



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS
DE HIDALGO**



FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

**FERMENTACION DE HIDROLIZADOS DE BAGAZO DE AGAVE EN PLANTA
PILOTO PARA LA PRODUCCION DE BIOETANOL**

Tesis que presenta:

P.I.Q. Emmanuel Alejandro Aguilar López

Para Obtener el Grado de:

INGENIERO QUIMICO

Asesor de Tesis:

Doctor en Ciencias en Ingeniería Química Agustín Jaime Castro Montoya

Co-asesor:

Maestro en Ciencias en Tecnología de la Madera Juan Carlos Farías Sánchez

MORELIA, MICH.

AGOSTO 2015

RESUMEN

El siguiente trabajo tiene como objetivo estudiar el comportamiento del proceso de sacarificación y fermentación de residuos sólidos de la planta de *agave tequilana Weber* a nivel planta piloto, aprovechando el material lignocelulósico que se obtiene al generar bioetanol de primera generación.

Estudios realizados han comprobado que la composición química del bagazo tiene propiedades que pueden ser empleadas en la producción de etanol a partir de pretratamientos que rompan y penetren la pared celular. Esta ruptura ayuda a procesar los azúcares del material holocelulósico, y posteriormente fermentarlos con alguna levadura o bacteria.

Cabe mencionar que el bagazo contiene microorganismos nativos los cuales pueden ayudar a que la fermentación sea más rápida y puedan producir alcohol con algún otro microorganismo externo, sin embargo un inconveniente presente es la poca selectividad, debido a que estos podrían fermentar y a su vez generar productos secundarios no deseables al cambiar su ruta metabólica por el contacto con el aire. Es por eso que es necesario primeramente caracterizar la materia sólida antes de entrar al reactor para determinar los porcentajes presentes de celulosa, hemicelulosa y lignina. Posteriormente realizar un pretratamiento a la materia sólida, seguida de un proceso de hidrólisis enzimática y finalizar con el proceso de fermentación a nivel planta piloto. Se tienen 3 procesos diferentes de hidrólisis (alcalina-oxidativa, ácida, combinada) de los cuales se seleccionará el que genere la mayor cantidad de azúcares fermentables y una mayor concentración de alcohol.

Se describe una metodología para el proceso de sacarificación y fermentación, así como las condiciones de operación, para poderla llevar a cabo a nivel planta piloto en base a las proporciones que se adapten a la capacidad del reactor.

Palabras clave: material lignocelulósico, hidrólisis enzimática, azúcares fermentables.

ABSTRACT

The following work aims to study the behavior of saccharification and fermentation process waste solids *tequilana Weber agave* plant to pilot plant level, taking advantage of the lignocellulosic material obtained by generating first-generation bioethanol.

Studies have shown that the chemical composition of bagasse has properties that can be used in the production of ethanol from pretreatment to break and penetrate the cell wall. This breakdown helps to process sugars holocelulósico material and then ferment with any yeast or bacteria.

It is noteworthy that the bagasse contains native microorganisms which can help fermentation faster and can produce alcohol with some other external microorganism, however inconvenient this is the low selectivity, because these could ferment and turn generate products undesirable side by changing your metabolic pathway by contact with air.

That is why we must first characterize the solid material before entering the reactor to determine the percentages present cellulose, hemicellulose and lignin. Subsequently pretreat the solid matter, followed by an enzymatic hydrolysis process and end with the fermentation process to pilot plant level. There are 3 different processes of hydrolysis (alkaline-oxidative, acid combined) of which will be selected which generates the greatest amount of fermentable sugars and a higher concentration of alcohol.

A methodology for the saccharification and fermentation process and operating conditions described, so that it can be carried out at pilot plant level based on the proportions to suit the capacity of the reactor.

Keywords: lignocellulosic material, enzymatic hydrolysis, fermentable sugars.

