



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



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

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

**“PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DEL
PROCESAMIENTO INTEGRAL DE RESIDUOS
LIGNOCELULÓSICOS DE SORGO DULCE ”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

Claudia Carolina Baltazar Méndez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

CO-ASESOR:

Dra. Alejandra Vargas Tah

Morelia, Mich.

Febrero 2019

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	5
2.1 SORGO DULCE COMO UN CULTIVO ENERGÉTICO	5
2.2 PRETRATAMIENTO DE SORGO DULCE PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES	7
2.3 PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁCTICO	10
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS	14
4.1 OBJETIVO GENERAL	14
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	14
V. HIDRÓLISIS TERMOQUÍMICA H_2SO_4/H_3PO_4 DE SORGO DULCE	15
5.1 METODOLOGÍA	15
5.1.1 CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	15
5.1.2 PRETRATAMIENTO ÁCIDO DILUIDO H_2SO_4/H_3PO_4	17
5.1.3 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	20
5.1.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	20
5.1.5 FERMENTACIÓN	20
5.2 RESULTADOS	22
5.2.1 CARACATERIZACIÓN DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	22
5.2.2 PRETRATAMIENTO ÁCIDO DILUIDO H_2SO_4/H_3PO_4	22
5.2.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	38
5.2.4 FERMENTACIÓN	42
VI. EXPLOSIÓN DE VAPOR	47
6.1 METODOLOGÍA	47
6.1.1 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	47
6.1.2 DETERMINACIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS	48
6.1.3 PRETRATAMIENTO ÁCIDO H_3PO_4 CON EXPLOSIÓN DE VAPOR	48

6.1.4	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	48
6.2	RESULTADOS.....	50
6.2.1	CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	50
6.2.2	PRETRATAMIENTO ÁCIDO H ₃ PO ₄ CON EXPLOSIÓN DE VAPOR	50
6.2.3	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	51
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
VIII.	CONCLUSIONES.....	60
IX.	PERSPECTIVAS.....	61
X.	BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Comparación del sorgo dulce con otros cultivos energéticos.....	6
Tabla 2	Composición de diferentes materias primas para producción de energía ..	7
Tabla 3	Diseño experimental factorial 2 ³ con puntos centrales	18
Tabla 4	Diseño de superficie de respuesta Box-Benhken.....	19
Tabla 5	Medio mineral AM1.....	21
Tabla 6	Resultados de la caracterización del bagazo de sorgo dulce.....	22
Tabla 7	Porcentaje de recuperación y SCF de los tratamientos factoriales	24
Tabla 8	Análisis de varianza del diseño factorial.....	25
Tabla 9	Balance de masa de Diseño de Superficie de Respuesta.....	32
Tabla 10	Análisis de varianza del diseño de superficie de respuesta	33
Tabla 11	Parámetros cinéticos de la fermentación.....	46
Tabla 12	Diseño compuesto rotable.....	49
Tabla 13	Caracterización de sorgo dulce antes y después de la extracción	50
Tabla 14	Resultado del diseño compuesto rotable.....	52
Tabla 15	Análisis de varianza de diseño compuesto rotable.....	52
Tabla 16	Composición del bagazo de sorgo dulce reportada	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de los materiales lignocelulósicos	8
Figura 2 Efecto del pretratamiento en materiales lignocelulósicos	8
Figura 3 Método de síntesis química y bioquímica de ácido láctico	11
Figura 4 Respuestas del diseño factorial	24
Figura 5 Diagrama de Pareto de efecto estandarizado para la xilosa	26
Figura 6 Interacciones para la xilosa	26
Figura 7 Superficie de respuesta estimada para xilosa (Tiempo vs H_3PO_4)	28
Figura 8 Superficie de respuesta estimada para xilosa (Tiempo vs H_2SO_4)	28
Figura 9 Superficie de respuesta estimada para xilosa (H_3PO_4 vs H_2SO_4)	28
Figura 10 Superficie de respuesta estimada para 5-HMF (Tiempo vs H_3PO_4)	29
Figura 11 Superficie de respuesta estimada para 5-HMF (Tiempo vs H_2SO_4)	29
Figura 12 Respuestas del diseño de superficie de respuesta Box-Behnken	31
Figura 13 Interacciones para la xilosa	33
Figura 14 Superficie de respuesta estimada para xilosa (Tiempo vs H_3PO_4)	35
Figura 15 Superficie de respuesta estimada para xilosa (Tiempo vs H_2SO_4)	35
Figura 16 Superficie de respuesta estimada para xilosa (H_3PO_4 vs H_2SO_4)	35
Figura 17 Superficie de respuesta estimada para Furfural (Tiempo vs H_3PO_4)	36
Figura 18 Superficie de respuesta estimada para Furfural (Tiempo vs H_2SO_4)	36
Figura 19 Superficie de respuesta estimada para 5-HMF (Tiempo vs H_2SO_4)	36
Figura 20 Superficie de respuesta estimada para 5-HMF (Tiempo vs H_3PO_4)	37
Figura 21 Resultados de las condiciones óptimas de pretratamiento	38
Figura 22 Cinética de sacarificación enzimática 1	39
Figura 23 Cinética de sacarificación enzimática 2	40
Figura 24 Cinética de sacarificación enzimática 3	41
Figura 25 Fermentación E de hidrolizados de sorgo dulce	43
Figura 26 Fermentación B de hidrolizado sintético	44
Figura 27 Fermentación D de hidrolizados sintético	45
Figura 28 Diagrama de Pareto de efecto estandarizado para la glucosa	53
Figura 29 Diagrama de Pareto de efecto estandarizado para la xilosa	53

Figura 30 Superficie de respuesta estimada para xilosa (carga de sólidos vs carga de hemicelulasas)	54
Figura 31 Superficie de respuesta estimada para glucosa (carga de sólidos vs carga de hemicelulasas)	55

RESUMEN

El presente proyecto investiga la recuperación de azúcares fermentables provenientes de residuos lignocelulósicos de sorgo dulce a través de dos métodos de pretratamiento. En el primero de ellos se empleó una mezcla de H_2SO_4/H_3PO_4 para su posterior sacarificación y producción de ácido láctico. Las condiciones de pretratamiento se optimizaron para la concentración de H_2SO_4 , la concentración de H_3PO_4 y el tiempo de pretratamiento a través de un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken. Las condiciones de pretratamiento óptimas se eligieron para recuperar la mayor concentración de xilosa y al mismo tiempo minimizar la producción de furanos. La máxima recuperación de xilosa de 82.09 %, 21.91 % de glucosa y una concentración de 1.26 g/L de furanos totales se obtuvo después de la hidrólisis del bagazo de sorgo dulce con 1 % (p/p) de H_3PO_4 , 1.96 % (p/p) de H_2SO_4 durante 26.85 min con una carga de sólidos de 15 %. Se produjeron aproximadamente 29.27 g/L de ácido láctico empleando la cepa *E. coli* JU15 a partir de 72.41 g/L de azúcares generados a partir de la hidrólisis enzimática en la cual se logró recuperar 70.71% de la glucosa empleando una carga enzimática de 6% (p/p) (Cellic CTec-3 Novozymes)/ gramo glucano y 1% (p/p) (Cellic HTec-3 Novozymes)/gramo glucano a 50°C, 150 rpm por 48 h.

El segundo método de pretratamiento se realizó con impregnación de H_3PO_4 al 0.5 % (p/p) y una posterior explosión de vapor a 200 °C por 5 min, lo cual logró una recuperación de 52.25 % de xilosa y 31.81 % de la glucosa sin producción de furanos. A través del estudio de la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico de sorgo dulce con un diseño experimental compuesto rotatable, se logró la recuperación de 78.75 % de la glucosa empleando una carga de sólidos de 5 % (p/v) y una carga de hemicelulasas (Cellic HTec-2 Novozymes) de 100 UI/ g de sólido seco. La máxima recuperación de xilosa de 94.06% se obtuvo al emplear una carga de sólidos de 12.5 % (p/v) y una carga de hemicelulasas (Cellic HTec-2 Novozymes) de 200 UI/ g de sólido seco.

Palabras clave: Pretratamiento, ácido, sacarificación, fermentación, hidrólisis.

ABSTRACT

This project investigates the recovery of fermentable sugars from lignocellulosic residues of sweet sorghum through two pretreatment methods. In the first one, a mixture of H_2SO_4 / H_3PO_4 was used for its subsequent saccharification and production of lactic acid. The pretreatment conditions were optimized for the H_2SO_4 concentration, the H_3PO_4 concentration and the pretreatment time through a Box-Behnken response surface design. The optimal pretreatment conditions were chosen to recover the highest concentration of xylose and at the same time minimize the production of furans. The maximum recovery of xylose of 82.09%, 21.91% of glucose and a concentration of 1.26 g/L of total furans was obtained after the hydrolysis of sweet sorghum bagasse with 1% (w/w) of H_3PO_4 , 1.96% (w/w) of H_2SO_4 for 26.85 min with a solids loading of 15 %. Approximately 29.27 g/L of lactic acid was produced using the *E. coli* JU15 strain from 72.41 g/L of sugars generated from the enzymatic hydrolysis in which 70.71 % of the glucose was recovered using an enzyme load of 6 % (w/w) (Cellic CTec-3 Novozymes) / gram of glucan and 1% (w/w) (Cellic HTec-3 Novozymes) / gram of glucan at 50 ° C, 150 rpm for 48 h.

The second pretreatment method was performed with impregnation of H_3PO_4 at 0.5% (w/w) and a subsequent explosion of steam at 200 ° C for 5 min, which achieved a recovery of 52.25 % of xylose and 31.81 % of glucose without furan production. Through the study of the enzymatic hydrolysis of the lignocellulosic material of sweet sorghum with a rotatable composite experimental design, 78.75 % of the glucose was recovered using a solids load of 5 % (w/v) and a hemicellulase load (Cellic HTec-2 Novozymes) of 100 IU / g dry solid. The maximum recovery of xylose of 94.06 % was obtained by using a charge of solids of 12.5 % (w/v) and a load of hemicellulases (Cellic HTec-2 Novozymes) of 200 IU / g of dry solid.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la sobrepoblación y el desmedido crecimiento mundial han provocado un aumento en la demanda de productos y servicios. Gran parte de la energía y derivados a químicos son producidos partir del petróleo, siendo éste un recurso no renovable que ha ido en declive debido a su sobreexplotación. Es por esto que actualmente el interés por el aprovechamiento de la biomasa ha aumentado, ya que es una fuente renovable de materia orgánica que puede ser transformada por métodos químicos y biológicos en productos de interés, disminuyendo así la dependencia por los derivados fósiles y aumentando la generación de energías alternativas.

El aprovechamiento de algunos cultivos para este fin ha generado controversia relacionada con la seguridad alimentaria, especialmente el uso del maíz para la producción de bioetanol, el cual por sí solo no puede satisfacer el objetivo de países como Estados Unidos de América, donde se ha establecido un objetivo de 36 mil millones de galones de biocombustible para el año 2022 (Serna-Saldívar *et al.*, 2012), debido a esto se ha aumentado la búsqueda de nuevos cultivos energéticos que permitan satisfacer la demanda mundial de energía y otros servicios, así como reducir costos

En este contexto, los residuos agroindustriales como es la biomasa lignocelulósica, representan una buena alternativa para su uso como materia prima. El sorgo dulce (*Sorghum bicolor Moench*) ha surgido como un cultivo prometedor, ya que posee ventajas sobre otros cultivos similares, como una alta eficiencia fotosintética, alta producción de biomasa y azúcares, además es altamente resistente a factores bióticos y abióticos como insectos, sequía, salinidad y alcalinidad del suelo (Prasad *et al.*, 2007). Es por esto que el residuo lignocelulósico de este cultivo es ideal para la producción de biocombustibles y productos químicos.

El aprovechamiento integral de este tipo de cultivos requiere la hidrólisis de los carbohidratos estructurales en azúcares simples. Para ello es necesario emplear un método de pretratamiento que permita aumentar la accesibilidad de la celulosa a la degradación enzimática. Existen diversos métodos de pretratamiento reportados, cada uno de ellos con un efecto diferente sobre la biomasa, por lo cual es necesaria la búsqueda de un método y condiciones de pretratamiento adecuadas para cada tipo de materia prima, que permitan la máxima recuperación de azúcares (Galbe & Zacchi, 2007).

Aunado a esto, es necesario el uso de microorganismos capaces de metabolizar tanto las hexosas como las pentosas recuperadas de la hidrólisis del material ya

que la mayoría de los microorganismos son incapaces de metabolizar las pentosas provenientes de la hidrólisis de la fracción hemicelulósica de la biomasa. Además, la mayoría de los hidrolizados lignocelulósicos contienen compuestos tóxicos, debido a la degradación de los azúcares, como el furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético y compuestos fenólicos que inhiben el crecimiento de los microorganismos en la etapa de fermentación (Martinez *et al.*, 2001).

En este sentido, se han realizado esfuerzos por desarrollar nuevos microorganismos modificados genéticamente que permitan mejorar los rendimientos en la fermentación de azúcares para la producción de etanol y otros compuestos de interés. Tal es el caso de *E. coli* JU15, que a diferencia de otros microorganismos es una bacteria capaz de metabolizar tanto hexosas como pentosas, así como una alta resistencia a los compuestos tóxicos, para producir ácido láctico con un buen rendimiento (Martinez *et al.*, 2017a).

Si bien existen diversos estudios sobre métodos de pretratamiento de bagazo de sorgo dulce, la mayoría de estos resultan costosos y generan una alta concentración de compuestos de degradación debido a que utilizan altas temperaturas en el proceso. En este estudio se describe la aplicación y comparación de dos métodos de pretratamiento de bagazo sorgo dulce con el objetivo de recuperar la máxima cantidad de azúcares y la mínima producción de compuestos de degradación. El primero de ellos, un tratamiento termoquímico empleando una mezcla de H_2SO_4/H_3PO_4 empleando una baja temperatura y el segundo de ellos, utilizando steam explosión con impregnación de H_3PO_4 . Así mismo se presenta la utilización del hidrolizado proveniente del pretratamiento termoquímico empleando una mezcla de H_2SO_4/H_3PO_4 y posteriormente hidrolizado enzimáticamente para la fermentación láctica empleando *E. coli* JU15.

II. ANTECEDENTES

2.1 SORGO DULCE COMO UN CULTIVO ENERGÉTICO

El sorgo es el quinto cereal con mayor producción a nivel mundial después del trigo, arroz, maíz y cebada. Se cultiva principalmente en los trópicos semiáridos del mundo siendo India el mayor productor de sorgo en el mundo, seguido por Nigeria, Sudán, Estados Unidos y México (FAOSTAT, 2017). El sorgo puede clasificarse como dulce, grano y forrajero (Almodares *et al.*, 2008) y dependiendo de las características ha sido utilizado como un cultivo multipropósito principalmente para la producción de azúcar, alcohol, jarabe, forraje, papel etc. El sorgo dulce es similar al sorgo grano, sin embargo el sorgo dulce crece rápidamente por lo que produce una mayor cantidad de biomasa y tiene una mejor adaptabilidad (Reddy *et al.*, 2005). Además el sorgo dulce tiene un mayor contenido de azúcares en sus tallos (10-18% Brix) en comparación con el sorgo grano (9-11% Brix) (Srinivasa *et al.*, 2009).

Existen diversos cultivos con potencial para su uso en la biorefinería, algunos de los más utilizados para este propósito han sido la caña de azúcar, rastrojo de maíz, paja de trigo, paja de cebada etc. Uno de los cultivos que ha ganado interés para este fin es el sorgo dulce, el cual es un cultivo que contiene un alto contenido de azúcares almacenados principalmente en sus tallos y posee ventajas sobre otros cultivos similares como lo muestra la Tabla 1 (Umakanth *et al.*, 2019). El sorgo dulce es un cultivo C4 con una alta eficiencia fotosintética, es resistente a factores bióticos y abióticos como insectos, sequía, salinidad, alcalinidad de suelo que además se adapta a diferentes tipos de ecosistemas (Tesso *et al.*, 2005). Además tiene bajo requerimiento de agua de 8000 m³/ha, un tercio con respecto a la caña de azúcar y del 80 al 90% en comparación con el maíz (Almodares *et al.*, 2007; Almodares *et al.*, 2008).

Tabla 1 Comparación del sorgo dulce con otros cultivos energéticos

Características	Caña de azúcar	Remolacha azucarera	Maíz	Sorgo Dulce
Cosecha	12-14 meses	5-6 meses	3-4 meses	4 meses
Temporada de crecimiento	Una temporada	Una temporada	Todas las temporadas	Todas las temporadas (dependiendo de la disponibilidad de agua)
Requerimiento de agua (m ³ /ha)	36,000	18,500	12,000	8000
Requerimiento de fertilizante (kg/ha)	250-400 125 N 125 P	120 60 N 60 P	120 60 N 60 P	80-90 40 N
Rendimiento (t/ha)	65-80 (tallo)	85-100	5-10 (grano)	40-55 un ciclo/año (tallo)
Contenido de azúcar en base seca (%)	10-12	15-18	n/a	7-12
Rendimiento de azúcar (t/ha)	5-12	11-18	n/a	4-6 un ciclo/año
Rendimiento de etanol de jugo/grano (L/ha)	4350-7000	7100-10500	2150-4300	2000-3500 un ciclo/año
Cosecha	Mecánica	Mecánica	Mecánica	Manual y mecánica

El bagazo de sorgo dulce es la fracción residual obtenida después de la extracción del jugo. La composición de esta fracción ha sido ampliamente reportada y puede variar según factores intrínsecos y extrínsecos como el tipo de cultivo, el grado de madurez y las condiciones climáticas. El bagazo de sorgo dulce está compuesto por 34-44% celulosa, 27-25 % hemicelulosa y 18-20% lignina aproximadamente (Ballesteros *et al.*, 2003; Kim y Day, 2011; Sipos *et al.*, 2009).

La Tabla 2 (Serna-Saldívar *et al.*, 2012) muestra una comparación entre la composición química del bagazo de sorgo dulce y otros cultivos dedicados a la producción de energía, todos los datos se expresan en base seca.

Tabla 2 Composición de diferentes materias primas para producción de energía

Materia prima	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Bagazo de sorgo dulce	41.3	24.6	14
Caña de azúcar	41.6	25.1	20.3
Rastrojo de maíz	40	28	21
Paja de trigo	38	32	19
Paja de arroz	36	28	14

2.2 PRETRATAMIENTO DE SORGO DULCE PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES

Como se muestran en la Figura 1 (Rubin, 2008), la biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente por celulosa (40-50%), la cual está constituida por moléculas de glucosa unidas por enlace β (1-4) glucosídicos, la hemicelulosa (25-35%), la cual es un heteropolímero compuesto por hexosas, pentosas y ácidos urónicos, y lignina (15-20%), la cual es un polímero aromático constituido por compuestos metoxifenólicos (Ingram *et al.*, 1999; Saha, 2003; Gray *et al.*, 2006).

Los azúcares contenidos en este tipo de materiales pueden ser recuperados para su aprovechamiento. Sin embargo la mayoría de los microorganismos son incapaces de degradar la lignocelulosa directamente por lo que un método de pretratamiento es necesario. El método más empleado para la hidrólisis de la celulosa a glucosa es mediante el uso de enzimas celulasas, no obstante es preciso aumentar la accesibilidad de éstas a la celulosa, lo cual es el objetivo principal del tratamiento previo, como lo muestra la Figura 2 (Sokan-Adeaga *et al.*, 2016). Un gran número de pretratamientos han sido reportados, los cuales se pueden dividir en cuatro grupos: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos (Zhao *et al.*, 2012). Cada pretratamiento tiene un efecto diferente sobre cada tipo de biomasa dependiendo de las características físicas y químicas del material, debido a esto es necesario elegir el pretratamiento más adecuado dependiendo del tipo de biomasa.

Figura 1 Estructura de los materiales lignocelulósicos

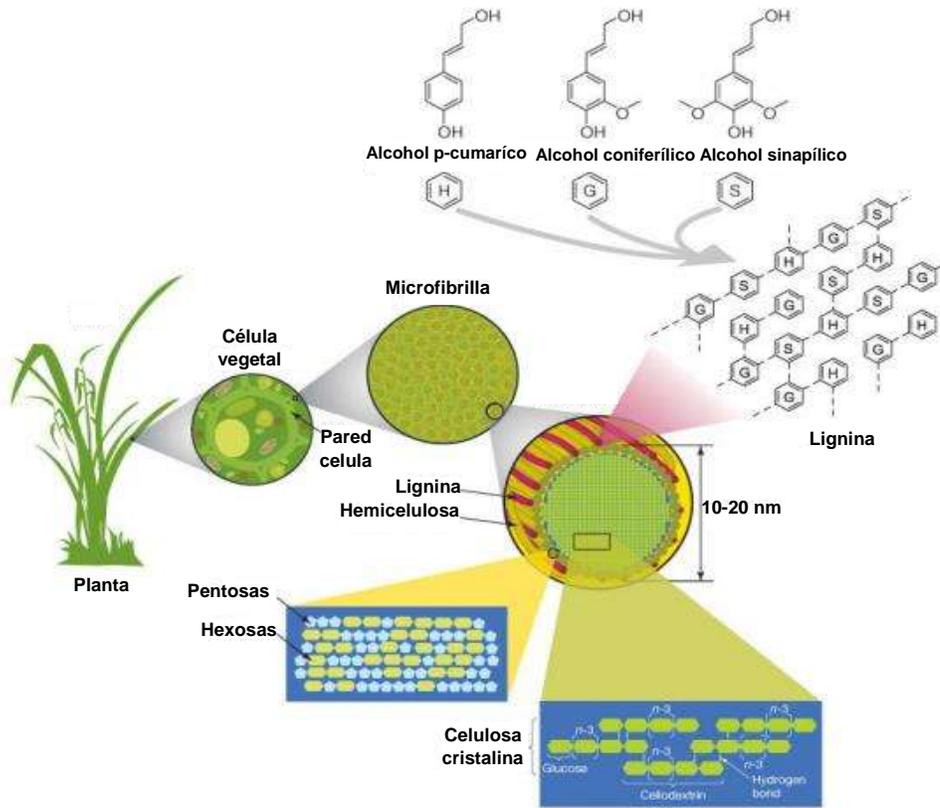
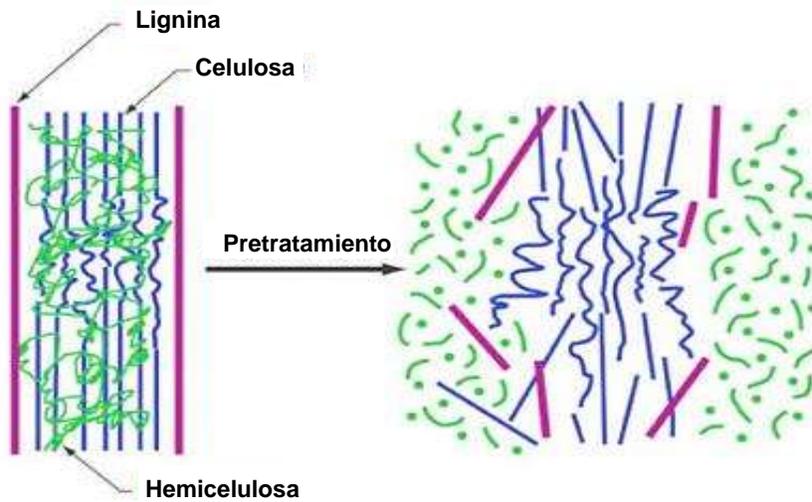


Figura 2 Efecto del pretratamiento en materiales lignocelulósicos



De los diferentes métodos de pretratamiento el ácido diluido es uno de los más empleados ya que se ha comprobado que remueve eficientemente la hemicelulosa. Este método rompe los enlaces de hidrógeno de la fracción hemicelulósica y una pequeña fracción de la celulosa y lignina soluble, liberando así las pentosas y hexosas presentes. Uno de los problemas a los cuales se enfrenta este método es que dependiendo que tan severas sean las condiciones de pretratamiento, los azúcares pueden degradarse, las pentosas hacia furfural y las hexosas hacia 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), los cuales junto con los ácidos orgánicos y compuestos fenólicos son inhibidores de los microorganismos presentes en la fermentación de los azúcares (Klinke *et al.*, 2004).

