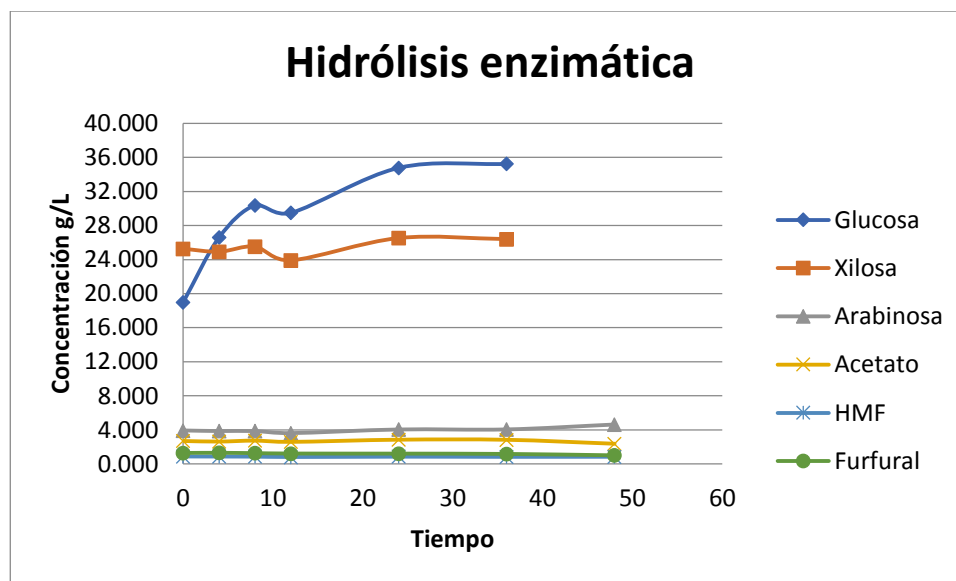


Figura 27: Hidrólisis enzimática.

4.10 Fermentación de segunda generación

En este caso para los hidrolizados se trabajó con una bacteria (*E. Coli* MS04), las condiciones de fermentación, es 150 rpm, pH de 7 y una temperatura de 37°C. El tiempo de fermentación inició en cuanto el inóculo entra al reactor a 0.1 DO. La fermentación fue realizada en minifermentadores **Figura 24**.

Dentro del proceso se monitorearon los parámetros, pH mediante la adición de una base (KOH, 2N), agitación sin presencia de vórtice para evitar la aireación y la temperatura del baño para evitar la inhibición o destrucción del microorganismo.

El tiempo de fermentación es de 48 horas, y se muestreo cada 2 horas durante las primeras 12, después a las 24, 36 y 48 horas para tener un control de la conversión de azúcares a etanol.

Pasando las 48 horas, se cuantifica tanto el etanol obtenido como la conversión de los azucars que se tienen al final del proceso.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 29**:

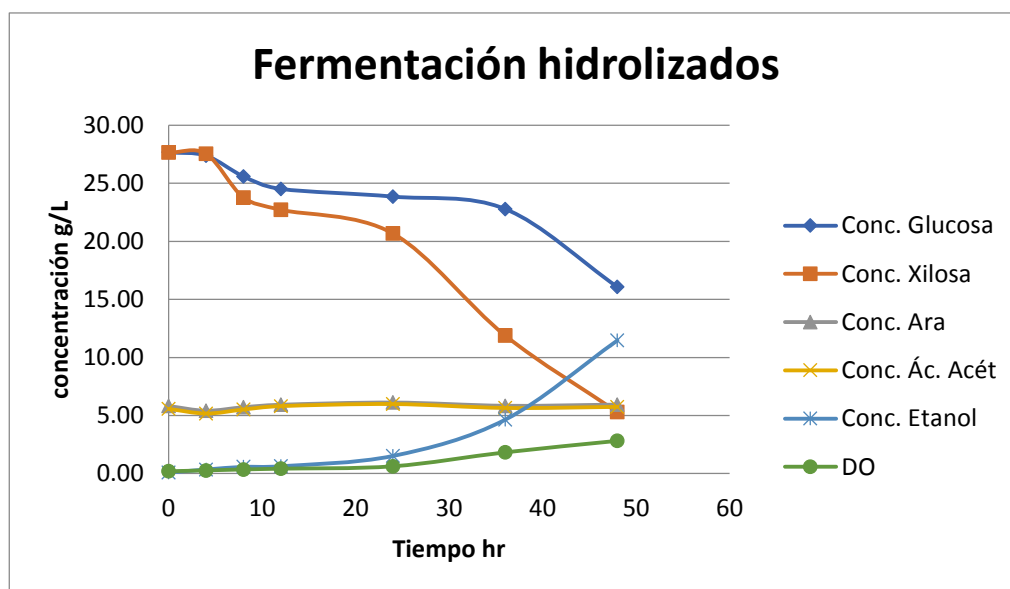


Figura 28: Fermentación de hidrolizados.

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Obteniéndose:

$$Y_{\frac{OH}{Azúcares\ tot}} = 0.336$$

Este resultado indica un rendimiento de fermentación contabilizando el total de azúcares presentes en los hidrolizados, lo que nos indica que solamente el **33.6%** de los azúcares presentes se convirtieron en etanol, lo que nos indica un bajo rendimiento, cabe destacar que también es debido a que se inoculo a baja densidad óptica y por ende las bacterias usaron azúcares para crecer y por eso da un rendimiento bajo, con más tiempo se puede alcanzar un mayor rendimiento ya que las células estén a alta DO y produzcan más etanol.

Basándose en una hectárea (primer corte, 100 toneladas), sabiendo que la planta completa tiene un **74%** de humedad lo que quedaría 21 toneladas (hojas y tallos), el reto espiga, las cuales el **53.11%** son azúcares, lo que se tendría **11.15** toneladas de azúcares fermentables, en este proyecto se obtiene **42.48** L de etanol/tonelada de material, muy por debajo del obtenido por Holguín y col. [28], que es de **114** L de etanol/tonelada.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente trabajo se estudió la factibilidad que tiene la planta de SS para usarse de manera integral como materia prima para la producción de bioetanol, los resultados obtenidos arrojan datos muy favorables en cuanto a la producción de bioetanol, que indican que el 54% del total de azúcares se está convirtiendo a etanol. Sin embargo, es necesario realizar estudios exploratorios de la planta de SS, antes de que empiece a producirse la espiga, ya que es cuando se encuentra la mayor cantidad de azúcares en los tallos, y se pueda llevar a cabo a nivel piloto.

Se obtuvo como punto óptimo una relación de sólidos del 15% peso/peso, ácido sulfúrico al 3.16% peso/peso, un tiempo de exposición en la autoclave de 30 minutos y una temperatura de 130°C. Los resultados muestran que dos variables se mantienen en el nivel superior, lo que indica que se debieron tomar puntos críticos para poder determinar el punto óptimo de las tres variables, lo cual no se hizo debido a los rangos alcanzados por la autoclave.

Cabe destacar que la fermentación de los hidrolizados no se obtuvo un buen rendimiento de etanol (**0.336**), debido a que se inoculó a baja DO, y estas a su vez no crecieron adecuadamente debido a la cantidad de furanos presentes (2 g/L), por ello se inhibieron algunas bacterias. Es necesario dejar la fermentación más tiempo para poder determinar el máximo rendimiento, o hacer una fermentación inoculando a alta DO.

6 PERSPECTIVAS

- Evaluación de la fermentación de hidrolizados con alta densidad óptica para evaluar el máximo rendimiento a etanol con la cepa *E. Coli* MS04.
- Realizar un proceso de destilación, para determinar la cantidad de etanol (Litros) de una hectárea. Actualmente se está investigando mejorar este proceso, así como optimizar la producción etanol anhidro.
- Realizar un estudio económico, para determinar la rentabilidad de este proyecto como alternativa de agro-negocios en México.