INDICE

Contenidos	Pagina
Resumen	i
Abstract	ii
Contenidos	iii
Glosario	vii
Índice de Tablas	xi
Índice de Figuras	xii
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Justificación	4
1.3. Hipótesis	5
1.4. Objetivo general	5
1.4.1. Objetivos particulares	5
2. Marco teórico	6
2.1. Biocombustibles	6
2.1.1. Biocombustibles de primera generación	8
2.1.2. Biocombustibles de segunda generación	8
2.1.3. Biocombustibles de tercera generación	9
2.2. Bioetanol	10
2.2.1. Bioetanol en la actualidad	11
2.2.2. Producción de bioetanol	14
2.3. Descripción de la planta de agave <i>tequilana Weber</i>	15
2.4. Composición de la biomasa lignocelulósica	18
2.4.1. Lignina	19
2.4.2. Celulosa	20
2.4.3. Hemicelulosa	21
2.5. Pretratamientos	22

2.5.1. Hidrólisis con pretratamiento ácido	24
2.5.2. Pretratamiento físico	24
2.5.3. Pretratamiento químico	24
2.6. Hidrólisis	25
2.6.1. Hidrólisis enzimática	26
2.6.2. Hidrólisis ácida	27
2.7. Fermentación	28
2.8. Destilación	32
2.9. Microorganismos empleados en fermentación	33
2.9.1. Levaduras	33
2.9.2. Bacterias	34
2.9.3. Hongos	35
2.9.4. Conversión de azúcares	35
3. Metodología	36
3.1. Materia lignocelulósica	36
3.2. Enzimas	36
3.3. Levaduras	36
3.4. Medio de conservación sólido	36
3.5. Medio de conservación líquido	38
3.6. Medio líquido de fermentación	38
3.7. Reactivos	39
3.8. Descripción de la Planta Piloto	39
3.9. Porcentaje de humedad	41
3.10. Determinación de Holocelulosa en la materia sólida a partir de la técnica de hidrólisis ácida cuantitativa	42
3.11. Determinación de lignina en la materia sólida	43
3.12. Pretratamientos	44
3.12.1. Pretratamiento alcalino-oxidativo	44
3.12.2. Pretratamiento combinado	45
3.12.3. Pretratamiento ácido	46
3.13. Determinación de pH	47

3.14.	Hidrólisis enzimática	47
3.14.1.	Condiciones de operación de la hidrólisis enzimática	47
3.14.2.	Hidrólisis alcalino-oxidativa	49
3.14.3.	Hidrólisis combinada	50
3.14.4.	Hidrólisis ácida	51
3.15.	Fermentación	52
3.15.1.	Condiciones de operación de la fermentación	52
3.15.2.	Fermentación de hidrólisis alcalino-oxidativa	54
3.15.3.	Fermentación de hidrólisis combinada	54
3.15.4.	Fermentación de hidrólisis ácida	55
3.16.	Determinación de azúcares y etanol mediante la técnica por HPLC.	56
4.	Resultados y discusiones	58
4.1.	Porcentaje de humedad en la muestra inicial	58
4.2.	Composición de holocelulosa en el bagazo	58
4.3.	Composiciones de lignina en la biomasa	59
4.4.	Cuantificación de materia en cada proceso del pretratamiento y al término de la fermentación	59
4.5.	Resultados obtenidos con el pretratamiento alcalino-oxidativo	62
4.5.1.	Concentración de azúcares fermentables	62
4.5.2.	Concentración de bioetanol final	63
4.5.3.	Rendimiento total	64
4.6.	Resultados obtenidos con el pretratamiento combinado	65
4.6.1.	Concentración de azúcares fermentables	65
4.6.2.	Concentración de bioetanol final	66
4.6.3.	Rendimiento total	67
4.7.	Resultados obtenidos con el pretratamiento ácido	68
4.7.1.	Concentración de azúcares fermentables	68
4.7.2.	Concentración de bioetanol final	69
4.7.3.	Rendimiento total	70