El H_2SO_4 es uno de los catalizadores más usados ya que resulta muy eficiente en la hidrólisis de la hemicelulosa. En este sentido Banerji *et al.*, 2013, estudiaron la hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce en donde probaron diferentes concentraciones de H_2SO_4 a diferentes tiempos y temperaturas y encontraron que con una carga de sólido de 10 % (p/p), la mayor concentración de pentosas (27.2 g/L) se obtuvo con 2 % (p/p) de H_2SO_4 , 90 min y 120°C, y la mayor concentración de hexosas (12.6 g/L) se obtuvo a una concentración de 5% (p/p) de H_2SO_4 , 90 min y 121°C. Sin embargo se obtuvieron altas concentraciones de ácido acético (3.1-3.4 g/L) proveniente de los azúcares acetilados de la hemicelulosa, lo mismo para el ácido levulínico (2.95 g/L) y fórmico (1.75 g/L), por su parte el furfural se mantuvo en concentraciones bajas de 1.1 g/L.

Sin embargo existen otros ácidos como el H_3PO_4 el cual su uso podría resultar ventajoso, por una parte ya que los residuos de fósforo pueden ser usados como fertilizante, por otro lado el fósforo es un nutriente esencial en diversos medios de fermentación. Además el H_3PO_4 es menos agresivo que el H_2SO_4 por lo que ayuda a reducir las concentraciones de compuestos de degradación como el furfural y 5-HMF (Romero *et al.*, 2007). Por lo que existen algunos estudios en los cuales se ha reportado el uso del H_3PO_4 , como es el caso del estudio realizado por Avci *et al.*, 2013 en el cual se optimizó el pretratamiento ácido diluido del rastrojo de maíz empleando H_3PO_4 , en este trabajo se probaron concentraciones de H_3PO_4 de 0-2 % (v/v) para una carga de sólidos del 10 % (p/p) a diferentes tiempos y temperaturas. Los resultados indicaron que el mayor rendimiento de glucosa del 85% se obtuvo después de la hidrólisis enzimática del rastrojo pretratado con 0.5 % (v/v) de H_3PO_4 , 180 °C durante 15 min. Por su parte, el mayor rendimiento de xilosa de 91.4 se observó a partir del pretratamiento con 1% (v/v) de H_3PO_4 a 160°C durante 10 min. Las condiciones de pretratamiento optimizadas resultaron ser 0.78 % (v/v) de H_3PO_4 , 161.81°C y 9.78 min, bajo las cuales se lograron obtener 55 g de azúcares totales con una concentración de 0.4 g de furfural y 0.1 g de 5-HMF.

Asimismo mezclas de ácidos pueden ser empleadas, sin embargo no existen muchos estudios sobre esto. Tal es el caso de Heredia-Olea *et al.*, 2012 quienes evaluaron el efecto del pretratamiento del bagazo de sorgo dulce ácido empleando

H₂SO₄, HCl y una mezcla de estos ácidos. Mediante un diseño experimental se probaron diferentes cargas de sólidos, concentraciones de ácido y tiempo. De este experimento concluyeron que la concentración de ácido sulfúrico y el tiempo de hidrólisis son los factores que más influyen en la degradación de azúcares y que a mayor tiempo de hidrólisis aumenta la concentración de inhibidores. La mezcla de los ácidos produjo la menor cantidad de inhibidores y mantuvo la liberación de azúcares fermentables respecto a los tratamientos individuales.

Otro tipo de pretratamientos como la explosión de vapor son métodos que pueden usarse para obtener altos rendimientos de azúcares. Un ejemplo de ellos es el estudio realizado por Castro *et al.*, 2017 en el cual se combinó un pretratamiento ácido con H₃PO₄ al 0.5% (p/p) y una explosión de vapor a 190°C por 5 min. Los resultados mostraron que el pretratamiento causó una disminución de la hemicelulosa, ya que el 55% de la xilosa fue recuperada en la fracción líquida y solo un 8% de la glucosa inicial fue recuperada. Por su parte, el ácido acético fue el inhibidor con mayor concentración (3.6 g/L) seguido por el furfural (1.28-1.47 g/L) y pequeñas concentraciones de 5-HMF y ácido fórmico.

Una vez que se ha realizado el pretratamiento del material, la celulosa queda expuesta a la degradación enzimática. La dosis enzimática es fundamental para lograr el máximo rendimiento de azúcar por gramo de enzima y está se determina según las propiedades de cada materia prima así como en el tratamiento previo empleado. Otro factor importante en esta etapa del proceso es la concentración de sólidos insolubles en agua (WIS) debido a la inhibición enzimática y los problemas relacionados con el transporte de masa debido a la viscosidad del material (Linde *et al.*, 2007).

Hoy en día la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos es un cuello de botella en la producción de bioetanol ya que tiene un gran impacto sobre los costos del proceso (Pengilly *et al.*, 2015). Es por esto que la optimización de la hidrólisis enzimática es de gran importancia para obtener buenos rendimientos en el producto final.

2.3 PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO LÁCTICO

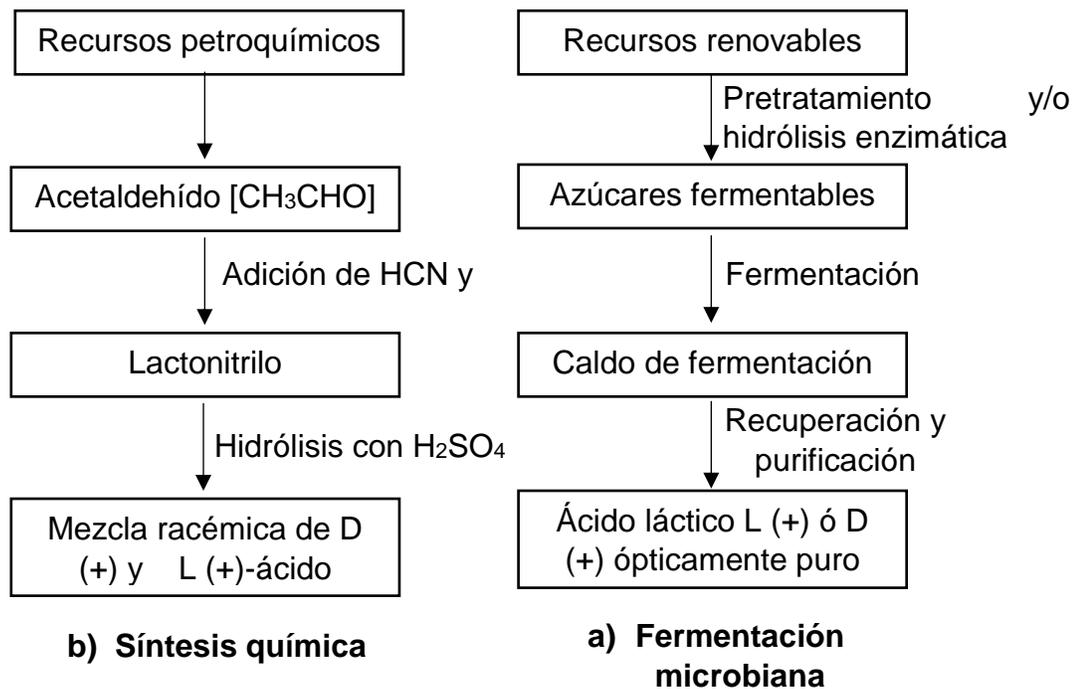
Los procesos biotecnológicos para la obtención de productos químicos renovables han recibido una importancia significativa debido a las preocupaciones ambientales ya que son procesos sustentables que ofrecen una alternativa a la contaminación causada por la industria petroquímica.

La producción biotecnológica de ácido láctico ha generado interés ya que es un ácido orgánico [CH₃CH(OH)CO₂H] con diversas aplicaciones en la industria como acidulante, conservador, en la industria farmacéutica, cosmética, del cuero y textil y ha recibido especial atención por su uso como monómero para la producción del biopolímero polilactato (PLA) que representa una alternativa prometedora,

biodegradable y ecológica a los plásticos derivados de los productos petroquímicos (Wee *et al.*, 2006; Abdel-Rahman *et al.*, 2011). Sin embargo, la producción de este biopolímero requiere el uso de ácido láctico ópticamente puro, ya que la polimerización de ácido láctico ópticamente puro produce PLA altamente cristalino lo cual mejora sus propiedades físicas como su termoestabilidad, no obstante el uso de la mezcla racémica de ácido láctico en la producción de PLA da como resultado una estructura amorfa que no es ideal para su uso comercial (Henton *et al.*, 2005). Ambas formas ópticas, D-ácido láctico y L-ácido láctico, pueden emplearse para la fabricación de PLA, pero la producción de un isómero ópticamente puro es un objetivo importante (Okano *et al.*, 2010).

El ácido láctico se puede producir por métodos químicos o bioquímicos como se muestra en la Figura 3 (Wee *et al.*, 2006). La síntesis química del ácido láctico se basa principalmente en la hidrólisis de lactonitrilo por ácidos fuertes, produciendo una mezcla racémica de los 2 isómeros (John *et al.*, 2009). Por su parte la síntesis bioquímica se basa en la fermentación de sustratos ricos en azúcares empleando microorganismos y produciéndose así ácido láctico ópticamente puro [D (+) ó L (+)] dependiendo del microorganismo usado. Algunas otras ventajas de la síntesis bioquímica sobre la síntesis química son: consumo menor de energía, menores temperaturas, mayor pureza, uso de materia prima de bajo costo, amigable con el ambiente (Martinez *et al.*, 2017b).

Figura 3 Método de síntesis química y bioquímica de ácido láctico



Gracias a sus diversas aplicaciones, la producción de ácido láctico ha ido en constante aumento, la demanda mundial de ácido láctico fue de 1,220,000 toneladas en 2016 y se espera un aumento del 16.2% entre 2017 y 2025 según lo reportado por Gran View Research Inc, 2017. Por lo que, los esfuerzos de la investigación en la producción de ácido láctico están dirigidos a la disminución de los costos de producción a través del uso de sustratos renovables, nuevas tecnologías de fermentación, así como la ingeniería genética de nuevos microorganismos capaces de alcanzar altos rendimientos en la producción de éste.

En este sentido, la mayor parte de las investigaciones para la producción de ácido láctico se han realizado con bacterias ácido lácticas (BAL). Las BAL homofermentativas metaboliza la glucosa a través de la vía de Embden-Meyerhof (glucólisis). Debido a que esta ruta produce ácido láctico como producto principal se producen dos moléculas de ácido láctico por cada molécula de glucosa, obteniendo así rendimientos altos en la producción de ácido láctico. Las bacterias heterofermentativas por su parte catabolizan la glucosa en etanol, CO₂ y ácido láctico (Wee *et al.* 2006). Algunas de las desventajas de la producción de ácido láctico mediante BAL son que generalmente tienen necesidades nutricionales complejas, ya que tienen una limitada capacidad de sintetizar nutrientes necesarios para su crecimiento como lo son vitamina B y aminoácidos. Dentro de los requerimientos nutrimentales para el crecimiento de este tipo de bacterias podemos encontrar el carbono, nitrógeno, aminoácidos, vitaminas y minerales (Van Niel y Hahn-Hägerdal, 1999; Amrane, 2000). Además la mayoría de las BAL son incapaces de usar la xilosa presente en los hidrolizados de lignocelulosa como fuente de carbono.

A diferencia de las BAL, *E. coli* es capaz de metabolizar la xilosa en condiciones fermentativas para producir diversos productos como lo es el D (+)-ácido láctico (D-AL) con menores requerimientos nutrimentales y con rendimientos similares a los alcanzados por las BAL (90% del rendimiento teórico máximo) (Utrilla *et al.*, 2012), esta ventaja se puede usar en el aprovechamiento de hidrolizados lignocelulósicos que son ricos en hexosas y pentosas.

Algunas cepas de *E. coli* capaces de metabolizar hexosas y pentosas han sido desarrolladas para la producción de ácido láctico, como la *E. coli* FBR11 (Dien *et al.*, 2001), *E. coli* SZ85 (Zhou *et al.*, 2003) y FBR19 (Dien *et al.*, 2002). Sin embargo a pesar de que estas cepas podían consumir ambos azúcares presentaban baja productividad y rendimiento debido a la represión catabólica.

Para mejorar el transporte de xilosa, Utrilla *et al.*, 2012 desarrollaron *E. coli* JU15, la cual es una cepa homoláctica en la que se eliminó el principal sistema de transporte de xilosa xylFGH, se evaluó en medio mineral y se sometió a un proceso de evolución adaptativa en diferentes concentraciones de xilosa (40 y 120 g/L). El genoma de la cepa evolucionada y seleccionada (JU15) fue secuenciado,

lo que reveló el gen *gatC* (transportador de galactitol) como transportador de xilosa y una mutación en la proteína GatC que mejoraba el consumo de xilosa sin consumo de ATP, por lo que esta cepa es capaz de convertir xilosa en D-AL con alta productividad (0.8 g D-AL / L*h) y rendimiento (0.95 g D-AL / g xilosa). Además esta cepa es capaz de tolerar hasta 10 g/L de ácido acético sin disminuir su tasa de crecimiento (Fernández-Sandolval *et al.*, 2012).

Conjuntamente *E. coli*. JU15 fue probada para producir ácido láctico a partir de hidrolizado ácido diluido de bagazo de caña de azúcar previamente detoxificado, los resultados mostraron que a partir de 70 g/L de azúcares (xilosa, glucosa y arabinosa) se logró una productividad de 0.98 g/L de D-AL y un rendimiento aparente de 1.11 g D-AL/ g de azúcares basado solo en el consumo de xilosa, glucosa y arabinosa por lo que otros azúcares no cuantificados representan el rendimiento por encima del máximo teórico (Utrilla *et al.*, 2016).

III. HIPÓTESIS

A partir del pretratamiento ácido y posterior sacarificación del material lignocelulósico de sorgo dulce se obtendrá un hidrolizado rico en pentosas y hexosas con bajo contenido de furanos, que al ser fermentado, no inhibirá el metabolismo de *E. coli* JU15 produciéndose ácido láctico con un buen rendimiento.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Producir ácido láctico a partir de hidrolizados de bagazo de sorgo dulce sin detoxificación empleando *E. coli* JU15.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el material lignocelulósico de sorgo dulce para determinar su composición.
- Mediante un diseño experimental, encontrar las mejores condiciones de pretratamiento ácido empleando una mezcla H_2SO_4/H_3PO_4 para maximizar la recuperación de los azúcares de la fracción hemicelulósica del material lignocelulósico de sorgo dulce con bajo contenido de furanos.
- Sacarificar en forma secuencial, el material resultante del pretratamiento empleando una mezcla H_2SO_4/H_3PO_4 , con una elevada conversión de la celulosa a glucosa.
- Fermentar los jarabes ricos en azúcares recuperados del pretratamiento empleando una mezcla H_2SO_4/H_3PO_4 y sacarificación secuencial del material lignocelulósico de sorgo dulce, empleando *E. coli* JU15 para producir ácido láctico.
- Probar el pretratamiento del material lignocelulósico de sorgo dulce empleando explosión de vapor con impregnación de H_3PO_4 .
- Estudiar la hidrólisis enzimática del material pretratado con explosión de vapor mediante un diseño experimental para determinar la carga enzimática y de sólido que permita recuperar la mayor cantidad de azúcares totales.
- Realizar un comparativo de los dos métodos de pretratamiento empleados y determinar cuál de ellos resulta más eficiente en la recuperación de azúcares totales.

V. HIDRÓLISIS TERMOQUÍMICA H_2SO_4/H_3PO_4 DE SORGO DULCE

5.1 METODOLOGÍA

5.1.1 CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

El sorgo dulce empleado en este estudio es proveniente de Monterrey, Nuevo León, el cual, una vez recibido, fue procesado separando los tallos y las hojas. Posteriormente, se prensaron los tallos para extraer los jugos. El residuo lignocelulósico de los tallos y la hoja se secó aproximadamente tres días al sol. El material, fue molido y tamizado usando tamices con número de malla 20-80. Se separó la fracción del material retenida entre las mallas 40-80, la cual fue usada para realizar la experimentación.

La caracterización del residuo lignocelulósico de sorgo dulce se realizó siguiendo las técnicas del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL) para la determinación de cenizas (Sluiter *et al.*, 2008c), carbohidratos estructurales y lignina en la biomasa (Sluiter *et al.*, 2008a). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.1.1.1 Determinación de sólidos totales:

- Se colocaron 3 charolas de aluminio a peso constante durante 24 horas a $105\pm 3^\circ\text{C}$ en la mufla. Las charolas fueron colocadas en un desecador y se procedió a registrar el peso de cada una.
- Posteriormente se pesaron 2 g de material en las charolas y se dejaron secar en horno a $105\pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas. Transcurrido el tiempo, fueron llevadas a un desecador y se procedió a registrar el peso de cada una.
- La determinación de sólidos totales se realizó por diferencia de peso de acuerdo a las Ecuaciones 1 y 2:

$$\% \text{ Sólidos totales} = \frac{(\text{Peso de charola + muestra seca} - \text{Peso de charola seca})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \% \text{ Sólidos totales} \quad (2)$$

5.1.1.2 Determinación de carbohidratos estructurales y lignina:

- Se colocaron a peso constante frascos de 250 ml a $105\pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas, transcurrido este tiempo se procedió a registrar su peso.
- Se pesaron 0.3 g de muestra libre de humedad en tubos de ensaye con tapas, se agregó 3 ml de H_2SO_4 al 72 % (p/p) y se llevaron a baño maría a 30°C por 1 h agitando cada 5 minutos en vortex.

- c) Pasado este tiempo, se transfirió el contenido de los tubos a los frascos de 250 ml y se llevaron a 87 g con agua destilada con el fin de diluir el ácido sulfúrico al 4%.
- d) Se llevaron los frascos a la autoclave a 121°C por 1 h. Transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar, se volvió a registrar el peso de los frascos y se ajustó el peso con agua destilada si hubo algún cambio.
- e) En papel filtro, previamente puestos a peso constante a 105±3°C por 24 horas y registrado su peso, se filtró el contenido de los frascos.
- f) Se recuperó el líquido y se procedió a lavar con agua destilada los sólidos retenidos en el papel filtro.
- g) Se llevó a secar y mantener a peso constante el sólido retenido en el papel filtro a 105±3°C por 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se registró el peso y se determinó el porcentaje de lignina insoluble de acuerdo con las Ecuaciones 3 y 4, en donde ODW por sus siglas en inglés Oven Dry Weight, representa el peso de la muestra corregido matemáticamente por la cantidad de humedad presente.

$$\% \text{ Lignina insoluble} = \frac{(\text{Peso de papel} + \text{muestra seca} - \text{Peso de papel seco})}{\text{ODW}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{ODW} = \frac{\text{Peso de muestra} \times \% \text{ Sólidos totales}}{100} \quad (4)$$

- h) Con el líquido recuperado se determinó el porcentaje de lignina soluble en espectrofotómetro a una longitud de onda de 240 nm. Se registró la absorbancia a esa longitud de onda para cada una de las muestras y se calculó el porcentaje de lignina soluble de acuerdo con la Ecuación 5:

$$\% \text{ Lignina soluble} = \frac{\text{UVabs} \times \text{volumen de filtrado} \times \text{dilución}}{\epsilon \times \text{ODW} \times \text{longitud de la celda}} \quad (5)$$

- i) Aproximadamente 3 ml del líquido recuperado se neutralizaron con CaCO₃ hasta un pH de 4 y posteriormente se filtraron utilizando un filtro con tamaño de poro de 2 µm para la cuantificación de carbohidratos estructurales en HPLC.
- j) Se calculó el porcentaje de glucanos, xilanos, arabinanos y acetatos de acuerdo con las Ecuaciones 6 a 9:

$$\% \text{ Glucanos} = \frac{\text{Glucosa} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \times \left(\frac{162}{180} \right) \times 86.73 \times \left(\frac{1}{1000} \right)}{\text{ODW}} \times 100 \quad (6)$$

$$\% \text{ Xilanos} = \frac{\text{Xilosa} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) * \left(\frac{132}{150}\right) * 86.73 * \left(\frac{1}{1000}\right)}{\text{ODW}} * 100 \quad (7)$$

$$\% \text{ Arabinanos} = \frac{\text{Arabionosa} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) * \left(\frac{132}{150}\right) * 86.73 * \left(\frac{1}{1000}\right)}{\text{ODW}} * 100 \quad (8)$$

$$\% \text{ Acetatos} = \frac{\text{Ácido acético} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) * \left(\frac{59}{60}\right) * 86.73 * \left(\frac{1}{1000}\right)}{\text{ODW}} * 100 \quad (9)$$

5.1.1.3 Determinación de cenizas:

- a) Se pusieron a peso constante 3 crisoles a 575 ± 25 °C durante 24 horas en una mufla. Pasado este tiempo, se dejó enfriar los crisoles hasta 150 °C, posteriormente se llevaron a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se registró su peso.
- b) Se pesó 1 g de muestra en los crisoles y se colocaron en la mufla a a 575 ± 25 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se dejó enfriar los crisoles hasta 150 °C, posteriormente se llevaron a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y se registró su peso.
- c) Se calculó el porcentaje de cenizas por diferencia de peso de acuerdo con la Ecuación 10:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso de crisol} + \text{cenizas} - \text{Peso de crisol}}{\text{ODW}} * 100 \quad (10)$$

5.1.2 PRETRATAMIENTO ÁCIDO DILUIDO H₂SO₄/H₃PO₄

Se realizó un diseño experimental factorial 2³ con puntos centrales con ayuda del software Statgraphics Centurion XVI, este experimento se realizó a modo de diseño exploratorio, en él se evaluó el efecto de tres factores: temperatura, % H₂SO₄ y % H₃PO₄, sobre las variables de respuesta: concentración de glucosa, xilosa, furfural y 5-HMF. En la Tabla 3 se muestran los factores seleccionados y su intervalo de estudio, así como los tratamientos del diseño experimental, el cual consta de 8 experimentos factoriales y 5 réplicas de punto central.