7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hernández, Ma. T. (2007). **Tendencias actuales en la producción de bioetanol**. Conferencia TEC Landívar. Ciudad de Guatemala. p. 2-3.
- [2] Serna, F.; Barrera, L & Montiel, H. (2011). **Impacto Social y Económico en el Uso de Biocombustibles**. Journal of Technology Management & Innovation. Puebla, México. p. 102-105.
- [3] Cruz, K. & Lizano, A. C. (2007). **Atlas de la agroenergía y los biocombustibles en las Américas**. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. p. 113-116.
- [4] Castañeda, A. P.; Hernández, I. P. & Rodríguez, F. (2016). **Análisis de la situación actual de los biocombustibles en México: “enfoque CEMIE-BIO”**. Tesis: Centro Mexicano de Innovación en Bioenergía. México. p. 8.
- [5] FAO; (2017). **El estado mundial de la agricultura y la alimentación**. Segunda edición. Roma, Italia.
- [6] <http://www.energiasrenovablesinfo.com/biomasa/tipos-biocombustibles/>
- [7] Sanderson, K. (2012). **Biocombustibles de segunda generación**. Investigación y ciencia. p. 2-4.
- [8] González, A. & Guzmán, A. (2009). **Producción de biocombustibles de tercera generación: extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel**. Memorias del IV Simposio de Química Aplicada. p. 2-3.
- [9] Castro, C.; Beltrán, L. & Ortiz, J. (2012). **Producción de biodiesel y bioetanol: ¿una alternativa sustentable a la crisis energética?**. Revista Ra-Ximhai. p. 97-98.
- [10] <https://ecocosas.com/energias-renovables/ventajas-y-las-desventajas-de-usar-etanol-en-lugar-de-gasolina/>

[11] OCDE/FAO (2017). **OCDE/FAO Perspectivas agrícolas 2017-2026**. Edición OCDE. Paris.

[12] García, A.; Ramírez, F. & Santoscoy, A. (2016). **“SÚPER SORGO: El sorgo dulce como una alternativa rentable para algunas regiones del trópico mexicano”**. Folleto técnico No. 15. México.

[13] SAGARPA (2016). **SUPER SORGO: una alternativa para agronegocios en México**. Folleto SAGARPA. México.

[14] Almodares, A. & Hadi, M. (2009). **Production of bioethanol from sweet sorghum: A review**. African Journal of Agricultural Research. Iran. p. 2-3.

[15] Hernández, C.; Carrillo, E.; Olea, E. & Saldivar, S. (2011). **Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: Tecnologías, avances y áreas de oportunidad**. Revista mexicana de ingeniería química. p. 532-534.

[16] Larrahondo, J. & Villegas, F. (1995). **Control y características de maduración**. CENICAÑA. Colombia.

[17] Montes, N.; Salinas, J.; González, A.; Loredó, R. & Díaz, G. (2010). **Producción de biomasa y azúcares de sorgo dulce [sorghum bicolor (L.) Moench] para la obtención de bioetanol en tamaulipas**. Folleto técnico. p. 12-16.

[18] Cortes, W. (2011). **Materiales lignocelulósicos como fuente de biocombustibles y productos químicos**. Volumen 16. Colombia.

[19] <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-03.php>

[20] Morales, S. (2015). **Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos**. Tesis. Madrid. p. 19-26.

- [21] Aguilar, N. (2010). **Modelo cinético de la hidrólisis del residuo de cosecha cañero**. Tesis. Veracruz, México. p. 8-9.
- [22] García, J. (2008). **Maridaje, enología y cata de vinos**. Primera edición. Málaga.
- [23] Vazquez, H. & Dacosta, O. (2007). **Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas**. SciELO. p. 2-5.
- [24] Mendoza, C. & Enciso B. (2007). **Estandarización de parámetros de operación para obtener bioetanol anhidro por destilación extractiva**. Tesis. Perú. p. 2-7.
- [25] Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. & Crocker, D. (2012). **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. National Renewable Energy Laboratory (NREL). USA.
- [26] Capareda, S. & Imam, T (2012). **Ethanol fermentation from sweet sorghum juice**. ASABE. p. 2-7.
- [27] Yerbes, J. (2011). **HETEROSIS EN CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS CON LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN SORGO DULCE (Sorghum bicolor L. Moench)**. Tesis. Nuevo León. p. 5-47.
- [28] Holguin, J.; Peña, J.; Rios, L. & Peñuela, M. (2017). **Bagazo de sorgo dulce: una alternativa para la producción de etanol de segunda generación en Colombia (Parte I)**. Informador técnico. p. 132-138.