4.8. Comparación de los rendimientos arrojados por los 3 procesos	71
5. Conclusiones y recomendaciones	74
6. Bibliografía	77

GLOSARIO

- **Aldopentosa:** Las pentosas son monosacáridos (glúcidos simples) formados por una cadena de cinco átomos de carbono.
- **Bagazo:** Residuo sólido del *agave tequilana Weber* después de la extracción del jugo de las piñas.
- **Bioetanol:** Es un tipo de biocombustible o biocombustible, el cual se produce de la fermentación de cultivos agrícolas que contienen azúcares, almidones o celulosa.
- **Biogás:** Combustible, mezcla de metano y dióxido de carbono, junto con otros gases en menor proporción, que se produce por descomposición anaeróbica de la materia orgánica.
- **Biomasa:** Cantidad de materia orgánica que hay por unidad de volumen en un medio.
- **Cepa:** Conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.
- **Colonia:** Conjunto de microorganismos en un medio de cultivo sólido visible microscópicamente.
- **Detoxificación:** Denominado así porque su aplicación busca eliminar todas aquellas sustancias que pudieron formarse durante el sometimiento de la materia prima al pretratamiento, y que resultan tóxicas e inhibitorias en la fermentación.

- **Endoglucanasas:** Se refiere a un conjunto de enzimas producidas principalmente por hongos, bacterias, y protozoarios que catalizan en la hidrólisis de la celulosa.
- **Enzimas:** Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones químicas en los seres vivos. No hacen factibles las reacciones imposibles, sino que solamente aceleran las que espontáneamente podrían producirse.
- **Esterilización:** Destrucción gradual de la vida bacteriana mediante un incremento en la temperatura por sobre 85°C.
- **Etanol:** Compuesto químico, también llamado alcohol etílico. Es un alcohol incoloro e inflamable, con un punto de ebullición de 78°C. Al mezclarse con agua en cualquier proporción, da una mezcla azeotrópica, lo cual dificulta su extracción para concentraciones de agua menores al 10%.
- **Exoglucanasas:** Es un tipo de enzima bajo estricta consideración por su potencial para contribuir a las necesidades energéticas de los mundos a través del papel que desempeña en la creación de etanol celulósico.
- **Glucosa:** Isómero de la fructosa que consta de 6 carbonos.
- **Hidrólisis:** Reacción química entre una sustancia y agua.
- **Incubación:** Almacenamiento de cultivos en condiciones adecuadas.
- **Inóculo:** Suspensión de microorganismos vivos que se han adaptado para reproducirse en un medio específico.
- **Mezcla azeotrópica:** Mezcla líquida de dos o más sustancias que se comporta como una sustancia única, en el hecho que el vapor producido

por la evaporación parcial del líquido tiene la misma composición que el líquido. La mezcla en ebullición constante muestra un punto máximo o mínimo de ebullición, comparado con el de otras mezclas de las mismas sustancias.

- **Mol:** Unidad de masa con que se mide la cantidad de sustancia.
- **Molienda:** Proceso mediante el cual se extrae el jugo de diversos productos, tales como la planta de agave.
- **Parámetro:** Variable utilizada para controlar un proceso determinado.
- **Polisacárido:** cadena lineal conformada por monosacáridos.
- ***Saccharomyces cerevisiae*:** Es un hongo unicelular, un tipo de levadura utilizado industrialmente en la fabricación de pan, cerveza y vino.
- ***Trichoderma Reesei*:** Es un hongo mesófilo y filamentosos. Se trata de un anamorfo del hongo *Hypocrea jecorina*. Tiene la capacidad de secretar grandes cantidades de enzimas celulolíticas (celulasas y hemicelulasas).
- **Vía de Entner-Doudoroff:** Describe una serie alternativa de reacciones, que catabolizar la glucosa a piruvato utilizando un conjunto de enzimas diferentes de los utilizados en cualquiera de la glucólisis o la vía de las pentosas fosfato. La mayoría de las bacterias utilizan la glucólisis y de la vía de las pentosas fosfato. Esta vía se informó por primera vez en 1952 por Michael Doudoroff (1911-1975) y Nathan Entner.
- **Xilosa:** Es una aldopentosa, un monosacárido que contiene cinco átomos de carbono y que contiene un grupo funcional aldehído- que tiene un isómero funcional que es la Xilulosa.