Tabla 3 Diseño experimental factorial 2³ con puntos centrales

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
Tiempo (min)	10	20	30
H ₃ PO ₄ (%)	0	0.5	1
H ₂ SO ₄ (%)	1	2	3
Experimento	Tiempo (min)	% H ₃ PO ₄ (p/p)	% H ₂ SO ₄ (p/p)
1	20	0.5	1
2	20	0.5	1
3	30	1	1.5
4	20	0.5	1
5	30	0	1
6	20	0.5	1
7	30	0	3
8	30	1	0.5
9	20	0.5	1
10	10	1	0.5
11	10	1	1.5
12	10	0	1
13	10	0	3

Una vez definido el diseño, se realizaron los tratamientos de acuerdo a la siguiente metodología:

- a) Se mantuvo la carga de sólidos constante en 15% en todos los experimentos por lo que se pesó 4.5 g de material que posteriormente fue trasferido a frascos Schott de 250 ml.
- b) Se pesó 26.5 g de ácido total agregando la cantidad correspondiente de cada uno de los ácidos de acuerdo con el diseño experimental.
- c) Se vertió el ácido sobre el material contenido en el frasco cuidando que todo quedase impregnado con ácido.
- d) Se cerraron perfectamente los frascos y se llevaron a la autoclave una vez que ésta alcanzó una temperatura de 60°C. Una vez alcanzada la temperatura de 130°C y presión de 24 psi comenzó a contar el tiempo de hidrólisis correspondiente de cada experimento.
- e) Una vez transcurrido el tiempo de reacción correspondiente se apagó la autoclave y se esperó hasta alcanzar una presión de 5 psi para comenzar a liberar el vapor, una vez despresurizada por completo se abrió la autoclave.
- f) Se abrieron los frascos y se procedió a separar el líquido del residuo sólido
- g) Se determinó la composición del líquido sobrenadante en HPLC.
- h) Se calculó la severidad combinada (CS) de cada experimento de acuerdo con la Ecuación 11.

$$CS = \log \left(t \cdot e^{\frac{T-T_{ref}}{14.75}} \right) - pH \quad (11)$$

Se usó un diseño de superficie de respuesta de tipo Box Behnken con puntos centrales para optimizar las condiciones de pretratamiento del sorgo dulce. Las variables independientes (tiempo, % H₂SO₄ y % H₃PO₄) se evaluaron en diferentes rangos, estos se determinaron de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio preliminar. Se realizaron 17 experimentos aleatorizados con el fin de disminuir la variabilidad, cada tratamiento se realizó por duplicado con excepción de punto central el cual fue replicado 5 veces. Los factores, sus rangos y cada uno de los tratamientos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4 Diseño de superficie de respuesta Box-Benhken

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
Tiempo (min)	25	30	35
H ₃ PO ₄ (%)	1	1.5	2
H ₂ SO ₄ (%)	1	1.5	2
Experimento	Tiempo (min)	% H ₃ PO ₄ (p/p)	% H ₂ SO ₄ (p/p)
1	30	1	2
2	30	2	2
3	25	1	1.5
4	25	1.5	2
5	30	1.5	1.5
6	30	1.5	1.5
7	30	1.5	1.5
8	25	2	1.5
9	35	1.5	1
10	30	1	1
11	30	2	1
12	35	1.5	2
13	30	1.5	1.5
14	25	1.5	1
15	35	1	1.5
16	35	2	1.5
17	30	1.5	1.5

Cada uno de los tratamientos se realizó de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

5.1.3 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se determinó la actividad celulítica de las enzimas Cellic CTec-3 Novozymes expresada en términos de unidades de papel filtro (FPU) siguiendo el procedimiento descrito por Ghose ,1987.

5.1.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El pretratamiento óptimo encontrado fue llevado a sacarificación y fermentación secuencial. Ésta se llevó a cabo en matraces de 250 ml con deflectores para mejorar la agitación. Se colocaron 60 g de material proveniente del pretratamiento termoquímico en cada matraz. El pH del material se ajustó a 4.8 con KOH 4 N y posteriormente se agregaron 394 mg citrato de sodio como buffer para obtener una concentración final de 50 mM. Se probaron tres diferentes combinaciones de cargas enzimáticas, la primera fue la recomendada en las especificaciones del proveedor: 6% (p/p) (Cellic CTec-3 Novozymes)/ gramo glucano y 1% (p/p) (Cellic HTec-3 Novozymes)/gramo glucano, la segunda carga probada fue 6% (p/p) (Cellic CTec-3 Novozymes)/ gramo material y 1% (p/p) (Cellic HTec-3 Novozymes)/gramo material, y la tercera carga probada fue de 20 UPF (Cellic CTec-3 Novozymes)/gramo glucano y 1% (p/p) (Cellic HTec-3 Novozymes)/gramo glucano. Además, se agregó Kanamicina a 30 ug/L como antibiótico para evitar la contaminación microbiana. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo a 50°C y 150 rpm por 48 h.

5.1.5 FERMENTACIÓN

La fermentación del hidrolizado de sorgo dulce proveniente de la sacarificación se llevó a cabo sin detoxificación.

5.1.5.1 Condiciones de cultivo

Se realizó un preinóculo de la cepa de *E.coli* JU15 en medio Luria Bertani (LB) el cual contenía 10 g/L de triptona, 9 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl. El preinóculo se llevó a cabo en tubos de ensaye a 37°C, 12 h a 100 rpm. Posteriormente se inocularon dos fleakers de 500 ml que contenían 40 g/L de xilosa y medio AM1 (Martinez *et al.*, 2007), el contenido de este medio se muestra en la Tabla 5, a 37°C, 100 rpm y pH de 7. El pH se controló con la adición automática de KOH 4N. Se tomaron muestras para monitorear el crecimiento celular mediante la densidad óptica del cultivo, la cual se determinó por espectrofotometría Uv-Vis a 600 nm.

5.1.5.2 Hidrolizado de sorgo dulce

Los sólidos presentes en el hidrolizado se separaron del líquido centrifugándolos en condiciones de esterilidad en tubos de 500 ml a 4000 rpm por 10 min. El pH del hidrolizado se ajustó a 7 adicionando NH_4OH . Además se prepararon dos fleakers con un medio sintético compuesto por 39.99 g/L de glucosa, 27.76 g/L de xilosa y 4.69 g/L de arabinosa y medio AM1. Se agregaron 200 ml de hidrolizado a dos fleakers y estos se complementaron con solo un cuarto de la concentración de medio mineral AM1, con excepción de la betaína la cual se agregó completa y sin citrato. Los cuatro fleakers fueron inoculados a 0.12 densidades ópticas del cultivo de *E. coli* JU15 y la fermentación se llevó a cabo a 37°C, 100 rpm, pH 7 por 48 h. El pH se controló con la adición automática de KOH 4N.

Tabla 5 Medio mineral AM1

Componentes	Concentración
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2.63 g/L
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.87 g/L
Citrato	0.05 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 mL/L
KCl	1.0 mL/L
Betaína HCL	1.0 mL/L
Glucosa	100 g/L
Elementos traza	
FeCl_3	1.6 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/L
CuCl_2	0.1 g/L
$\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/L
Na_2MoO_4	0.2 g/L
H_3BO_3	0.05 g/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.33 g/L

5.2 RESULTADOS

5.2.1 CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Una vez procesado y seco el material se obtuvieron los siguientes pesos para cada una de las fracciones de la planta: 1.85 kg de tallo y 1.31 kg de hoja dando un total de 3.16 kg de material.

La caracterización de la planta de sorgo dulce se realizó para 3 muestras: las hojas, los tallos y además para una mezcla de ambos la cual contenía 58.52% en peso de tallo y 41.48% en peso de hoja. La caracterización se llevó a cabo con material con un tamaño de partícula promedio de 0.285 mm ya que entre más pequeñas sean las partículas más susceptibles son a la hidrólisis ácida debido a que el ácido puede difundirse mejor (Vidal *et al*, 2011).

Los resultados de la caracterización de cada una de las muestras se reportan en la Tabla 6, en la cual se puede observar que el tallo tiene un mayor porcentaje de humedad y azúcares debido a que ahí se almacenan los jugos de la planta. Además, un hecho interesante es que el mayor porcentaje de cenizas se encuentran en las hojas, esto puede deberse a que son las que se encuentran más expuestas a la tierra y cabe destacar que el material no fue lavado antes de procesarse.

Tabla 6 Resultados de la caracterización del bagazo de sorgo dulce

	% Humedad	% Cenizas	% Lignina Insoluble	% Lignina soluble	% Glucanos	% Xilanos	% Arabinanos	% Acetatos
Tallo	8.23±0.10	7.35±0.04	13.90±0.89	1.48±0	34.14±0.2	15.26±0.25	2.5±0.05	10.40±0.23
Hoja	7.87±0.12	14.84±0.04	22.18±0.86	1.6±0.01	25.23±0.2	13.76±0.14	3.49±0	7.08±0.52
Mezcla	7.94±0.15	10.55±0.11	17.16±0.12	1.53±0.01	30.26±0.68	15.75±0.51	2.96±0.14	10.68±0.33

5.2.2 PRETRATAMIENTO ÁCIDO DILUIDO H₂SO₄/H₃PO₄

5.2.2.1 Diseño factorial

En la Figura 4 se muestran las respuestas de cada uno de los tratamientos del diseño factorial. En esta se pueden observar que la mayor liberación de xilosa fue en el tratamiento 7, en el cual se lograron liberar 29.64 g/L de xilosa y 12.53 g/L de glucosa, sin embargo, este tratamiento fue el que mayor cantidad de furanos totales

presentó, 1.68 g/L de furfural y 0.16 g/L de 5-HMF dando una concentración total de 1.84 g/L, esto se debe a que fue el tratamiento en el que se probó la mayor concentración de H_2SO_4 y éste junto con el tiempo de hidrólisis son los factores que más favorecen la degradación de azúcares (Heredia-Olea *et al.*, 2012). Por otra parte, el tratamiento número 3 logró recuperar 23.82 g/L de xilosa ,10.42 g /L de glucosa y solo 1.01 g/L de 5-HMF. En este tratamiento se probó la mezcla de 1.5% (p/p) de H_2SO_4 y 1% (p/p) de H_3PO_4 con un tiempo de hidrólisis de 30 min. Con estas condiciones se logró recuperar aproximadamente 7.93 g/L menos de azúcares que con las condiciones probadas en el tratamiento 7, sin embargo en este tratamiento se probó una concentración más baja de H_2SO_4 por lo que el H_3PO_4 contribuyo a la hidrólisis del material y a disminuir 0.83 g/L los furanos totales.

En general en estos tratamientos la liberación de glucosa fue menor en comparación con la liberación de xilosa ya que el efecto del pretratamiento ácido es sobre la hemicelulosa, hidrolizándola en monosacáridos (principalmente de cinco carbonos), permitiendo que la celulosa quede expuesta para la hidrolisis enzimática.

A partir de la caracterización del bagazo de sorgo dulce se calculó en rendimiento teórico máximo, 54.97 g de glucosa/150 g de bagazo y 30.14 g de xilosa/150 g de bagazo. Con esto se calculó el porcentaje de recuperación de glucosa y xilosa para cada uno de los tratamientos y la severidad de éstos de acuerdo a la Ecuación 11. En la Tabla 7 se muestran las condiciones de cada tratamiento, el porcentaje de recuperación de éstos, los furanos totales producidos en la hidrólisis y la severidad de cada tratamiento.

De ahí se puede observar que se logró un porcentaje de recuperación de hasta 98.35% de xilosa y 22.79% de glucosa con un factor de severidad combinado de 2.08 correspondiente al tratamiento número 7 y que con un factor de severidad combinado de 1.46 correspondiente al tratamiento número 3 se logró recuperar 79.02% de la xilosa y 18.95% de la glucosa.

Figura 4 Respuestas del diseño factorial

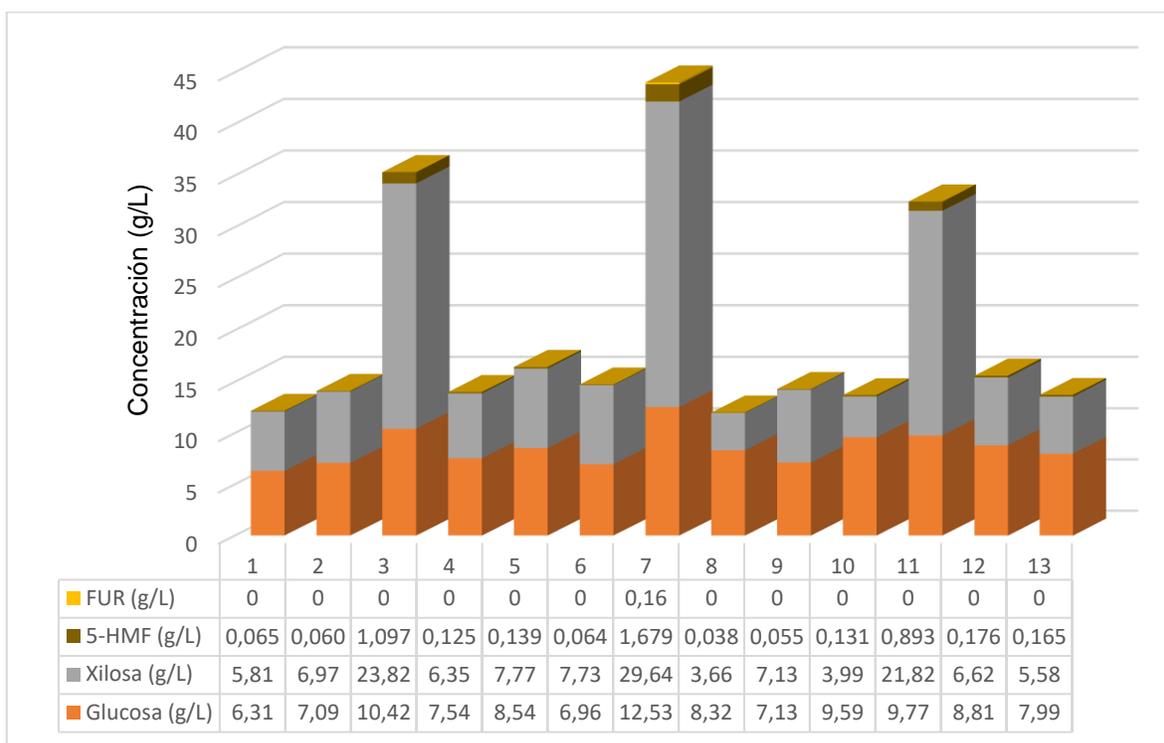


Tabla 7 Porcentaje de recuperación y SCF de los tratamientos factoriales

Experimento	Tiempo (min)	% H ₃ PO ₄ (p/p)	% H ₂ SO ₄ (p/p)	% Recuperación		Furanos totales (g/L)	SFC
				Glucosa	Xilosa		
1	20	0.5	1	11.47	19.27	0.065	0.91
2	20	0.5	1	12.90	23.13	0.060	0.91
3	30	1	1.5	18.95	79.02	1.097	1.46
4	20	0.5	1	13.71	21.08	0.125	0.91
5	30	0	1	15.53	25.79	0.139	1.06
6	20	0.5	1	12.67	25.63	0.064	0.91
7	30	0	3	22.79	98.35	1.843	2.08
8	30	1	0.5	15.13	12.14	0.038	0.95
9	20	0.5	1	12.96	23.65	0.055	0.91
10	10	1	0.5	17.45	13.23	0.131	0.47
11	10	1	1.5	17.77	72.39	0.893	0.98
12	10	0	1	16.03	21.97	0.176	0.58
13	10	0	3	14.54	18.50	0.165	1.60

Se realizó un análisis de varianza para cada una de las variables de respuesta con la ayuda del software Statgraphics Centurion XVI, el cual se encuentra resumido en la Tabla 8. Se muestra el valor de la prueba P para cada una de las respuestas el cual resulta significativo si es menor que 0.05 con un nivel de significancia de 5 %. En este caso, se puede observar que ninguno de los factores es significativo sobre la liberación de glucosa, esto se debe a que el efecto del pretratamiento es sobre la hemicelulosa y muy poca de la celulosa es degradada. En el caso de la xilosa, tanto la concentración de H₂SO₄ como la del H₃PO₄ resultaron ser factores significativos, además la interacción que existe resultó significativa con un valor de prueba P de 0.017. Esto es importante ya que nos indica que el H₃PO₄ si participa de manera significativa en la hidrólisis. Además, como ya lo ha reportado Heredia-Olea *et al.*, 2012, el tiempo de hidrólisis y la concentración de ácido son factores significativos en la formación de compuestos de degradación.

Tabla 8 Análisis de varianza del diseño factorial

	Glucosa	Xilosa	5-HMF	FUR
	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P
A: Tiempo	0.2949	0.0592	0.0981	0.0121
B: H ₃ PO ₄	0.5548	0.0092	0.0674	0.0121
C:H ₂ SO ₄	0.3756	0.0011	0.0057	0.0292
AB	0.688	0.3692	0.6481	0.1088
AC	0.2448	0.1197	0.1276	0.0292
BC	0.8277	0.017	0.1411	0.0292
R ² (%)	76.651	91.897	87.956	96.323
R ² ajustada (%)	72.865	83.795	75.912	92.646

Ya que el objetivo del pretratamiento ácido es la hidrólisis de la hemicelulosa, la variable de mayor interés es la liberación de xilosa, ya que entre más se hidrolice la hemicelulosa más expuesta quedará la celulosa a la hidrólisis enzimática. En el diagrama de Pareto (Figura 5) se observa que la concentración de H₂SO₄ es el factor que más impacto tiene sobre la liberación de xilosa, seguida de la concentración de H₃PO₄ y el tiempo en tercer lugar.

La Figura 6 muestra la tendencia de las interacciones entre cada uno de los niveles de los factores. Se puede observar que, aunque en ninguna de las tres posibles interacciones que se muestran las líneas que las representan llegan a cruzarse, si existe una tendencia a hacerlo, tanto para interacción entre tiempo-H₂SO₄ como para la interacción H₂SO₄-H₃PO₄. Esta tendencia indica que estos factores están interactuando y que esta interacción es significativa sobre la liberación de la xilosa.

Figura 5 Diagrama de Pareto de efecto estandarizado para la xilosa

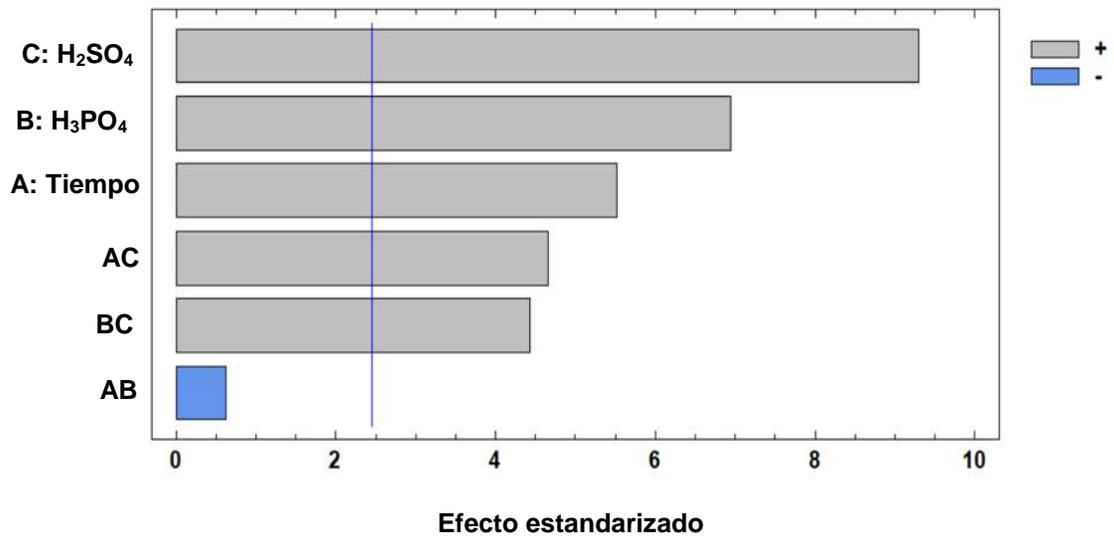
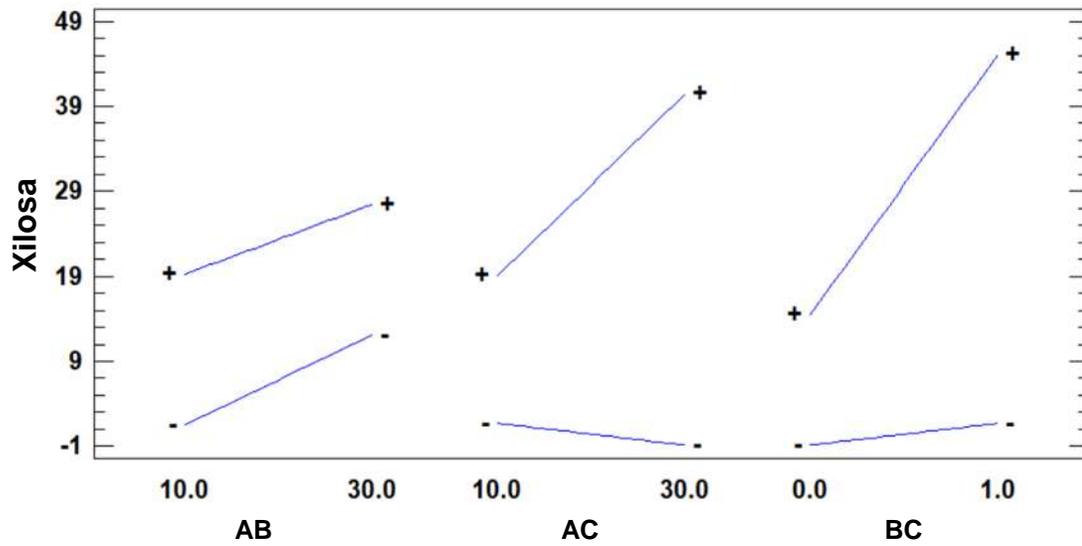


Figura 6 Interacciones para la xilosa



Se generaron las superficies de respuesta con base en un modelo matemático probabilístico, al cual se ajustaron los datos experimentales (Ecuaciones 12 a 15), con el objetivo de ubicar en una región del espacio tridimensional aquellos puntos sobre los cuales la liberación de xilosa adquiere su máximo valor.

$$\begin{aligned} \text{Glucosa} = & 9.02367 - 0.0902464 * \text{Tiempo} + 1.33601 * H_3PO_4 - 1.78 * H_2SO_4 - 0.0493695 * \text{Tiempo} \\ & * H_3PO_4 + 0.124116 * \text{Tiempo} * H_2SO_4 + 0.437681 * H_3PO_4 * H_2SO_4 \end{aligned} \quad (12)$$

$$\begin{aligned} \text{Xilosa} = & 3.75357 - 0.0901815 * \text{Tiempo} - 4.37616 * H_3PO_4 - 2.205 * H_2SO_4 - 0.246007 * \text{Tiempo} \\ & * H_3PO_4 + 0.377938 * \text{Tiempo} * H_2SO_4 + 13.6412 * H_3PO_4 * H_2SO_4 \end{aligned} \quad (13)$$

$$\begin{aligned} 5 - \text{HMF} = & 0.0833714 - 0.0152886 * \text{Tiempo} - 0.0985176 * H_3PO_4 - 0.16 * H_2SO_4 - 0.00902369 \\ & * \text{Tiempo} * H_3PO_4 + 0.0273123 * \text{Tiempo} * H_2SO_4 + 0.523754 * H_3PO_4 * H_2SO_4 \end{aligned} \quad (14)$$

$$\begin{aligned} \text{Fur} = & -0.0198727 - 0.000407259 * \text{Tiempo} + 0.0581475 * H_3PO_4 - 0.00166675 * \text{Tiempo} * H_3PO_4 \\ & + 0.002074 * \text{Tiempo} * H_2SO_4 - 0.0414801 * H_3PO_4 * H_2SO_4 \end{aligned} \quad (15)$$

Las superficies de respuesta se muestran para el tiempo en función de la concentración de H_3PO_4 (Figura 7), el tiempo en función de la concentración de H_2SO_4 (Figura 8) y la concentración de H_3PO_4 en función de la concentración de H_2SO_4 (Figura 9). Al hacer una comparación entre las superficies generadas, se puede observar que la liberación de xilosa es mucho más sensible a la concentración de H_2SO_4 ya que al fijar una concentración de $H_3PO_4 = 0.5$ (% p/p) la concentración de xilosa aumenta conforme se aumenta la concentración de H_2SO_4 . Además, la concentración de xilosa es menos sensible a la concentración de H_3PO_4 en comparación con la del H_2SO_4 ya que al fijar una concentración de $H_2SO_4 = 2$ (% p/p) la concentración de xilosa, aunque también aumenta conforme se aumenta la concentración de H_3PO_4 , el cambio es mucho menos pronunciado. Además se puede observar que la región donde se encuentra el mejor tratamiento es con tiempos mayores a 20 min y concentraciones de H_3PO_4 mayores a 0.5 % p/p y concentraciones de H_2SO_4 mayores a 2 % (p/p). Sin embargo, Las Figuras 10 y 11 muestran las superficies de respuesta estimadas para la formación de 5-HMF, la cual resultó más evidente en los tratamientos. Al hacer una comparativa de estas superficies podemos observar que claramente el 5-HMF es mucho más sensible a altas concentraciones de H_2SO_4 . La baja sensibilidad del H_3PO_4 puede deberse a que se probó un rango muy pequeño de concentraciones de éste.

Figura 7 Superficie de respuesta estimada para xilosa (Tiempo vs H_3PO_4)

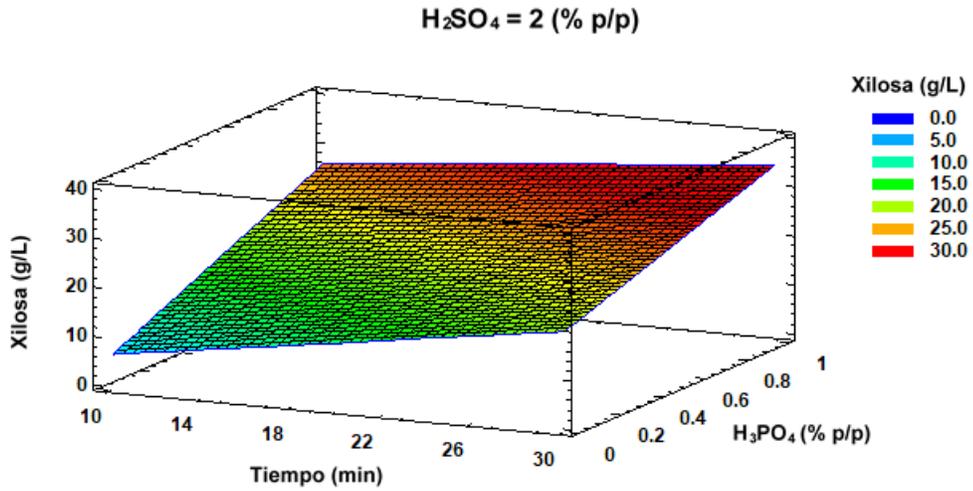


Figura 8 Superficie de respuesta estimada para xilosa (Tiempo vs H_2SO_4)

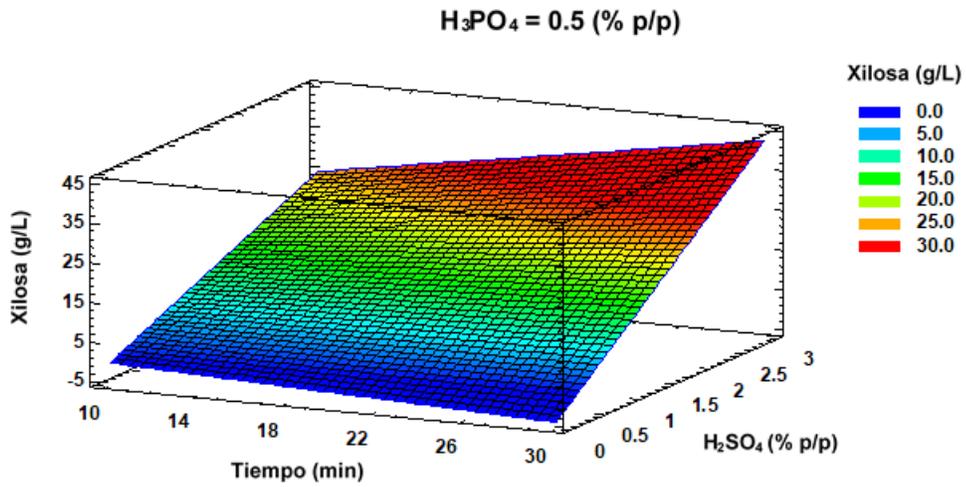


Figura 9 Superficie de respuesta estimada para xilosa (H_3PO_4 vs H_2SO_4)

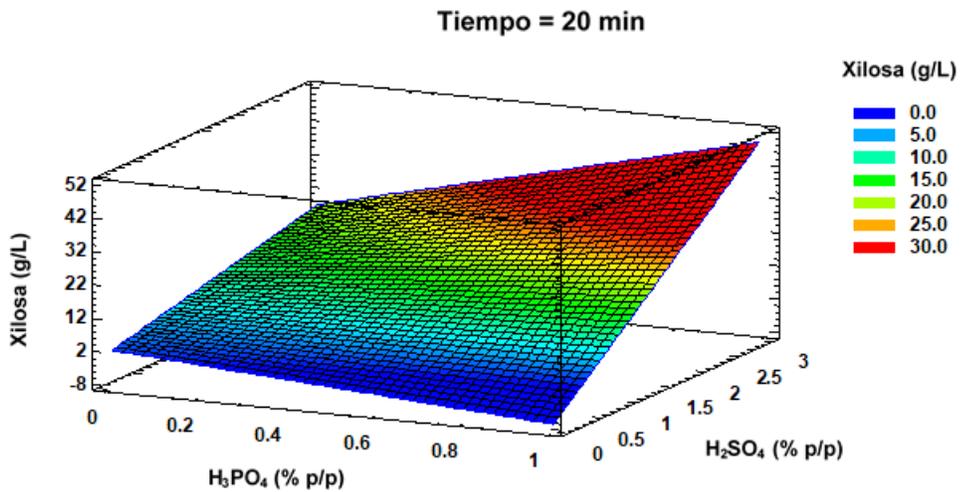


Figura 10 Superficie de respuesta estimada para 5-HMF (Tiempo vs H₃PO₄)

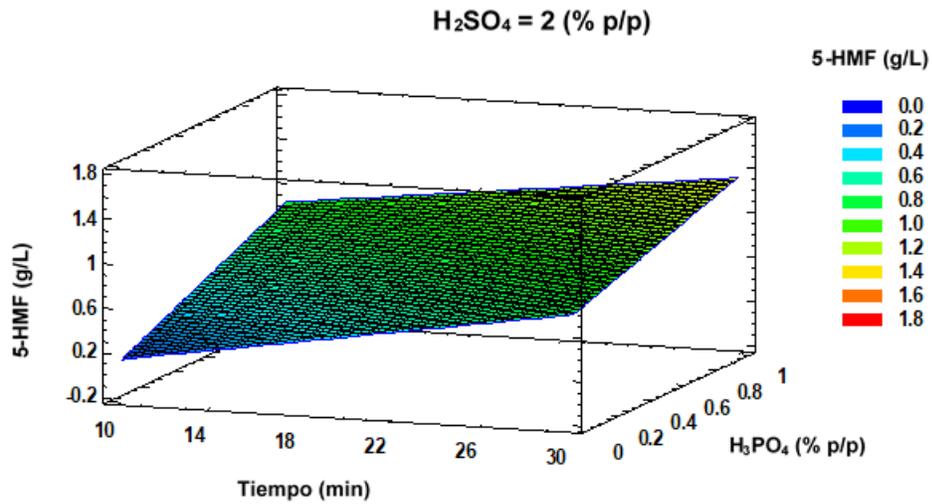
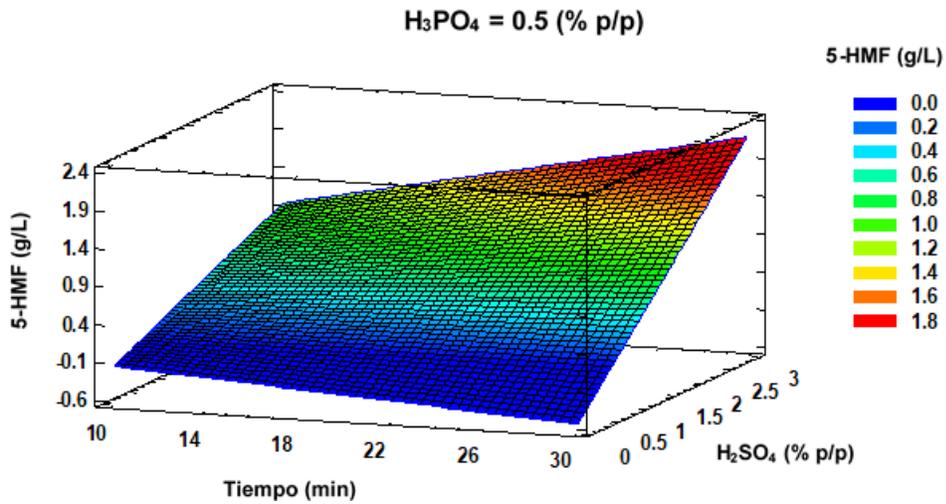


Figura 11 Superficie de respuesta estimada para 5-HMF (Tiempo vs H₂SO₄)

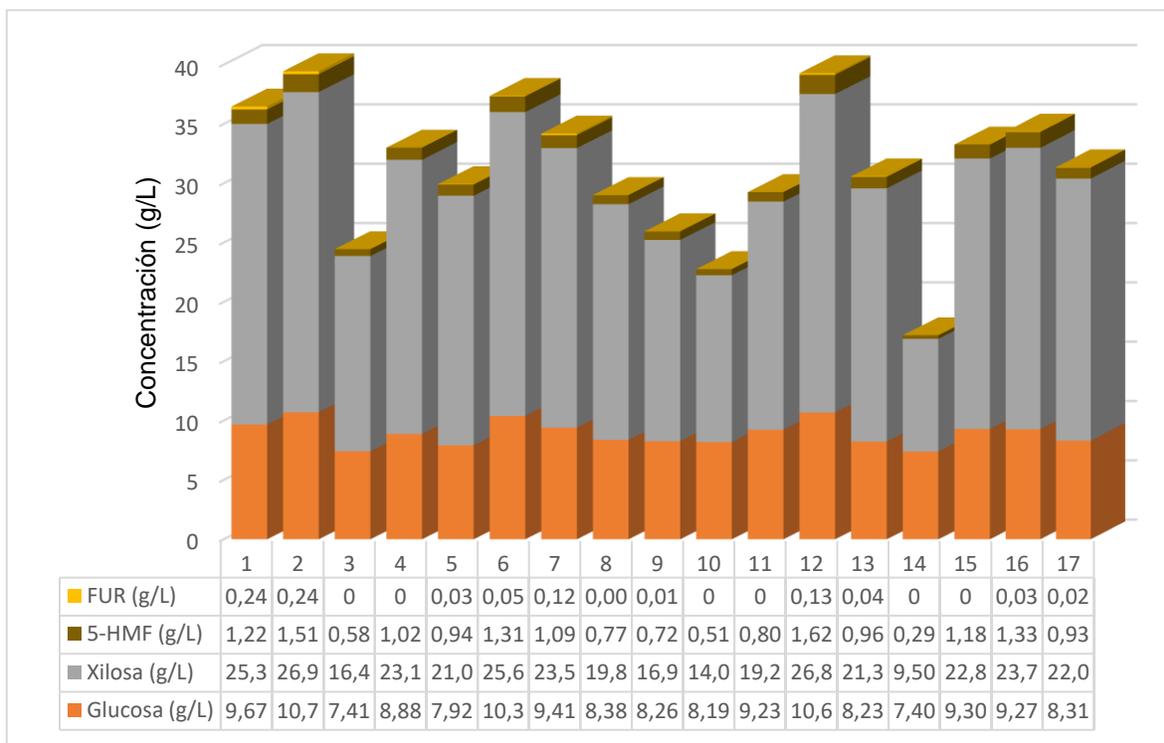


5.2.2.2 Superficie de Respuesta Box-Behnken

De acuerdo con los datos obtenidos y el análisis del diseño factorial, se decidió realizar un diseño de superficie de respuesta de tipo Box-Behnken para optimizar las condiciones de pretratamiento ácido que permitan la mayor liberación de xilosa y a la vez una baja concentración de furanos. Los niveles de cada factor se determinaron de acuerdo al estudio previo, los cuales se muestran en la tabla 9.

Se realizaron 17 tratamientos, cada uno por duplicado. Los resultados de estos tratamientos se muestran en la Figura 12, en la cual se resume la concentración de glucosa, xilosa, 5-HMF y furfural en cada tratamiento. Se puede observar que la mayor liberación de xilosa se dio en el tratamiento número 2, en el cual se logró liberar 26.99 g/L de xilosa y 10.71 g/L de glucosa, sin embargo éste fue también el tratamiento con la mayor concentración de furanos, 1.51 g/L de 5-HMF y 0.24 g/L de furfural dando una concentración de 1.75 g/L de furanos totales. Esto puede atribuirse a que en este tratamiento se probó una concentración alta de ácido, 2% (p/p) de H_2SO_4 y 2% de H_3PO_4 con un tiempo de hidrólisis de 30 min. En comparación con esto, se puede observar que en el tratamiento número 6 se probó el mismo tiempo de hidrólisis de 30 min que en tratamiento 2 pero con una menor concentración total de ácido, es decir 1.5% (p/p) de H_2SO_4 y 1.5% de H_3PO_4 , estas condiciones lograron liberar 25.62 g/L de xilosa y 10.39 g/L de glucosa, una concentración ligeramente menor que en el tratamiento número 2, sin embargo en este tratamiento se logró disminuir la concentración total de furanos, la cual fue de 1.37 g/L, 0.38 g/L menos que en tratamiento 2. Por lo que se puede determinar que una concentración total de 3% (p/p) de ácido es suficiente para hidrolizar la mayor parte de la hemicelulosa y que concentraciones por encima de ésta favorecen la formación de furanos. Este hecho se confirma al observar el tratamiento 12 en el cual las condiciones probadas fueron 2% (p/p) de H_2SO_4 y 1.5% de H_3PO_4 , es decir 3.5 % (p/p) de ácido total, y un tiempo de hidrólisis de 35 min. Este tratamiento tuvo la segunda mayor liberación de xilosa y glucosa, 26.84 g/L de xilosa y 10.69 g/L de glucosa, ligeramente menor que el tratamiento 2 y una concentración de furanos total de 1.76, muy similar a la obtenida en el tratamiento 2.

Figura 12 Respuestas del diseño de superficie de respuesta Box-Behnken



De acuerdo al rendimiento teórico máximo de glucosa de 54.97 g/L / 150 g de bagazo y de xilosa de 30.14 g/L / 150 g de bagazo, se calculó el porcentaje de recuperación de estos dos azúcares y la severidad (ecuación 11) de cada uno de los tratamientos del diseño experimental. En la Tabla 9 se resumen las condiciones probadas para cada uno de los tratamientos, el porcentaje de recuperación de glucosa y xilosa que cada tratamiento obtuvo, la concentración de furanos totales y la severidad de cada uno. Se puede ver que el mayor porcentaje de recuperación de xilosa fue de 91.76 % y 20.19% de glucosa correspondiente al tratamiento 2 el cual tiene un SFC de 1.60. El segundo mejor tratamiento fue tratamiento 12, en el cual se logró recuperar 91.26 % de la xilosa y 20.15 % de la glucosa, porcentajes de recuperación muy similares al tratamiento 2 sin embargo el SFC del tratamiento es de solo 0.84, esto debido al efecto del pH ya que en este tratamiento la concentración de ácido es menor que en el tratamiento 2. Asimismo se observa que la concentración de furanos totales (1.86 g/L) del tratamiento 12 es mayor que el tratamiento número 2, de ahí podemos decir que la formación de furanos se ve favorecida por tiempos de hidrólisis mayores, ya que en este tratamiento se probó un tiempo de hidrólisis de 35 min. El tercer mejor tratamiento fue el número 6, en el cual se logró una recuperación de 87.1 % de la xilosa y 19.6 % de la glucosa con una concentración de furanos total del 1.37 g/L y un SFC de 1.52.

Tabla 9 Balance de masa de Diseño de Superficie de Respuesta

Experimento	Tiempo (min)	% H ₃ PO ₄ (p/p)	% H ₂ SO ₄ (p/p)	% Recuperación		Furanos totales (g/L)	SFC
				Glucosa	Xilosa		
1	30	1	2	18.24	86.16	1.46	1.51
2	30	2	2	20.19	91.76	1.75	1.60
3	25	1	1.5	13.98	55.98	0.58	1.38
4	25	1.5	2	16.74	78.58	1.02	0.69
5	30	1.5	1.5	14.93	71.55	1.01	1.52
6	30	1.5	1.5	19.60	87.10	1.37	1.52
7	30	1.5	1.5	17.75	80.10	1.22	1.52
8	25	2	1.5	15.81	67.52	0.78	1.47
9	35	1.5	1	15.58	57.70	0.73	1.27
10	30	1	1	15.45	47.83	0.51	1.15
11	30	2	1	17.41	65.39	0.80	1.24
12	35	1.5	2	20.15	91.26	1.86	0.84
13	30	1.5	1.5	15.53	72.59	1.04	1.52
14	25	1.5	1	13.95	32.29	0.29	1.13
15	35	1	1.5	17.53	77.52	1.24	1.53
16	35	2	1.5	17.49	80.64	1.44	1.61
17	30	1.5	1.5	15.67	75.11	0.96	1.52

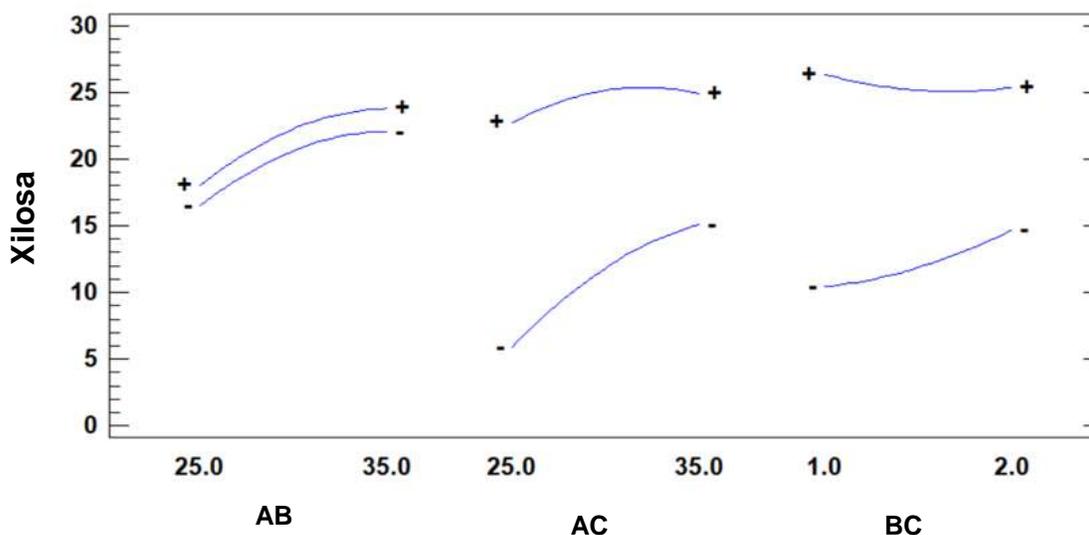
Se realizó un análisis estadístico de varianza para cada una de las variables de respuesta con la ayuda del software Statgraphics Centurion XVI, el cual se encuentra resumido en la Tabla 10. En ésta se muestra el valor de la prueba P para cada una de las respuestas el cual resulta significativo si es menor que 0.05 con un nivel de significancia de 5 %. Para los niveles y factores probados en este diseño experimental, el tiempo y la concentración de H₂SO₄ resultaron ser factores significativos sobre la liberación de glucosa. En el caso de la xilosa tanto el tiempo, la concentración de H₃PO₄ y de H₂SO₄ resultaron ser significativos, conjuntamente el término cuadrático del tiempo es estadísticamente significativo por lo que podemos suponer que la superficie de respuesta para la liberación de xilosa tendrá una curvatura. De igual manera, la formación de 5-HMF se ve favorecida principalmente por el tiempo, seguido de la concentración de H₂SO₄ y de H₃PO₄. Por su parte, la concentración de H₂SO₄ es el factor significativo para la formación de furfural.

Tabla 10 Análisis de varianza del diseño de superficie de respuesta

	Glucosa	Xilosa	5-HMF	FUR
	Valor P	Valor P	Valor P	Valor P
A: Tiempo	0.0473	0.002	0.0006	0.3291
B: H ₃ PO ₄	0.2248	0.042	0.041	0.8283
C:H ₂ SO ₄	0.0192	0	0.0001	0.0085
AA	0.2852	0.0266	0.2022	0.0549
AB	0.5528	0.4597	0.8822	0.7901
AC	0.5723	0.2766	0.5345	0.3406
BB	0.6413	0.8611	0.9002	0.5271
BC	1	0.3048	1	0.9549
CC	0.3315	0.0998	0.5079	0.1731
R ² (%)	84.06	95.03	94.18	86.68
R ² ajustada (%)	70.72	88.66	86.70	72.70

Se presentan también las gráficas de interacción entre cada uno de los factores para la liberación de xilosa, la cual es principal variable de interés. En la Figura 13 podemos observar que, aunque ninguna de las curvas llega a cruzarse, existe cierta tendencia a hacerlo. Lo cual nos indica que en un intervalo de niveles más amplio podría observarse esta interacción, sin embargo, para los niveles probados en este estudio solo se puede observar la tendencia, sobre todo en la interacción tiempo y concentración de H₃PO₄ (AB).