- ***Zymomonas Mobilis***: es una bacteria que pertenece al género *Zymomonas*. Se destaca por su capacidad de producción de bioetanol, que superan la levadura en algunos aspectos. Degrada azúcares a piruvato utilizando la vía de Entner-Doudoroff. El piruvato se fermenta para producir etanol y dióxido de carbono como los únicos productos.

INDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
Tabla 1.	Propiedades físico-químicas de la gasolina y el etanol.	13
Tabla 2.	Composición química del agave <i>tequilana Weber</i> .	17
Tabla 3.	Monosacáridos clasificados respecto al número de carbonos.	25
Tabla 4.	Comparativa entre los resultados experimentales obtenidos de holocelulosas y citas de porcentajes lignocelulósicos.	58
Tabla 5.	Comparativa entre los resultados experimentales obtenidos de lignina y citas de porcentajes lignocelulósicos.	59
Tabla 6.	Resultados resumidos a la entrada y salida del pretratamiento.	60
Tabla 7.	Cuantificaciones finales en la etapa de fermentación para los 3 procesos.	61
Tabla 8.	Porcentaje de biomasa sobrante de cada proceso.	61
Tabla 9.	Comparativa de los rendimientos en cuanto a la obtención de azúcares en el proceso de hidrólisis.	71
Tabla 10.	Comparativa de las concentraciones de etanol en los 3 procesos.	71
Tabla 11.	Comparativa de los rendimientos en cuanto a la conversión de azúcares a alcohol para cada proceso.	72
Tabla 12.	Comparativa de los rendimientos totales a partir de la materia sólida seca a pretratar.	72
Tabla 13.	Tabla comparativa de las concentraciones que se obtuvieron a nivel laboratorio.	73

INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Fig. 1	Volumen de producción de agave tequilana a nivel nacional.	2
Fig. 2	Esquema de la producción de bioetanol a partir de varias fuentes de materia prima.	7
Fig. 3	Principales productores a nivel mundial de bioetanol.	12
Fig. 4	Usos a nivel mundial del bioetanol.	12
Fig. 5	Diagrama de bloques de la secuencia del proceso para obtener bioetanol.	14
Fig. 6	Fotografía de una piña de Agave Tequilana.	16
Fig. 7	Estructura de la biomasa lignocelulósica.	18
Fig. 8	Estructura de la lignina.	19
Fig. 9	Estructura de la celulosa.	20
Fig. 10	Estructura de la hemicelulosa.	21
Fig. 11	Ruptura de la pared celular mediante los pretratamientos.	22
Fig. 12	Representación de la hidrólisis de un polisacárido.	25
Fig. 13	Reacción global para la obtención de bioetanol partiendo de la glucosa.	29
Fig. 14	Gráfico de la ruta de producción de bioetanol a nivel mundial.	30
Fig. 15	Diagrama demostrativo de la reacción continua para producir etanol a partir de glucosa.	31
Fig. 16	Proceso global para convertir los polímeros de la biomasa en bioetanol.	32
Fig. 17	Medio de conservación sólido sembrado con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	37
Fig. 18	Imagen de la planta piloto.	40