Figura 13 Interacciones para la xilosa



A partir de las ecuaciones de regresión del modelo generadas para cada una de las variables de respuesta (Ecuaciones 16 a 19) se generaron las superficies de respuesta con el objetivo de ubicar en una región del espacio tridimensional aquellos puntos sobre los cuales la variable de respuesta adquiere su máximo valor. Las superficies de respuesta para la xilosa se generaron para el tiempo en función de la concentración de H_3PO_4 (Figura 14) y la concentración de H_2SO_4 (Figura 15), además de la concentración de H_3PO_4 en función de la concentración de H_2SO_4 (Figura 16). De ahí se observa que la liberación de xilosa es mucho más sensible a la concentración de H_2SO_4 que al tiempo de hidrólisis y que en concentraciones mayores de H_2SO_4 a 1.5 % (p/p) se alcanza la mayor concentración de xilosa. En el caso del H_3PO_4 , la concentración de xilosa se ve mucho menos afectada por éste. Esto puede deberse a que se necesitan concentraciones mucho mayores de H_3PO_4 para que resulte significativo ya que es un ácido más débil. Como lo muestra el gráfico 13, con una combinación de concentraciones de H_2SO_4 y H_3PO_4 mayores que 1.8 % (p/p) se logra alcanzar la mayor concentración de xilosa. No obstante, las Figuras 17 a 20, muestran la formación de furfural y 5-HMF, descubren que en ambos casos la formación de estos se ve beneficiada por la concentración de H_2SO_4 , por lo que el uso de altas concentraciones de ácido no es adecuado para el objetivo de este trabajo, ya que al hacerlo la recuperación de xilosa podría ser máxima pero la formación de compuestos de degradación también y esto resultaría en bajos rendimientos en la fermentación.

$$\begin{aligned} \text{Glucosa} = & -10.0683 + 1.22915 * \text{Tiempo} + 1.472 * H_3PO_4 - 6.0255 * H_2SO_4 - 0.01809 * \\ & \text{Tiempo}^2 - 0.1 * \text{Tiempo} * H_3PO_4 + 0.095 * \text{Tiempo} * H_2SO_4 + 0.761 * H_3PO_4^2 + 1.631 * \\ & H_2SO_4^2 \quad (16) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Xilosa} = & -139.082 + 6.6574 * \text{Tiempo} + 13.8045 * H_3PO_4 + 44.6895 * H_2SO_4 - 0.08649 * \\ & \text{Tiempo}^2 - 0.248 * \text{Tiempo} * H_3PO_4 - 0.374 * \text{Tiempo} * H_2SO_4 + 0.561 * H_3PO_4^2 - 3.51 * H_3PO_4 * \\ & H_2SO_4 - 5.859 * H_2SO_4^2 \quad (17) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 5 - \text{HMF} = & -5.03725 + 0.24945 * \text{Tiempo} + 0.251 * H_3PO_4 + 0.7835 * H_2SO_4 - 0.00357 * \\ & \text{Tiempo}^2 - 0.004 * \text{Tiempo} * H_3PO_4 + 0.017 * \text{Tiempo} * H_2SO_4 + 0.033 * H_3PO_4^2 - 0.177 * \\ & H_2SO_4^2 \quad (18) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{FUR} = & -1.47293 + 0.141735 * \text{Tiempo} - 0.3112 * H_3PO_4 - 0.73195 * H_2SO_4 - 0.002676 * \\ & \text{Tiempo}^2 + 0.0033 * \text{Tiempo} * H_3PO_4 + 0.0122 * \text{Tiempo} * H_2SO_4 + 0.0774 * H_3PO_4^2 - 0.007 * \\ & H_3PO_4 * H_2SO_4 + 0.1764 * H_2SO_4^2 \quad (19) \end{aligned}$$

Figura 14 Superficie de respuesta estimada para xilosa (Tiempo vs H_3PO_4)

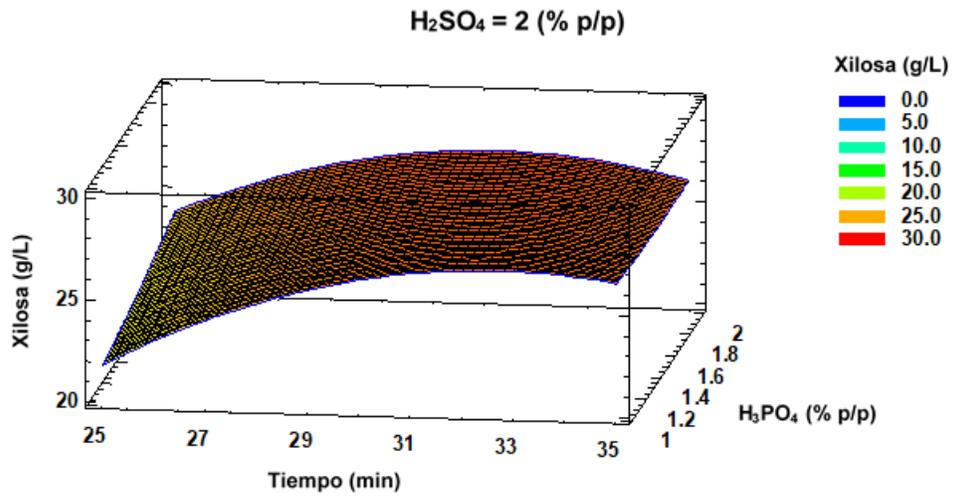


Figura 15 Superficie de respuesta estimada para xilosa (Tiempo vs H_2SO_4)

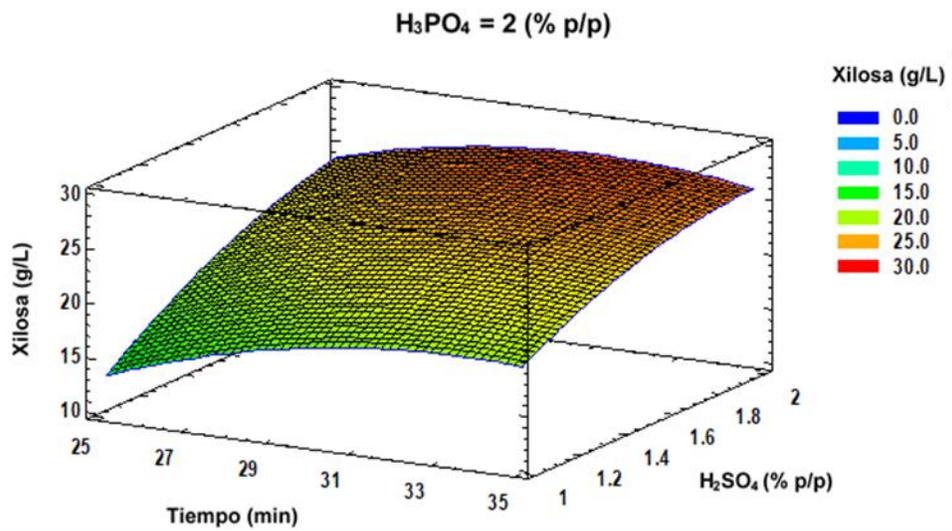


Figura 16 Superficie de respuesta estimada para xilosa (H_3PO_4 vs H_2SO_4)

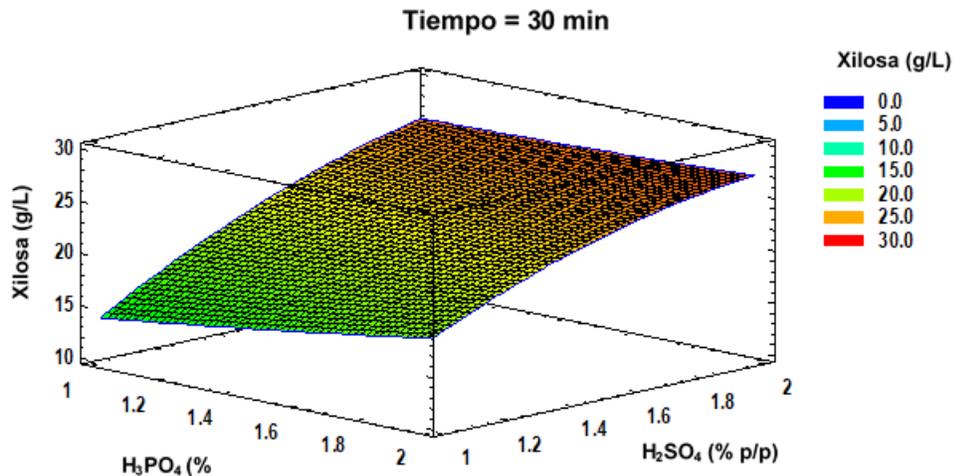


Figura 17 Superficie de respuesta estimada para Furfural (Tiempo vs H_3PO_4)
 $H_2SO_4 = 2$ (% p/p)

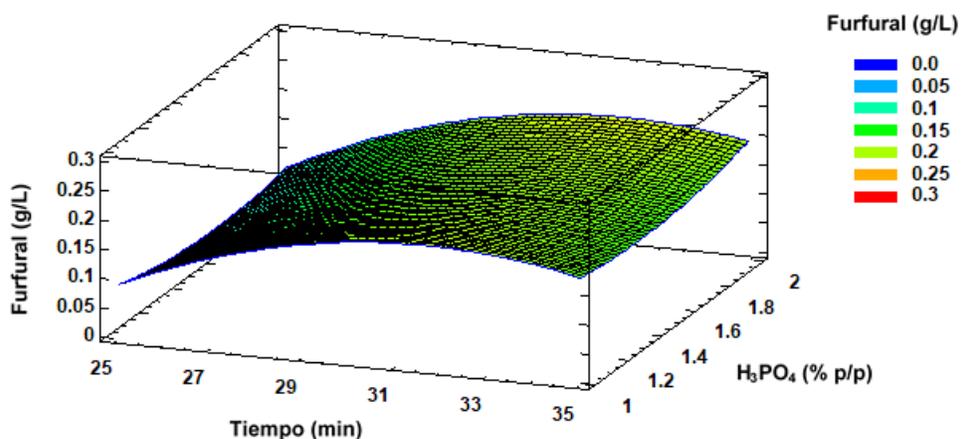


Figura 18 Superficie de respuesta estimada para Furfural (Tiempo vs H_2SO_4)
 $H_3PO_4 = 2$ (% p/p)

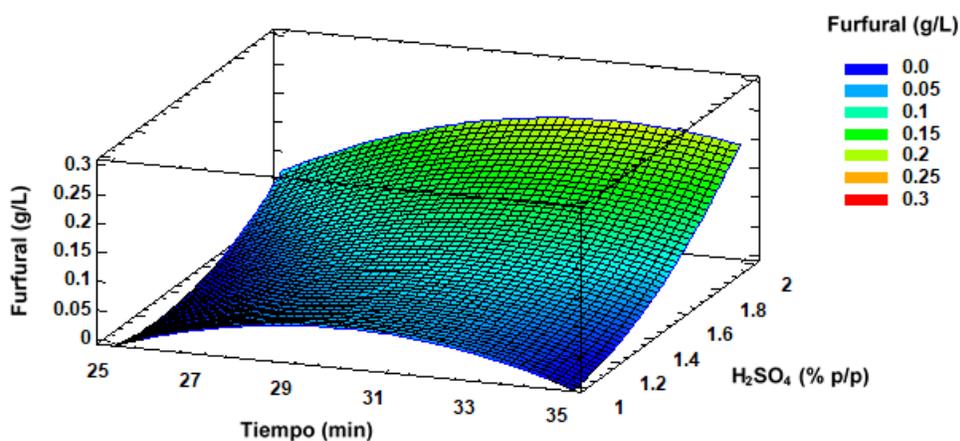


Figura 19 Superficie de respuesta estimada para 5-HMF (Tiempo vs H_2SO_4)
 $H_3PO_4 = 2$ (% p/p)

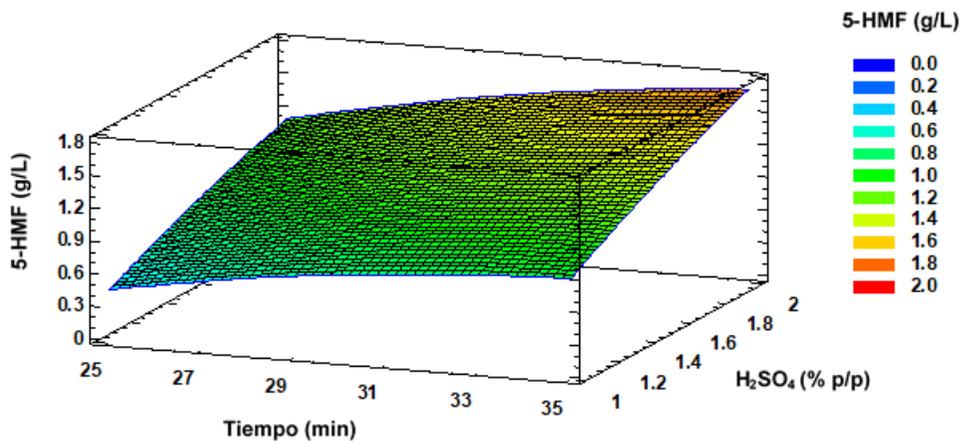
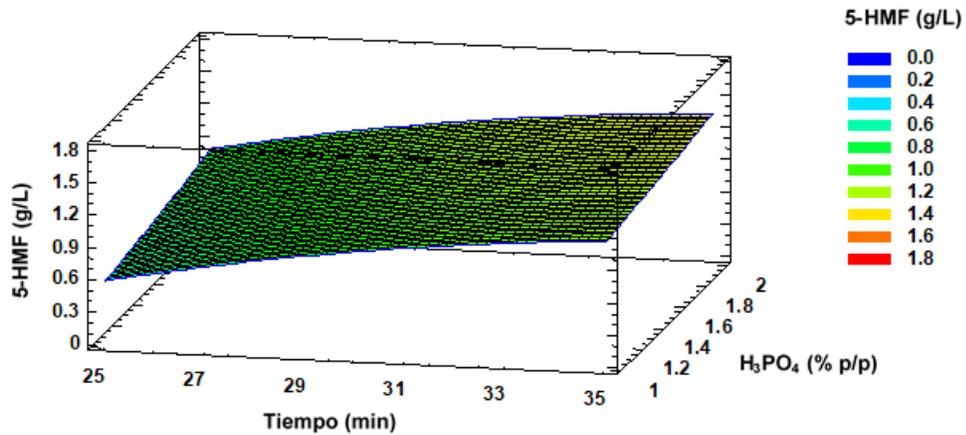


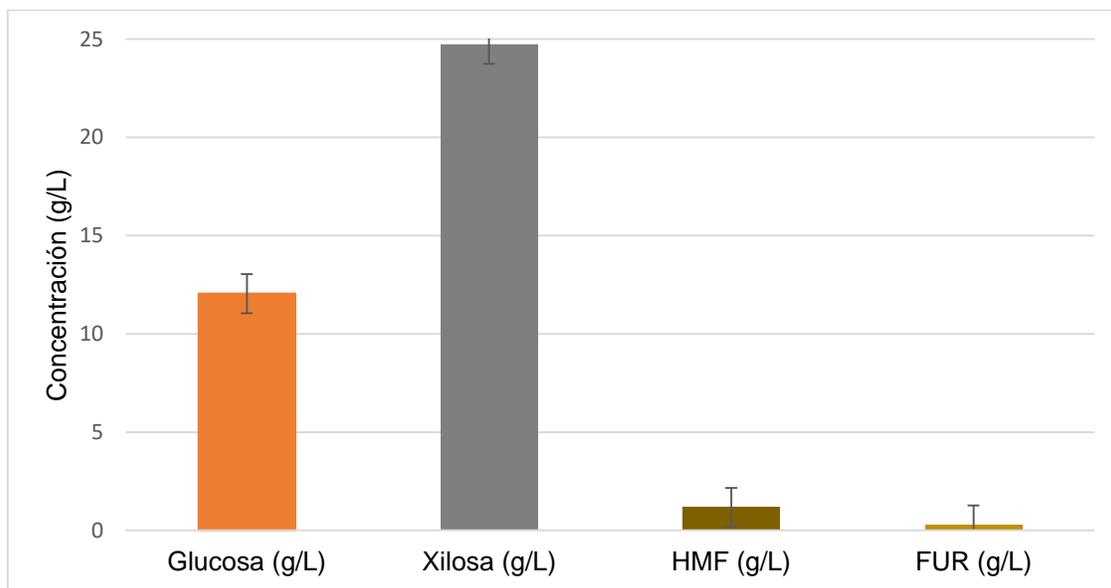
Figura 20 Superficie de respuesta estimada para 5-HMF (Tiempo vs H₃PO₄)
H₂SO₄ = 1.5 (% p/p)



A través de una función de deseabilidad para cada uno de los factores, se realizó una optimización de múltiples respuestas con ayuda del software Statgraphics Centurion XVI. La meta de la optimización múltiple fue maximizar la concentración de glucosa y xilosa, minimizar la formación de HMF y mantener en 0 la concentración de furfural. La combinación de niveles de los factores que maximiza la función de deseabilidad en la región indicada y la combinación de factores a la cual se alcanza el punto óptimo fue la siguiente: tiempo= 26.85 min, H₃PO₄ = 1 % (p/p), H₂SO₄ = 1.96 % (p/p). Las respuestas predichas por el modelo para estas condiciones fueron las siguientes: 9.71 g/L de glucosa, 25.18 g/L de xilosa, 0.12 g/L de furfural y 1.21 g/L de 5-HMF.

Estas condiciones óptimas de pretratamiento fueron probadas experimentalmente y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21. Se logró obtener 12.04 g/L de glucosa, 24.74 g/L de xilosa, 1.16 g/L de 5-HMF y 0.27 g/L de furfural, esto equivale a un porcentaje de recuperación de xilosa de 82.09 % y 21.91 % de glucosa, lo cual coincide adecuadamente con lo predicho por el modelo.

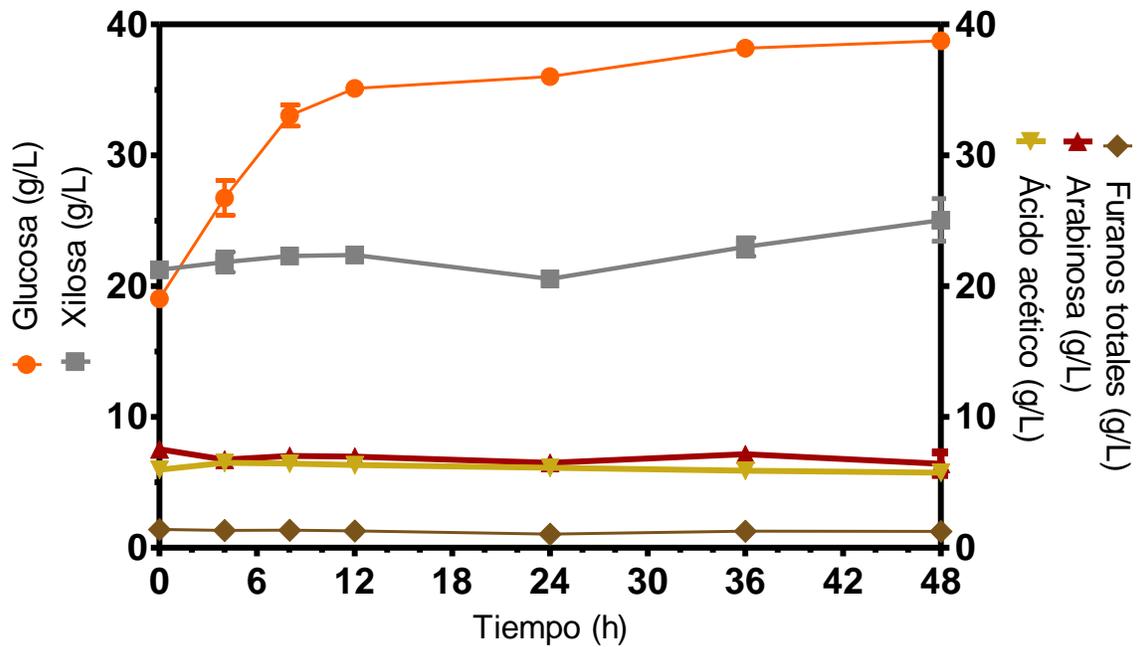
Figura 21 Resultados de las condiciones óptimas de pretratamiento



5.2.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

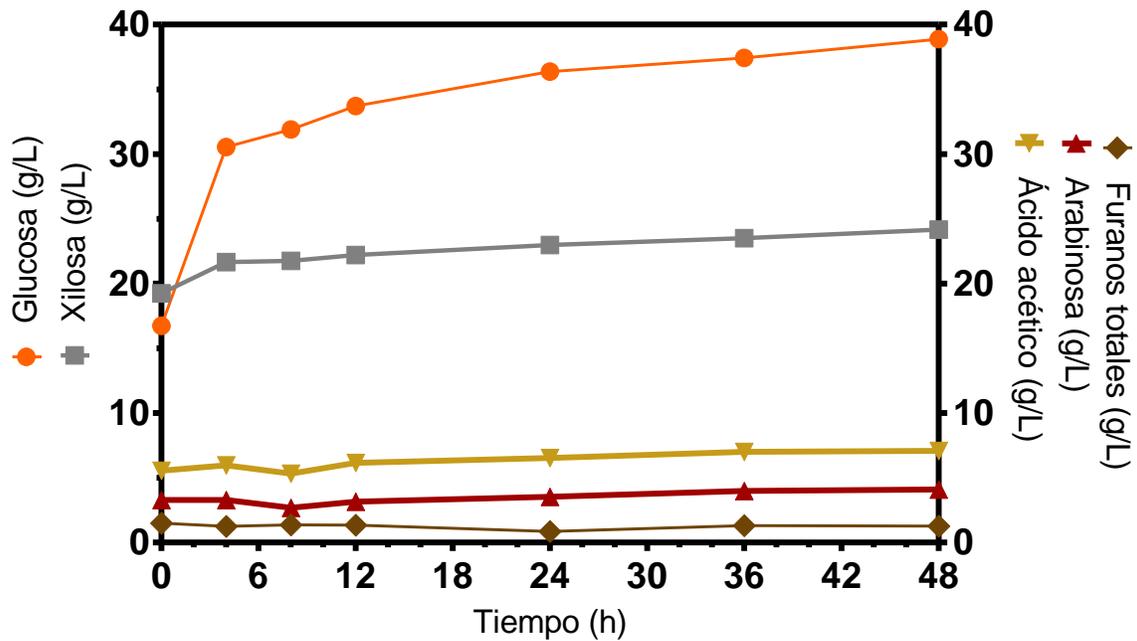
Las condiciones de pretratamiento óptimas obtenidas se llevaron a sacarificación secuencial. La cinética del primer experimento se presenta en el la Figura 22, éste se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor, en el cual se añadió 6% (p/p) (Cellic CTec-3 Novozymes)/ gramo glucano y 1% (p/p) (Cellic HTec-3 Novozymes)/gramo glucano. En este caso se puede observar que se logró recuperar una concentración de 38.75 g/L de glucosa y 25.04 g/L de xilosa, lo cual respecto al rendimiento máximo teórico corresponde a un porcentaje de recuperación de 70.49 % de glucosa y 83.08 % de xilosa. La velocidad de conversión de la glucosa fue de 1.33 g/h y la de la xilosa fue de 0.09 g/h. En este caso, la concentración de arabinosa y acetato se mantuvieron constantes durante toda la reacción y la concentración de furanos final fue de 1.26 g/L.

Figura 22 Cinética de sacarificación enzimática 1



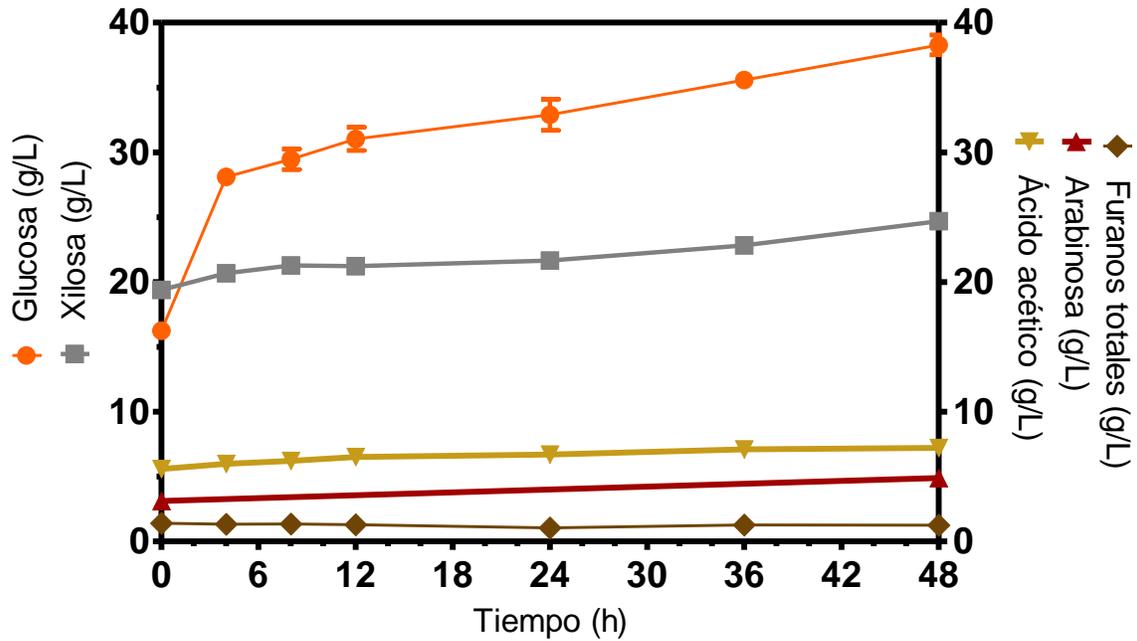
La cinética del segundo experimento se presenta en la Figura 23, en éste se añadió 6% (p/p) (Cellic CTec-3 Novozymes)/ gramo material y 1% (p/p) (Cellic HTec-3 Novozymes)/gramo material. En este caso se puede observar que se logró recuperar una concentración de 38.87 g/L de glucosa y 24.16 g/L de xilosa, lo cual respecto al rendimiento máximo teórico corresponde a un porcentaje de recuperación de 70.71 % de glucosa y 80.18 % de xilosa. La velocidad de conversión de la glucosa fue de 1.41 g/h y la de la xilosa fue de 0.08 g/h. La concentración de arabinosa y acetato se mantuvieron constantes durante toda la reacción y la concentración de furanos final fue de 1.18 g/L.

Figura 23 Cinética de sacarificación enzimática 2



Po su parte el tercer experimento se realizó añadiendo 20 UPF (Cellic CTec-3 Novozymes)/gramo glucano y 1% (p/p) (Cellic HTec-3 Novozymes)/gramo glucano, está fue la mayor carga enzimática probada, sin embargo como se observa en la Figura 24 se logró recuperar una concentración muy similar a las otras dos cargas enzimáticas probadas. La recuperación de glucosa fue de 38.28 g/L y la de xilosa de 24.89 g /L, lo cual corresponde a una recuperación de glucosa de 69.63 % y 82.58 % de xilosa. La velocidad de conversión de la glucosa fue de 1.23 g/h y la de la xilosa fue de 0.02 g/h. La concentración de arabinosa y acetato se mantuvieron constantes durante toda la reacción y la concentración de furanos final fue de 1.28 g/L.

Figura 24 Cinética de sacarificación enzimática 3



Al probar mayores concentraciones enzimáticas se esperaba obtener una mayor rendimiento de glucosa y xilosa, no obstante esto no fue así ya que al realizar una comparación entre tres cargas enzimáticas probadas, no hubo una diferencia significativa en los resultados obtenidos por lo que usar mayores concentraciones de enzimas a lo especificado por el proveedor no es necesario y esto solo implicaría un mayor costo del proceso. Debido a esto se determinó que 6% (p/p) (Cellic CTec-3 Novozymes)/gramo glucano y 1% (p/p) (Cellic HTec-3 Novozymes)/gramo glucano es mejor carga de enzimas probada para recuperar la mayor cantidad de azúcares y es esta fue la carga que se empleó para obtener hidrolizados de sorgo dulce para la etapa de fermentación.

5.2.4 FERMENTACIÓN

El jarabe obtenido de la hidrólisis de bagazo de sorgo dulce con un contenido promedio de azúcares totales de 72.41 g/L y 1.26 g/L de furanos totales fue fermentado. La cinética de fermentación E corresponde a la fermentación de los hidrolizados de bagazo de sorgo dulce y las cinéticas de fermentación B y D corresponden al medio sintético en el cual se probó la cepa *E. coli* JU15. La fermentación E, la cual se muestra en la Figura 25, se puede observar que esta bacteria fue capaz de crecer y que la presencia de furanos no inhibieron su crecimiento. Además esta bacteria fue capaz de consumir tanto las pentosas como las hexosas provenientes del hidrolizado. Puede observarse una preferencia por el consumo de glucosa, sin embargo hubo también consumo de xilosa. Otro hecho importante es que la producción de ácido acético fue en aumento y llegó hasta una concentración de 8.2 g/L, esto puede atribuirse a un mal funcionamiento del sistema de agitación por lo que la fermentación pudo estar en condiciones aerobias. Pese a esto se logró obtener una concentración de 29.27 g/L de ácido láctico con una velocidad de producción de 0.71 g de ácido láctico/h. También puede notarse que la concentración de furanos comenzó a decrecer conforme transcurría la fermentación hasta desaparecer por completo. Para comparar el rendimiento de la cepa en un medio con una concentración similar de azúcares a los hidrolizados probados, se realizaron dos fermentaciones con medio sintético con una concentración total de azúcares de 72.41 g/L. Estas fermentaciones se muestran en las Figuras 26 y 27, las cuales muestran que ambas fermentaciones fueron muy similares y que se logró una producción de ácido láctico de 22.64 g/L de ácido láctico con una velocidad de producción de 0.81 g/h para el caso de la fermentación B y 32.52 g/L y una velocidad de producción de 1.27 g/h en el caso de la fermentación D. En este caso, a diferencia de la fermentación con los hidrolizados, podemos observar que la concentración de ácido acético se mantuvo constante ya que en estas fermentaciones si se mantuvieron las condiciones anaerobias. Estas fermentaciones también nos permitieron reafirmar el hecho de que la cepa es capaz de consumir las pentosas al mismo tiempo que consume hexosas, asimismo cabe resaltar que no se consumieron todos los azúcares presentes en las fermentaciones con los hidrolizados ni en las fermentaciones con medios sintéticos por lo que probablemente el tiempo de fermentación no fue suficiente.

Figura 25 Fermentación E de hidrolizados de sorgo dulce

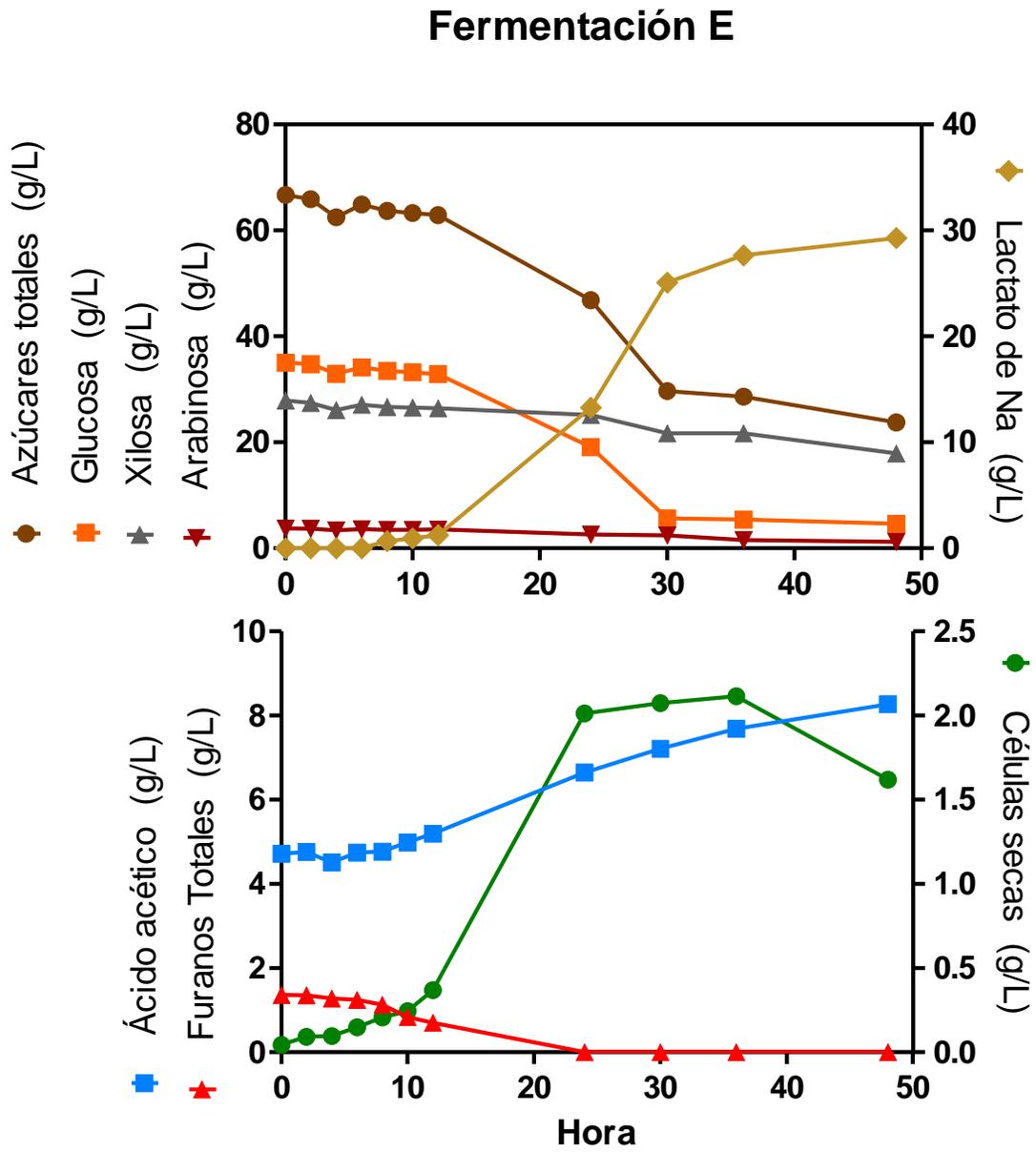


Figura 26 Fermentación B de hidrolizado sintético

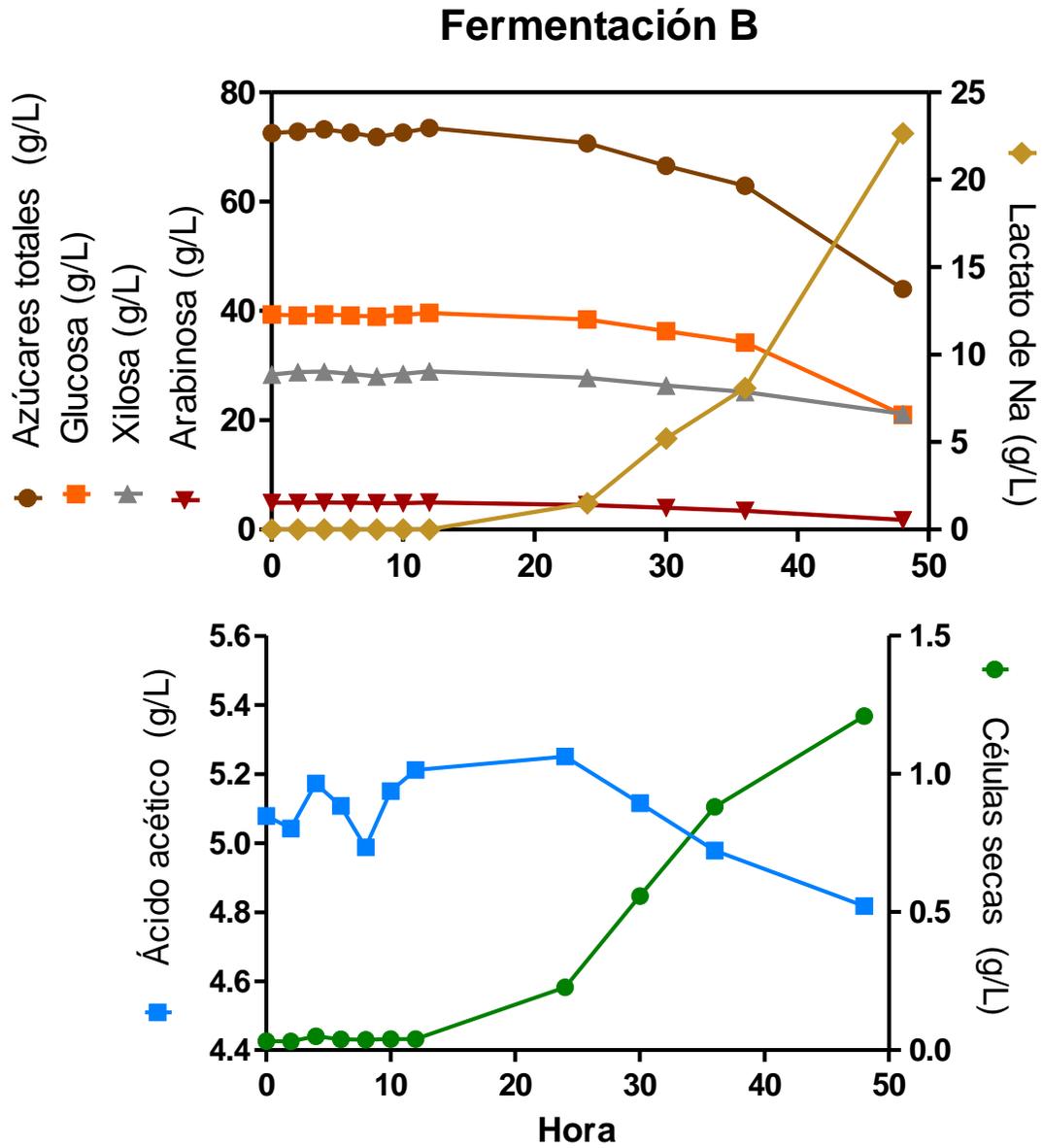
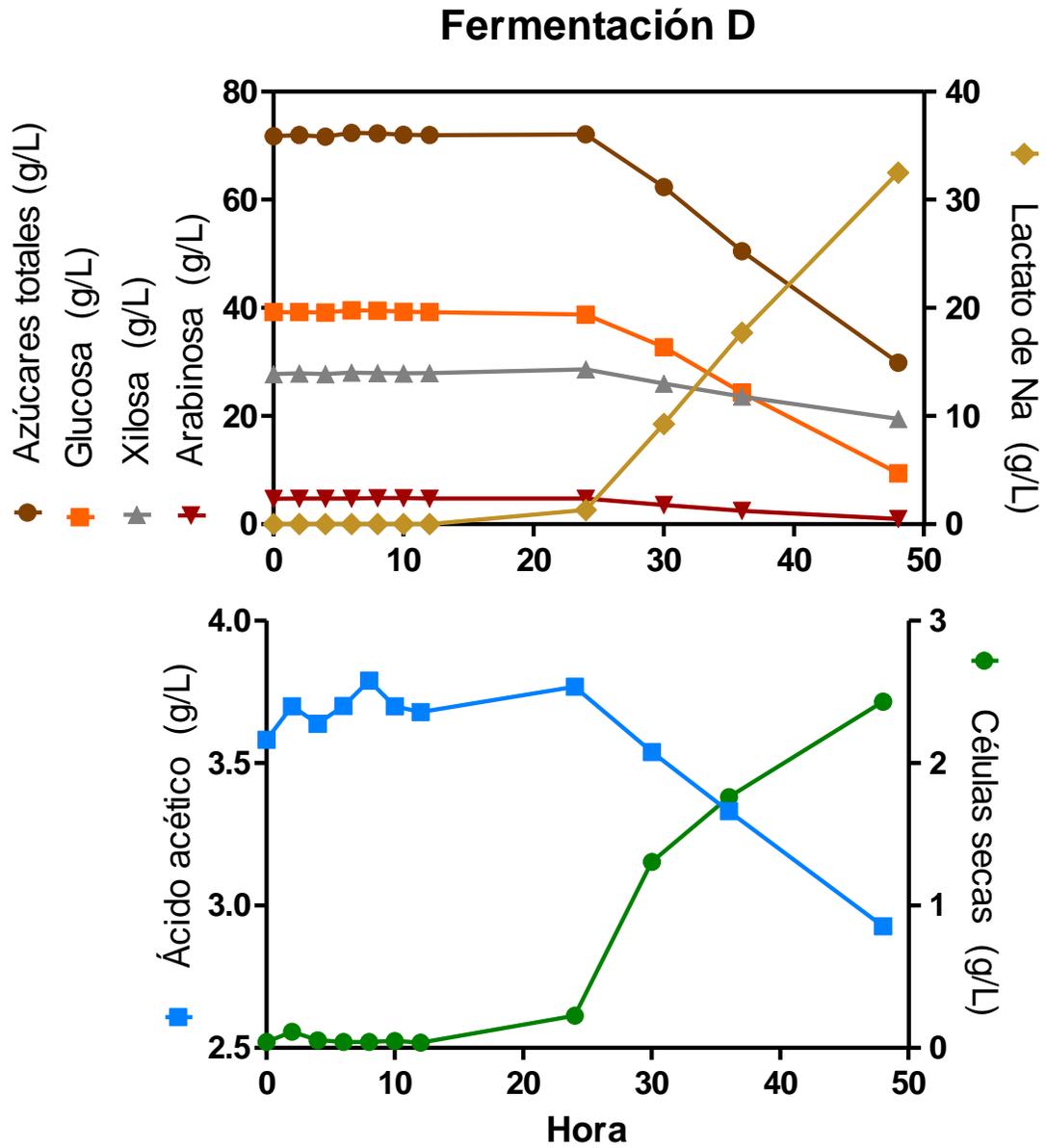


Figura 27 Fermentación D de hidrolizados sintético



En la Tabla 11 se muestran los parámetros cinéticos correspondientes a cada una de las fermentaciones, en donde μ representa la tasa de crecimiento, t_d el tiempo de duplicación, Q_s la tasa de consumo de sustrato calculada para la concentración total de azúcares, q_s la tasa específica de consumo de sustrato, Q_p la tasa de formación de producto, q_p la tasa específica de formación de producto y $Y_{p/s}$ y $Y_{x/s}$ representan los rendimientos de formación de producto por unidad de sustrato consumido y la producción de biomasa por unidad de sustrato consumido respectivamente.

De acuerdo a los parámetros cinéticos calculados se puede observar que la mejor tasa de crecimiento la tuvo la fermentación D con una tasa de crecimiento de 0.193 h^{-1} , igualmente la mayor tasa de formación de producto y el mayor rendimiento de formación de producto por unidad de sustrato consumido lo tuvo la fermentación D la cual representa la fermentación realizada con medio sintético. En el caso de la fermentación E, la cual se realizó con los hidrolizados, podemos observar que tuvo una buena tasa de formación de producto de 0.715 g/h y un buen rendimiento de formación de producto por unidad de sustrato consumido de 0.716 g/g , lo cual es muy similar a lo obtenido en la fermentación de los hidrolizados sintéticos.

Tabla 11 Parámetros cinéticos de la fermentación

Fermentación	μ (h^{-1})	t_d (h)	Q_s (g/h)	q_s (g/g *h)	Q_p (g/h)	q_p (g/g*h)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)
E	0.145	4.790	0.999	1.413	0.715	1.011	0.716	0.035
B	0.132	5.247	1.145	2.896	0.811	2.051	0.708	0.074
D	0.193	3.601	1.757	3.873	1.301	2.867	0.740	0.052

VI. EXPLOSIÓN DE VAPOR

6.1 METODOLOGÍA

6.1.1 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

La caracterización del residuo lignocelulósico de sorgo dulce se realizó siguiendo las técnicas del laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL) para la determinación de extractivos (Sluiter *et al.*, 2008a), cenizas (Sluiter *et al.*, 2008b), carbohidratos estructurales y lignina en la biomasa (Sluiter *et al.*, 2008c). La determinación de cenizas, carbohidratos estructurales y lignina se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección 5.1.1. Se realizó además la determinación de extractos acuosos y etanólicos. El material utilizado estaba seco y tenía un tamaño de partícula promedio de 0.285 mm.

6.1.1.1 DETERMINACIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS

- a) En cartuchos de celulosa se pesó aproximadamente 6 g de material
- b) En matraces de fondo plano de 500 ml previamente secado a 105 ± 5 °C por 12 h, se añadieron 5 cuerpos de ebullición y se registró el peso.
- c) Se añadieron 170 ml de agua destilada en cada uno de los matraces de fondo plano.
- d) Los cartuchos de celulosa que contenía la muestra se colocaron dentro de tubos de extracción Soxhlet de 85 ml.
- e) Se montaron los equipos de extracción Soxhlet ajustando los matraces a los tubos de extracción y los condensadores con agua de enfriamiento.
- f) Se colocaron las parillas de calentamiento y se calentó hasta que se efectuó la primera sifonada.
- g) Se ajustó la temperatura y se dejó en reflujo por 24 h.
- h) Una vez terminada la extracción se recuperó el líquido de los tubos Soxhlet.
- i) Se transfirió el líquido a un matraz volumétrico y se midió su volumen, además se tomó una alícuota de 20 ml para su análisis en HPLC.
- j) Los matraces de fondo plano se secaron a 105 ± 5 °C por 24 h. Transcurrido este tiempo se dejaron enfriar dentro de un desecador de cristal y se pesaron.
- k) Se calculó la cantidad de extractos acuosos por diferencia de peso.

6.1.2 DETERMINACIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS

- a) Los cartuchos de celulosa usados para la extracción acuosa se usaron para la extracción etanólica.
- b) En matraces de fondo plano de 500 ml previamente secado a 105 ± 5 °C por 12 h, se añadieron 5 cuerpos de ebullición y se registró el peso.
- c) Se añadieron 170 ml de etanol en cada uno de los matraces de fondo plano.
- d) Se siguió la misma metodología que en la extracción acuosa previamente realizada.

6.1.3 PRETRATAMIENTO ÁCIDO H_3PO_4 CON EXPLOSIÓN DE VAPOR

Se realizó un pretratamiento ácido empleando H_3PO_4 y una posterior explosión de vapor. Se calculó la densidad aparente del material lignocelulósico de sorgo dulce seco y se realizaron pruebas de mojabilidad. De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó hacer 5 explosiones de vapor, cada una de ellas con una carga de 200 g de material seco. Cada carga de 200 g de material seco fue previamente impregnada con H_3PO_4 al 0.5 % (p/p) durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se prensó manualmente cada carga de material para extraer la mayor cantidad de líquido posible. Posteriormente se realizaron cinco explosiones de vapor. Cada explosión de vapor se llevó a cabo a 190°C por 5 minutos en un equipo de explosión de vapor esto de acuerdo a las condiciones previamente reportadas por Castro *et al.*, 2017.

6.1.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El material proveniente del pretratamiento con explosión de vapor fue llevado a sacarificación. Ésta se llevó a cabo en matraces de 100 ml con tapa rosca. Se realizó un estudio de la sacarificación a través de un diseño experimental compuesto rotatable el cual se muestra en la Tabla 12, en el cual los factores a evaluar fueron la carga de sólido con niveles de 1.89 % a 23.10 % p/v y la carga de hemicelulasas (Cellic HTec-2 Novozymes) con niveles de 58.57 a 341.42 UI/ g de sólido. El diseño consta de 13 tratamientos, 8 experimentos factoriales y 5 puntos centrales, cada uno se realizó por triplicado. Además se colocaron 9 matraces como controles de celulosa y 9 blancos de enzimas. Se mantuvo una carga de celulasas (Cellic CTec-2 Novozymes) constante de 15 UPF/ g de sólido. Se ajustó el pH de 1.5 kg de material con 2.74 g de KOH hasta un pH de 4.8. Se agregaron 25 ml de un buffer de citrato con pH 5 a cada uno de los matraces. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo a 50 °C, 150 rpm por 96 h.

Tabla 12 Diseño compuesto rotatable

Tratamiento	Carga de sólido % (p/v)	Carga de Hemicelulasas IU/g sólido
1	12.5	200
2	12.5	200
3	12.5	200
4	12.5	341.4213562
5	5	100
6	20	100
7	5	300
8	1.893398282	200
9	23.10660172	200
10	12.5	58.57864376
11	12.5	200
12	20	300
13	12.5	200

6.2 RESULTADOS

6.2.1 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Los resultados de la caracterización del bagazo de sorgo dulce se muestran en la Tabla 13. Esta caracterización muestra que 23.75% del material son extractos de los cuales 20.84 % son extractos acuosos y 2.91 % son extractos etanólicos. Este material soluble puede ser azúcares no estructurales, clorofila, ceras o algunos otros compuestos. El análisis de los extractos acuosos tras una post-hidrólisis arrojó un contenido de glucosa no estructural del 4.37%. El bagazo de sorgo dulce sin extracción contiene 27.92 % de celulosa, 18.65 % de Hemicelulosa y 13.15 % de lignina soluble e insoluble.

Tabla 13 Caracterización de sorgo dulce antes y después de la extracción

	Materia prima extraída (%)	Materia prima original (%)
Glucosa	40.28	30.71
Xilosa	23.76	18.1
Galactosa	0	0
Arabinosa	2.25	2.96
Extractos	-	23.75
Lignina Ácido Insoluble	16.16	12.32
Cenizas Ácido Insolubles	2.93	2.23
Lignina Ácido Soluble	1.08	0.83
Celulosa	36.62	27.92
Hemicelulosa	21.02	18.65
Cenizas totales	3.53	5.29
Acetilos	2.38	1.81

6.2.2 PRETRATAMIENTO ÁCIDO H₃PO₄ CON EXPLOSIÓN DE VAPOR

La densidad aparente del material empleado fue de 130 kg/ m³. El líquido resultante del prensado posterior a la impregnación con H₃PO₄ fue analizado, dando como resultado una composición de 3.71 g/L de glucosa, 5.08 g/L de xilosa, galactosa y manosa, 0.26 g/L de ácido fórmico y 0.23 g/L de ácido acético. Una post-hidrólisis de este líquido fue hecha para liberar los azúcares monoméricos presentes en forma oligomérica, el resultado mostró un contenido de 2.64 g/L de manitol y 0.22 g/L de xilosa. La fracción sólida fue llevada al equipo de explosión de vapor con un peso de 8.87 kg y un pH de 5. Una vez hecha la explosión de

vapor, se recuperaron 8 kg de material con un pH de 4.66, una humedad de 84.48 % y una relación de sólido/líquido de 10.52 %. La fracción líquida fue analizada y arrojó un contenido de 2.21 g/L de glucosa, 0.123 g/L de arabinosa y 1.7 g/L de manosa. Posteriormente se realizó una post-hidrólisis a este líquido. El resultado de la post- hidrólisis mostró un contenido de 3.84 g/L de glucosa, 4.14 g/L de xilosa, 0.32 g/L de galactosa y 1.02 g/L de arabinosa. Cabe destacar que este método de pretratamiento no generó compuestos de degradación en el material pretratado.

6.2.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática se muestran en la Tabla 14. En esta tabla se muestran la recuperación de glucosa, xilosa y arabinosa para cada una de las condiciones probadas en los tratamientos. De ahí se puede ver que el tratamiento en el cual se logró recuperar una mayor cantidad de glucosa fue el tratamiento número 5, en el cual se probó una carga de sólidos de 5 % p/v y una carga de hemicelulasas de 100 UI/ g de sólido, y de acuerdo a la recuperación máxima teórica de este tratamiento de 0.39 g de glucosa se logró recuperar 0.31 g de glucosa, lo cual equivale a un porcentaje de recuperación del 78.75 %, la recuperación de xilosa fue de 84.92 %. Por su parte, el tratamiento número 13, en el cual se probó una carga de sólido de 12.5 % p/v y una carga de hemicelulasas de 200 UI, logró recuperar la mayor cantidad de glucosa, que de acuerdo a la recuperación máxima teórica de este tratamiento de 0.59 g de xilosa se logró recuperar 0.55 g de xilosa, lo cual equivale a un porcentaje de recuperación del 94.07 %.

Se realizó un análisis estadístico del diseño experimental con la ayuda del software Statgraphics Centurion XVI. En la Tabla 15 se muestra el análisis de varianza para la glucosa y xilosa como variables de respuesta. El valor de la prueba P de los factores probados indica si estos son significativos sobre las variables de respuesta si el valor de P es menor que 0.05 con un nivel del confianza de 5%. En este caso, la carga de sólidos en los niveles estudiados resulta significativa sobre la recuperación de glucosa con un valor de la prueba P de 0.0003. Además resulta evidente la influencia de la carga de sólidos en este experimento el término cuadrático de la carga de sólidos resulta estadísticamente significativo sobre la recuperación de xilosa con un valor de la prueba P de 0.0067

Tabla 14 Resultado del diseño compuesto rotatable

Tratamiento	Recuperación teórica (g)		Recuperación (g)		Recuperación (%)	
	Glucosa	Xilosa	Glucosa	Xilosa	Glucosa	Xilosa
1	0.99	0.59	0.69	0.52	69.06	87.97
2	0.99	0.59	0.69	0.51	69.76	87.37
3	0.99	0.59	0.71	0.52	70.94	88.62
4	1.00	0.59	0.70	0.53	69.83	89.34
5	0.39	0.23	0.31	0.19	78.75	84.92
6	1.61	0.95	0.95	0.76	58.93	79.83
7	0.39	0.23	0.27	0.20	70.03	85.48
8	0.15	0.09	0.11	0.07	76.93	85.60
9	1.89	1.12	1.10	0.89	58.37	79.72
10	0.98	0.58	0.72	0.51	72.89	88.03
11	0.99	0.59	0.71	0.54	71.07	91.40
12	1.64	0.97	0.97	0.80	59.14	83.00
13	0.99	0.59	0.75	0.55	75.44	94.07

Tabla 15 Análisis de varianza de diseño compuesto rotatable

	Glucosa	Xilosa
	Valor P	Valor P
A:Carga de sólidos	0.0003	0.0649
B:Carga de hemicelulasas	0.3338	0.2594
AA	0.0652	0.0067
AB	0.1496	0.618
BB	0.4877	0.1584
R ² (%)	91.59	81.85
R ² ajustada (%)	84.59	66.73

En los diagramas de Pareto presentados en las Figuras 28 y 29 del efecto estandarizado para la glucosa y la xilosa respectivamente, se puede confirmar que el factor que mayor efecto tiene sobre la liberación de glucosa es la carga de sólidos. Esto también resulta evidente para la liberación de xilosa ya que el principal factor que afecta ésta es el término cuadrático de la carga de sólidos por lo que es muy probable que su superficie de respuesta presente curvatura. Este efecto de la carga de sólidos sobre ambas variables de respuesta indica que la hidrólisis enzimática se ve favorecida por bajas cargas de sólido.

Figura 28 Diagrama de Pareto de efecto estandarizado para la glucosa

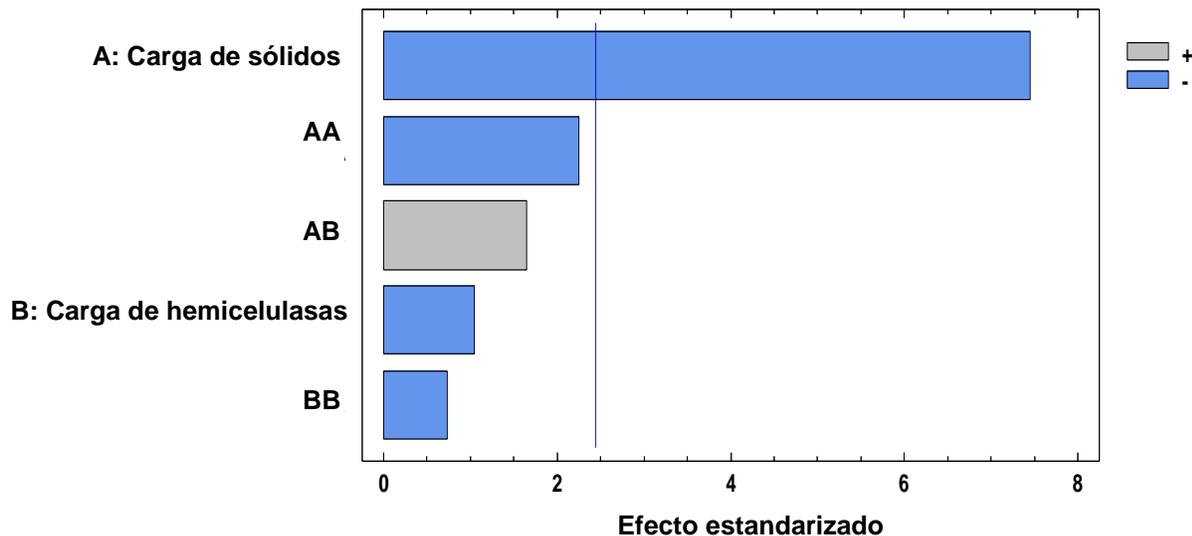
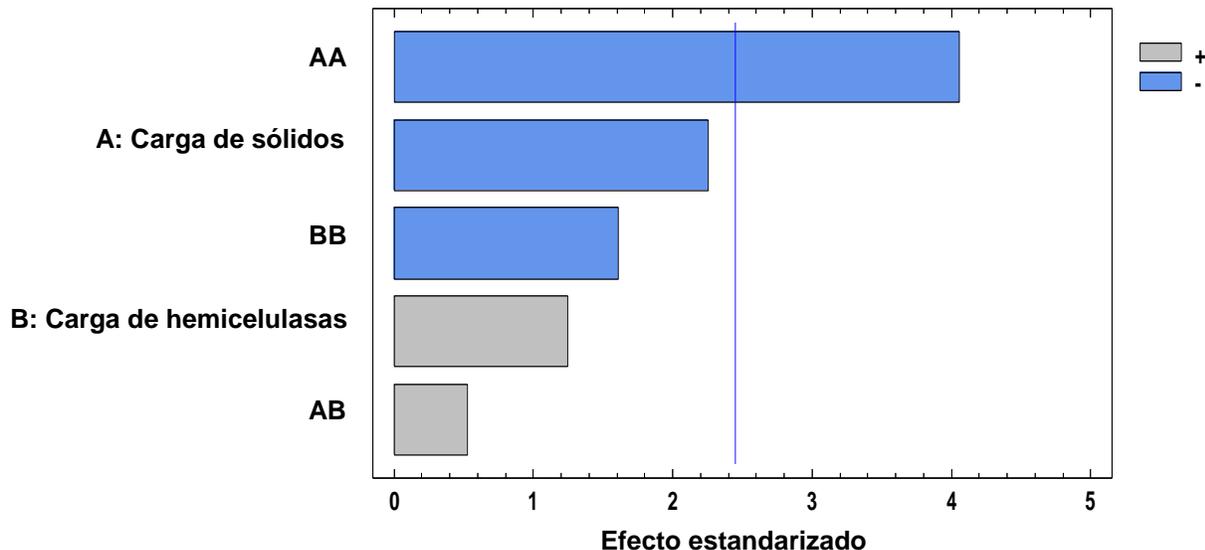


Figura 29 Diagrama de Pareto de efecto estandarizado para la xilosa



A través del modelo matemático al cual se ajustó el diseño experimental, el cual se presenta en las Ecuaciones 20 y 21, se generaron superficies de respuesta para la recuperación de glucosa y xilosa, esto con el objetivo de ubicar en el espacio tridimensional la región en donde se encuentra las condiciones sobre las cuales se da la mejor hidrólisis enzimática del material lignocelulósico dentro de los niveles probados en este estudio.

$$Glucosa = 82.617 - 0.482121 * A - 0.011216 * B - 0.0425004 * A^2 + 0.00297667 * A * B - 0.0000973565 * B^2 \quad (20)$$

$$Xilosa = 73.7739 + 1.31762 * A + 0.0811997 * B - 0.0702552 * A^2 + 0.00087 * A * B - 0.000194894 * B^2 \quad (21)$$

Donde:

A: Carga de sólidos % (p/v)

B: Carga de hemicelulasas (UI/ g de sólido)

La superficie de respuesta para la recuperación de xilosa se generó para la carga de sólidos en función de la carga de hemicelulasas, la cual se presenta en la Figura 30. La superficie de respuesta para la recuperación de glucosa se generó de igual manera para la carga de sólidos en función de la carga de hemicelulasas y ésta se presenta en la Figura 31. De aquí se puede observar que la mayor recuperación de xilosa se ubica en el centro de la curva, es decir, a una carga de sólidos aproximadamente de 12 % (p/v) y una carga de hemicelulasas de 200 UI / g de sólido, en esta región logra recuperarse por encima del 90% de la xilosa. Por su parte en la superficie de respuesta para la liberación de glucosa se puede observar que ésta se ve beneficiada por cargas de sólido bajas de aproximadamente 4% (p/v) y como es de esperarse es poco sensible a la carga de hemicelulasas.

Figura 30 Superficie de respuesta estimada para xilosa (carga de sólidos vs carga de hemicelulasas)

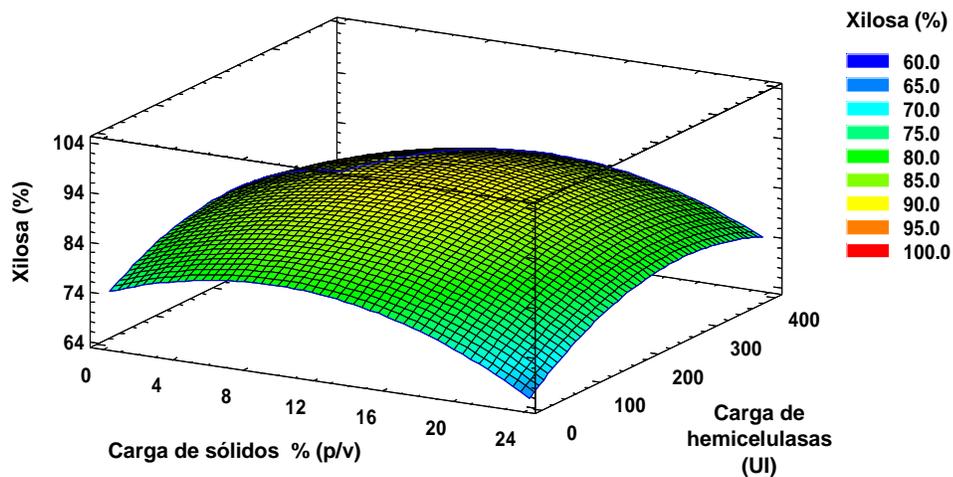
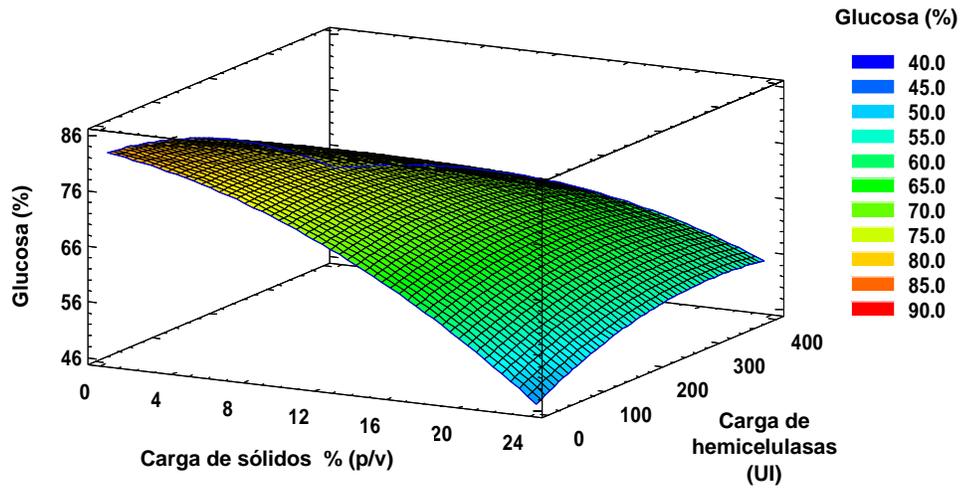


Figura 31 Superficie de respuesta estimada para glucosa (carga de sólidos vs carga de hemicelulasas)



VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La caracterización del bagazo de sorgo dulce mostró que contiene 30.26% de glucanos y 18.71 % de azúcares provenientes de la hemicelulosa por lo que, 48.97% de su composición son azúcares, lo cual lo hace un cultivo prometedor para su uso como cultivo energético ya que al ser comparado con cultivos similares que actualmente son empleados para este objetivo como lo es el rastrojo de maíz, sobre el cual se ha reportado un contenido de azúcares de 29.9 % de glucanos, 19.6 % de xilanos y 3.4 % de arabinanos (Vargas-Tah *et al.*, 2015), el contenido de azúcares resulta ser muy similar al del bagazo de sorgo dulce.

Tabla 16 Composición del bagazo de sorgo dulce reportada

Referencia	% Extractos acuosos	% Extractos etanólicos	% Lignina Ácido Insoluble	% Lignina Ácido Soluble	% Celulosa	% Hemicelulosa	% Cenizas	% Grupos Acetilo
Heredia-Olea <i>et al.</i> , 2012	19.1	4.3	13.5	0.5	42.4	22.9	-	0.05
Pengilly <i>et al.</i> , 2015	7.66		18.26		57.58		2.23	5.2
Damay <i>et al.</i> , 2018	35		11.2		26.3	24.3	4.7	-
Castro <i>et al.</i> , 2007	-	-	19.6		44.4	22.7	-	2.6
Li <i>et al.</i> , 2016	14.2		21.3		38.2	22.8	3.5	-
Barcelos <i>et al.</i> , 2016	4.5		19.8		40.4	20	0.5	-
Banerji <i>et al.</i> , 2013	11.3		13.04		42.63	26.2	3	-

En la Tabla 16 se muestra la composición de diferentes materiales lignocelulósicos de sorgo dulce reportados. Estas composiciones pueden ser comparadas con los resultados obtenidos en este estudio. El contenido total de lignina del bagazo de sorgo dulce resultó de 18.69%, esto corresponde con lo reportado por otros autores como Pengilly *et al.*, 2015 quienes reportan un contenido de lignina total de 18.26%, Castro *et al.*, 2007 reportaron un contenido de lignina de 19.6% y Barcelos *et al.*, 2016 un 19.8%. El contenido de azúcares provenientes de la celulosa fue de 30.26%, otros autores como Heredia-Olea *et al.*, 2012 han reportado mayores contenidos de estos azúcares de 42.4%, lo mismo sucede con los azúcares de la hemicelulosa, los cuales representan un 18.71%, otros autores han reportado contenidos mayores de hasta 22.7% (Castro *et al.*, 2007). Ballesteros *et al.*, 2004 reportaron contenidos de azúcares provenientes de la celulosa de 44.6 % y 25.3 % de azúcares provenientes de la hemicelulosa. Esta diferencia significativa que existe entre el material caracterizado en este estudio y lo ya reportado puede atribuirse a la madurez en el momento de la cosecha y al

genotipo del cultivo. Respecto a los extractos solubles en agua y etanol, Heredia-Olea *et al.*, 2012 reportaron contenidos de 19.1 % de extractos acuosos y 4.3 % de extractos etanólicos lo cual corresponde bien a los resultados obtenidos en este estudio, los cuales fueron de 20.84 % de extractos acuosos y 2.91 % de extractos etanólicos.

La diferencia en la composición de la caracterización reportada en la tabla 6 y la reportada en la tabla 13 se atribuyen a que para estos experimentos se utilizaron diferentes equipos por lo que la medición de estos varía, sin embargo estas son similares por lo que pueden ser usadas para calcular los rendimientos de cada uno de los experimentos.

Para la recuperación de los azúcares presentes en el material fue necesario realizar un estudio del pretratamiento del bagazo de sorgo dulce. Se realizó el estudio de dos métodos de pretratamiento, el primero empleando una mezcla de H_2SO_4/H_3PO_4 , en este estudio se obtuvieron las condiciones de pretratamiento óptimas de 26.85 min, 1 % (p/p) de H_3PO_4 y 1.96 % (p/p) de H_2SO_4 , las cuales permitieron recuperar 24.74 g de pentosas / 150 g de sólido seco. En este sentido, otros métodos de pretratamiento para el bagazo de sorgo dulce han sido probados. Banerji *et al.*, 2013 probó factores de severidad bajos para el pretratamiento de sorgo dulce empleando H_2SO_4 , en el cual las condiciones de pretratamiento óptimas de 121°C, 2% (p/p) de H_2SO_4 , 60 min y una carga de sólido del 10% permitieron recuperar 35.25 g de pentosas/ 150 g de sólido seco, lo cual representa una mayor recuperación a la de este trabajo, esto puede deberse a que emplearon un tiempo de reacción mucho mayor al empleado en este estudio y a que emplearon una carga de sólidos más baja, por lo que la difusión del ácido dentro del material fue más fácil. Por otra parte, de Heredia-Olea *et al.*, 2012 reportaron que las condiciones de pretratamiento ácido óptimas para la hidrólisis de bagazo de sorgo dulce de 121°C, 1.48 % (p/p) de H_2SO_4 , 101 min y una carga de sólidos del 6% permitieron recuperar 21.6 g de pentosas/ 150 g de sólido seco, lo cual resulta menor a los resultados obtenidos en este estudio, lo cual pudo deberse a la baja concentración de H_2SO_4 que emplearon.

Respecto al pretratamiento de materiales lignocelulósicos empleando ácido fosfórico, Avci *et al.*, 2013 hidrolizaron rastrojo de maíz empleando H_3PO_4 y encontraron que la mayor recuperación de xilosa fue de 91.4% empleando 1% (v/v) de H_3PO_4 , 160°C, 10 min y una carga de sólidos de 10%. Al realizar la comparación con los resultados obtenidos en este estudio, en donde se logró recuperar el 82.09 % de la xilosa, podemos darnos cuenta que la temperatura y el H_3PO_4 , tienen un efecto positivo sobre la hidrólisis de la hemicelulosa o liberación de xilosa, por lo que al aumentar ésta se requieren concentraciones más bajas de H_3PO_4 .

Otro tipo de pretratamientos para la hidrólisis del bagazo de sorgo dulce han sido estudiados, tal es el caso del pretratamiento de explosión de vapor. Los resultados

obtenidos de la impregnación con H_3PO_4 y la explosión de vapor del bagazo de sorgo dulce muestran que estas etapas tuvieron un efecto sobre la estructura de la biomasa por acción del ácido, el cambio de presión y la temperatura. Las condiciones probadas en este estudio de 200 °C, 5 min y una concentración de 0.5 % (p/p) de H_3PO_4 lograron una recuperación de 52.25 % de xilosa y 31.81 % de la glucosa presente en material. Estas condiciones permitieron una mayor solubilización de la fracción hemicelulósica que de la celulósica, lo cual era de esperarse ya que se ha reportado que el efecto de este pretratamiento es solubilizar la fracción hemicelulósica para mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa (Himmel *et al.*, 2007). En este sentido, un estudio realizado por Shen *et al.*, 2012 en el cual se probaron condiciones de pretratamiento similares a las de este estudio, 190 °C, 5 min con impregnación de SO_2 para el pretratamiento de bagazo de sorgo dulce logró una solubilización del 49.48 % del xilano presente en el material, lo cual al ser comparada con la solubilización obtenida en este estudio resulta ligeramente menor pero muy similar.

Al realizar una comparación de los dos métodos de tratamiento empleados en este estudio, se puede determinar que el método que liberó una mayor concentración de azúcar fue el pretratamiento en el cual se empleó una mezcla de H_2SO_4/H_3PO_4 , el cual tuvo una recuperación de 82.09 % de la xilosa y 21.91 % de la glucosa, sin embargo hubo una producción de furanos totales de 1.26 g/L. Por su parte el pretratamiento con explosión de vapor logró recuperar 52.25 % de la xilosa y 31.81 % de la glucosa y este pretratamiento no generó furanos, lo cual representa una ventaja ya que garantiza que no hay pérdidas de azúcares por degradación y además que no se verá afectado el crecimiento microbiano, lo cual conduciría a bajos rendimientos en la fermentación.

Sin embargo al realizar la hidrólisis enzimática del material pretratado con la mezcla de H_2SO_4/H_3PO_4 , la mayor recuperación que se alcanzó fue de 70.71 % de glucosa y 80.81 % de xilosa, la cual se logró al sacarificar una carga de sólidos del 15% y añadiendo una dosis enzimática de 6% (p/p) (Cellic CTec-3 Novozymes)/ gramo glucano y 1% (p/p) (Cellic HTec-3 Novozymes)/gramo glucano. Por su parte el estudio de la hidrólisis enzimática del material pretratado con impregnación de H_3PO_4 y explosión de vapor logró encontrar las condiciones para recuperar 78.75 % de la glucosa y 94.06 % de la xilosa. La máxima recuperación de xilosa se logró con una carga de sólidos de 12.5 % y una dosis enzimática de 200 UI/ g de sólido seco de (Cellic HTec-2 Novozymes) y 90 FPU/ml de (Cellic CTec-3 Novozymes) , en el caso de la máxima recuperación de glucosa, ésta se dio con al probar una carga de sólidos del 5% y una dosis enzimática de 100 UI/ g de sólido seco de (Cellic HTec-2 Novozymes) y 90 FPU/ml de (Cellic CTec-3 Novozymes). A pesar de que se logró una mejor recuperación en esta última hidrólisis enzimática esto puede ser atribuido a que se empleó una carga de sólidos más baja, 5 % y 12 %, comparación con la carga de 15 % que se empleó en la hidrólisis enzimática del sorgo dulce pretratado con la

mezcla de ácidos. Esta menor carga de sólidos mejora la agitación del material contenido dentro del matraz por lo que aumenta el contacto que tienen las enzimas con el sustrato. Además es claro que se requirió una mayor carga de enzimas para una liberación que no fue significativamente mayor a la obtenida en la hidrólisis enzimática anterior. Esto es de gran relevancia ya que existen estudios económicos que afirman que una conversión de 80 a 90 % puede ser más rentable que lograr una conversión completa empleando una dosis enzimática mayor (Shen y Agblevor, 2008). Otro aspecto de gran importancia es que la hidrólisis enzimática del material pretratado con la mezcla de ácido se realizó en 48 h y la del material pretratado con H_3PO_4 y explosión de vapor se realizó por 92 h. Esto es importante ya que mayores tiempos de reacción implican un aumento en los costos del proceso.

Otros estudios similares como el realizado por Pengilly *et al.*, 2015, en cual realizó la hidrólisis de bagazo de sorgo dulce pretratado con explosión de vapor, reportaron que las condiciones óptimas para lograr la recuperación de 36.48 g de azúcares /100 g de bagazo es empleando una carga de sólidos del 2 % y una dosis enzimática de 0.15 ml de Cellic CTec-2 Novozymes / g de sólido seco y 0.32 ml de Cellic HTec-2 Novozymes / g de sólido seco.

En el caso de los resultados logrados en la fermentación de los jarabes obtenidos con un contenido de azúcares totales de 72.41 g/L (glucosa, xilosa, arabinosa) se logró la producción de aproximadamente 29.27 g/L de ácido láctico sin emplear algún método de detoxificación para eliminar los furanos presentes en los jarabes empleando la cepa *E. coli* JU15 con una productividad de 0.71 g/L* h de ácido láctico y un rendimiento aparente de 0.71 g de ácido láctico / g de azúcares totales, lo cual representa un buen rendimiento si se compara con estudios previamente realizados para probar la producción de ácido láctico por esta cepa. En el estudio realizado por Utrilla *et al.*, 2016 se utilizaron hidrolizados de bagazo de caña de azúcar, previamente pretratados con ácido diluido y detoxificados con hidróxido de calcio. A partir de 70 g/L de azúcares totales (glucosa, xilosa y arabinosa) se logró una productividad de 0.98 g/L*h de ácido láctico y un rendimiento aparente de 1.11 g de ácido láctico/ g de azúcares totales. Este rendimiento aparente mayor a 1 se debe a que no se tomaron en cuenta otros azúcares presentes en el hidrolizado para realizar el cálculo del rendimiento. Al comparar el rendimiento obtenido en este trabajo con lo ya reportado para esta cepa, se puede observar que se obtuvieron rendimientos más bajos a lo esperado, eso se atribuye a la falta de control de la agitación por lo que la fermentación pudo no haber estado todo el tiempo en condiciones anaerobias y esto se ve reflejado en el aumento de la concentración de ácido acético, el cual aumento de una concentración de 4.7 g/L a 8.2 g/L, por lo que es evidente que una parte del flujo de carbono se fue a la producción de este ácido. Además de acuerdo a la cinética de crecimiento microbiano se puede observar que al momento de inocular la cepa,

ésta aún estaba en su fase de adaptación por lo que parte del carbono fue utilizado para la producción de biomasa.

VIII. CONCLUSIONES

- La caracterización del sorgo dulce demostró que es un cultivo prometedor para la recuperación de azúcares fermentables y su transformación en biocombustibles y derivados químicos, gracias a que contiene 30.26% de glucanos, 15.75% de xilanos y 2.96 % de arabinanos, lo cual representa un buen contenido de azúcares en su composición.
- A través de un diseño factorial y posteriormente una superficie de respuesta, se lograron encontrar las condiciones de pretratamiento termoquímico con ácido diluido óptimas de 130°C y 27 min empleando una mezcla de 1% (w/w) H₃PO₄ / 2 % (w/w) H₂SO₄ con un factor de severidad combinado de 1.46 que permitieron recuperar el 82.68 % de xilosa y 18.19% de glucosa presente en el material lignocelulósico de sorgo dulce produciendo 1.41 g/L de furanos totales.
- La hidrólisis enzimática secuencial de los residuos sólidos empleando diferentes cargas de enzima, permitió determinar la carga óptima de enzima para liberar la mayor cantidad de azúcares restantes en el material, la cual fue de 6% p/p Cellic CTec3 / g glucanos 1% p/p Cellic HTec3 / g xilanos, así como el tiempo necesario de reacción el cual fue de 12 horas. Bajo estas condiciones fue posible recuperar 76.83% de la glucosa con una velocidad de conversión de 1.33 g/h y 93.22% de la xilosa con una velocidad de conversión de 0.09 g/h con un contenido final de furanos de 1.26 g/L.
- La cepa *E. coli* JU15 fue capaz de crecer y producir 29.27 g/L ácido láctico usando como sustrato azúcares provenientes de la hidrólisis de bagazo de sorgo dulce sin detoxificación y complementando el medio de fermentación con solo un tercio del medio mineral requerido por la cepa.
- El pretratamiento de sorgo dulce empleando una impregnación con H₃PO₄ al 0.5 % (p/p) durante 24 h y posteriormente tratado con explosión de vapor a 190 °C por 5 min logró recuperar 52.25 % de la xilosa y 31.81 % de la glucosa y no generó la formación de furanos.
- El estudio de la hidrólisis enzimática del material pretratado con impregnación de H₃PO₄ y explosión de vapor a través de un diseño compuesto rotatable permitió encontrar las condiciones bajo las cuales se logró la recuperación de 78.75 % de la glucosa y 94.06% de la xilosa. La máxima recuperación de xilosa se logró con una carga de sólidos de 12.5 %

y una dosis enzimática de 200 UI/ g de sólido seco de (Cellic HTec-2 Novozymes) y 90 FPU/ ml de (Cellic CTec-3 Novozymes) , en el caso de la máxima recuperación de glucosa, ésta se dio con al probar una carga de sólidos del 5% y una dosis enzimática de 100 UI/ g de sólido seco de (Cellic HTec-2 Novozymes) y 90 FPU/ ml de (Cellic CTec-3 Novozymes).

IX. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, las perspectivas de futuros trabajos se orientan en realizar estudios sobre la hidrólisis enzimática del material pretratado , ya que está se vio muy afectada por la limitada agitación que proporciona el uso de matraces y agitadores orbitales por lo que se espera que al mejorar la agitación exista una mayor superficie de contacto entre el material lignocelulósico y las enzimas, además de evitar en asentamiento de los sólidos en el fondo de los matraces.

Otro punto que sería interesante complementar sería la fermentación de los hidrolizados producidos en este trabajo. Ya que si bien se logró el objetivo de producir ácido láctico empleando hidrolizados de sorgo dulce, la fermentación de este trabajo se vio muy limitada por el sistema de agitación y control del pH, por lo que se espera que al superar ese obstáculo se puedan obtener mejores rendimientos en la producción de ácido láctico.

En este sentido, también sería importante realizar un estudio de la fermentación en el cual se inocule con una mayor densidad óptica ya que de acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que la bacteria empleo parte del tiempo de fermentación en su fase de adaptación por lo que sería interesante poder inocular una vez que se haya superado esta fase y se comience con la fase exponencial. Además podrían probarse tiempos de fermentación más prolongados ya que en los experimentos realizados no se llegó a consumir por completo el sustrato.

Además sería interesante realizar un estudio sobre la purificación del ácido láctico producido en esta fermentación para su uso en la industria y su potencial polimerización para la producción de PLA.

Finalmente podría realizarse el escalamiento en planta piloto de este proceso de obtención de ácido láctico y realizarse un estudio económico para evaluar su viabilidad.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*, 156(4), 286–301. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>
- Almodares A, Hadi MR, Dosti B (2007a). Effects of Salt Stress on Germination Percentage and Seedling Growth in Sweet Sorghum Cultivars. *J. Biol. Sci.* 7: 1492-1495.
- Almodares A, Taheri R and Adeli S. 2008. Evaluation of some sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] cultivars and lines as sweet, dual purpose, and grain types. *Journal of Tropical Agriculture* 46(1–2):62–63.
- Amrane, A. (2000). Evaluation of lactic acid bacteria autohydrolyzate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 16, pp.207-209.
- Avci, A., Saha, B. C., Dien, B. S., Kennedy, G. J., & Cotta, M. A. (2013). Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource Technology*, 130, 603–612. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.104>
- Ballesteros, M., Oliva, J., Negro, M., Manzanares, P., & Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39(12), 1843–1848. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.011>
- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P. & Ballesteros, I. (2003). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, *Process Biochemistry*, Vol.39, No. 12, (October 2004), pp. 1843-1848, ISSN 1359-5113
- Banerji, A., Balakrishnan, M., & Kishore, V. (2013). Low severity dilute-acid hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Applied Energy*, 104, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.012>
- Castro, E., Nieves, I. U., Rondón, V., Sagues, W. J., Fernández-Sandoval, M. T., Yomano, L. P., . . . Vermerris, W. (2017). Potential for ethanol production from different sorghum cultivars. *Industrial Crops and Products*, 109, 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.050>

- Damay, J., Duret, X., Ghislain, T., Lalonde, O., & Lavoie, J. (2018). Steam explosion of sweet sorghum stems: Optimisation of the production of sugars by response surface methodology combined with the severity factor. *Industrial Crops and Products*, 111, 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.006>
- Dien BS, Nichols NN, Bothast RJ (2001) Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27:259–264. doi:10.1038/sj/jim/7000195
- Dien BS, Nichols NN, Bothast RJ (2002) Fermentation of sugar mixtures using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29:221–227. <https://doi:10.1038/sj.jim.7000299>
- Fao.org. (2017). FAOSTAT. [online] Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC> [Accessed 11 Enero. 2019].
- Fernández-Sandoval, M.T., Huerta-Beristain, G., Trujillo-Martinez, B., Bustos, P., González, V., Bolivar, F., Gosset, G., Martinez, A., 2012. Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1291–1300.
- Galbe, M., & Zacchi, G. (2007). Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Biofuels*, 41–65. https://doi.org/10.1007/10_2007_070
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Appl.Chem.*59:257-268
- Grandviewresearch.com. (2017). Lactic Acid Market & Polylactic Acid (PLA) Market | Industry Report 2025. [online] Available at: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market> [Accessed 1 Jul. 2017].
- Gray, K. A., Zhao, L., & Emptage, M. (2006). Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(2), 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.035>
- Henton DE, Gruber P, Lunt J et al (2005) Polylactic acid technology. In: Mohanty AK, Misra M, Drzal LT (eds) *Natural fibers, biopolymers, and biocomposites*. CRC Press, Boca Raton, pp 527–578
- Heredia-Olea, E., Pérez-Carrillo, E., & Serna-Saldívar, S. O. (2012). Effects of different acid hydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and C6 sugars and yeast inhibitors using response surface

- methodology. *Bioresource Technology*, 119, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.122>
- Himmel, M. E., Ding, S., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*, 315(5813), 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- Ingram, L., Aldrich, H., Borges, A., Causey, T., Martinez, A., Morales, F., Zhou, S. (1999). Enteric Bacterial Catalysts for Fuel Ethanol Production. *Biotechnology Progress*, 15(5), 855–866. <https://doi.org/10.1021/bp9901062>
- John, R. P., G.S., A., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2009). Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances*, 27(2), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.004>
- Kim, M. & Day, D. (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol. 38, No. 7, (August 2010), pp 803-807, ISSN: 1367-5435.
- Klinke, H. B., Thomsen, A. B., & Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(1), 10–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1642-2>
- Li, P., Cai, D., Zhang, C., Li, S., Qin, P., Chen, C., Wang, Z. (2016). Comparison of two-stage acid-alkali and alkali-acid pretreatments on enzymatic saccharification ability of the sweet sorghum fiber and their physicochemical characterizations. *Bioresource Technology*, 221, 636–644. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.075>
- Linde, M., Galbe, M., & Zacchi, G. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1100–1107. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.08.014>
- Martinez A, Rodríguez ME, Wells ML et al (2001) Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnol Progress* 17:287–293. doi:10.1021/bp0001720
- Martinez, A., Grabar, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P., York, S. W., & Ingram, L. O. (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters*, 29(3), 397–404. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9252-y>

- Martinez, A., Rodríguez-Alegría, M. E., Fernandes, M. C., Gosset, G., & Vargas-Tah, A. (2017a). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Lactic Acid Production from Renewable Resources. *Engineering of Microorganisms for the Production of Chemicals and Biofuels from Renewable Resources*, 125–145. https://doi.org/10.1007/978-3-319-51729-2_5
- Martinez, A., Rodríguez-Alegría, M. E., Fernandes, M. C., Gosset, G., & Vargas-Tah, A. (2017b). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Lactic Acid Production from Renewable Resources. *Engineering of Microorganisms for the Production of Chemicals and Biofuels from Renewable Resources*, , 125–145. https://doi.org/10.1007/978-3-319-51729-2_5
- Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2009). Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2280-5>
- Pengilly, C., García-Aparicio, M., Diedericks, D., Brienzo, M., & Görgens, J. (2015). Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase. *Fuel*, 154, 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.03.072>
- Prasad, S., Singh, A., Jain, N. & Joshi, H.C. (2007). Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India, *Energy & Fuels*, Vol. 21, No. 4, (May 2007), pp. 2415-2420, ISSN 0887-0624.
- Reddy BVS, Ramesh S, Sanjana Reddy P, Ramaiah B, Salimath PM and Rajashekar Kachapur. 2005. Sweet sorghum—A potential alternative raw material for bioethanol and bio-energy. *International Sorghum and Millets Newsletter* 46:79–86.
- Romero, I., Moya, M., Sánchez, S., Ruiz, E., Castro, E., & Bravo, V. (2007b). Ethanol fermentation of phosphoric acid hydrolysates from olive tree pruning. *Industrial Crops and Products*, 25(2), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.08.008>
- Rubin, E. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), pp.841-845.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>

- Serna-Saldívar, S. O., Chuck-Hernández, C., Pérez-Carillo, E., and Heredia-Olea, E. (2012). "Sorghum as a multifunction crop for the production of fuel ethanol: current status and future trends," in Bioethanol, ed M.A.P. Lima (London, UK: InTech).
- Shen, J., & Agblevor, F. A. (2008). Optimization of enzyme loading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate. *Biochemical Engineering Journal*, 41(3), 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.05.001>
- Sipos, B., Réczey, J., Somorai, Z., Kádár, Z., Dienes, D. & Réczey, K. (2009). Sweet sorghum as feedstock for ethanol production: enzymatic hydrolysis of steam-pretreated bagasse, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol.153, No. 1-3 (May 2009) pp. 151– 162, ISSN 0273-2289.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D.,2008a. Determination of extractives in biomass. Technical Report.NREL/TP-510-42618.Available from: http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008b.Determination of ash in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42622. Available from: http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D.,2008c. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report.NREL/TP-510-42618.Available from: http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- Sokan-Adeaga Adewale, A., Ana Godson, R., Sokan-Adeaga, M. and Sokan-Adeaga, E. (2016). Lignocelluloses: An Economical and Ecological Resource for Bio-Ethanol Production – A Review. *International Journal of Natural Resource Ecology and Management.*, 1(3), pp.128-144.
- Srinivasa Rao P, Rao SS, Seetharama N, Umakath AV, Sanjana Reddy P, Reddy BVS and Gowda CLL. 2009. Sweet sorghum for biofuel and strategies for its improvement. Information Bulletin No. 77. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 80 pp. ISBN: 978-92-9066-518-2 Order code: IBE 077.
- Tesso, T.T., Clafflin, L.E., Tuinstra, M.R., 2005. Analysis of stalk rot resistance and genetic diversity among drought tolerant sorghum genotypes. *Crop Sci.* 45, 645e652. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0645>.

- Umakanth, A., Kumar, A. A., Vermerris, W., & Tonapi, V. (2019). Sweet Sorghum for Biofuel Industry. *Breeding Sorghum for Diverse End Uses*, , 255–270. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101879-8.00016-4>
- Utrilla, J., Licona-Cassani, C., Marcellin, E., Gosset, G., Nielsen, L. K., & Martinez, A. (2012). Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for d-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metabolic Engineering*, 14(5), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.007>
- Utrilla, J., Vargas-Tah, A., Trujillo-Martínez, B., Gosset, G., & Martinez, A. (2016). Production of d -lactate from sugarcane bagasse and corn stover hydrolysates using metabolic engineered *Escherichia coli* strains. *Bioresource Technology*, 220, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.067>
- Van Niel, E. and Hahn-Hägerdal, B. (1999). Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5), pp.617-627.
- Vargas-Tah, A., Moss-Acosta, C. L., Trujillo-Martinez, B., Tiessen, A., Lozoya-Gloria, E., Orencio-Trejo, M., Martinez, A. (2015). Non-severe thermochemical hydrolysis of stover from white corn and sequential enzymatic saccharification and fermentation to ethanol. *Bioresource Technology*, 198, 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.036>
- Vidal, B. C., Dien, B. S., Ting, K. C., & Singh, V. (2011). Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion—A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(8), 1405–1421. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9221-3>
- Wee Y, Kim J, Ryu H (2006) Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol Biotechnol* 44:163–172
- Zhao, X., Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(5), 561–579. <https://doi.org/10.1002/bbb.1350>
- Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO (2003) Functional replacement of the *Escherichia coli* D-(-)-Lactate dehydrogenase gene (ldhA) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (ldhL) from *Pediococcus acidilactici*. *Appl Env Microbiol* 69:2237–2244. <https://doi:10.1128/AEM.69.4.2237>