Fig. 19	Muestra húmeda resultante del prensado de las piñas.	41
Fig. 20	Muestra final de la técnica para la determinación de Lignina.	43
Fig. 21	Reacción efectuada al agregar el peróxido en la parte final del pretratamiento.	45
Fig. 22	Porción que ilustra la apariencia de la materia sólida al término y secado de un pretratamiento ácido.	46
Fig. 23	Esquema del proceso de hidrólisis.	48
Fig. 24	Equipo airlock empleado para la liberación de CO ₂ durante la etapa de fermentación.	52
Fig. 25	Esquema del proceso de fermentación.	53
Fig. 26	Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) empleado para analizar muestras de agave para su caracterización.	57
Fig. 27	Gráfica que muestra el avance en la producción de azúcares mediante el proceso de hidrólisis con el pretratamiento alcalino-oxidativo.	62
Fig. 28	Gráfica que muestra el avance en la producción de bioetanol mediante el proceso de fermentación de una hidrólisis alcalina-oxidativa	63
Fig. 29	Gráfica que muestra el avance en la producción de azúcares mediante el proceso de hidrólisis con el pretratamiento combinado.	65
Fig. 30	Gráfica que muestra el avance en la producción de bioetanol mediante el proceso de fermentación de una hidrólisis combinada	66
Fig. 31	Gráfica que muestra el avance en la producción de azúcares mediante el proceso de hidrólisis con el pretratamiento ácido.	68
Fig. 32	Gráfica que muestra el avance en la producción de bioetanol durante la etapa de fermentación de hidrólisis ácida	69

1. INTRODUCCIÓN

El etanol es uno de los biocombustibles más importantes que se produce, a precios muy competitivos, a partir de sustratos renovables como la caña de azúcar en Brasil, y el maíz en Estados Unidos.

Debido a que la producción mundial actual no es suficiente para satisfacer la demanda de energía, se han desarrollado otros procesos biotecnológicos que utilizan residuos agrícolas y forestales, ricos en celulosa y lignina, como sustratos para la obtención de etanol. Estos procesos tienen la desventaja de requerir como paso adicional, la sacarificación previa de los materiales lignocelulósicos. En México, desde hace varios siglos, se producen bebidas alcohólicas y destiladas a partir de agaves, y recientemente subproductos de las industrias tequilera y mezcalera se utilizan en la producción de bioetanol.

1.1. ANTECEDENTES

En la actualidad la producción de bioetanol de primera generación es uno de los procesos con mayor impacto a nivel mundial. Sin embargo, el aprovechamiento de las nuevas tecnologías en conjunto con los residuos lignocelulósicos provenientes de diversos procesos, puede aprovecharse para realizar nuevos bioprocesos teniendo como principal objetivo el disminuir la cantidad final de residuo producido [1].

Los principales productores de bioetanol llevan a cabo el proceso completo con materias primas altas en contenido de azúcares, tales como la caña de azúcar y granos comestibles que son los más ampliamente difundidos y conocidos desde la antigüedad. Sin embargo el inconveniente presente, es que, éstos son de consumo humano siendo primordiales en su alimentación [2].

En México ha comenzado el desarrollo en la producción de biocombustibles, aunque los avances tecnológicos que en la actualidad existen en cuestión de energías alternas son pocas y solamente a nivel experimental (laboratorio), es decir, sólo para satisfacer necesidades de autoconsumo de algunas empresas y procesos locales [3]. La Figura 1 da un comparativo de la producción de agave tequilana a nivel nacional.

Esta situación genera una desventaja ante países como Brasil, quién tiene tiempo aplicando políticas de bioenergía tendiente a lograr la seguridad energética. En México el uso de granos o caña de azúcar son de primer consumo, sin embargo son materias primas con una amplia concentración de azúcares que pueden ser fermentables y de los cuales se tienen estudios a nivel mundial con resultados favorables.

Es por eso que a nivel nacional se ha optado por otra fuente de materia prima para la producción de etanol anhidro, tal es el caso del residuo generado en la industria tequilera, en donde la oferta de cosechas es mayor a la demanda que presenta la industria. Por tal motivo anualmente las pérdidas de agave son altas y los precios de esta materia prima tienden a bajar [4].

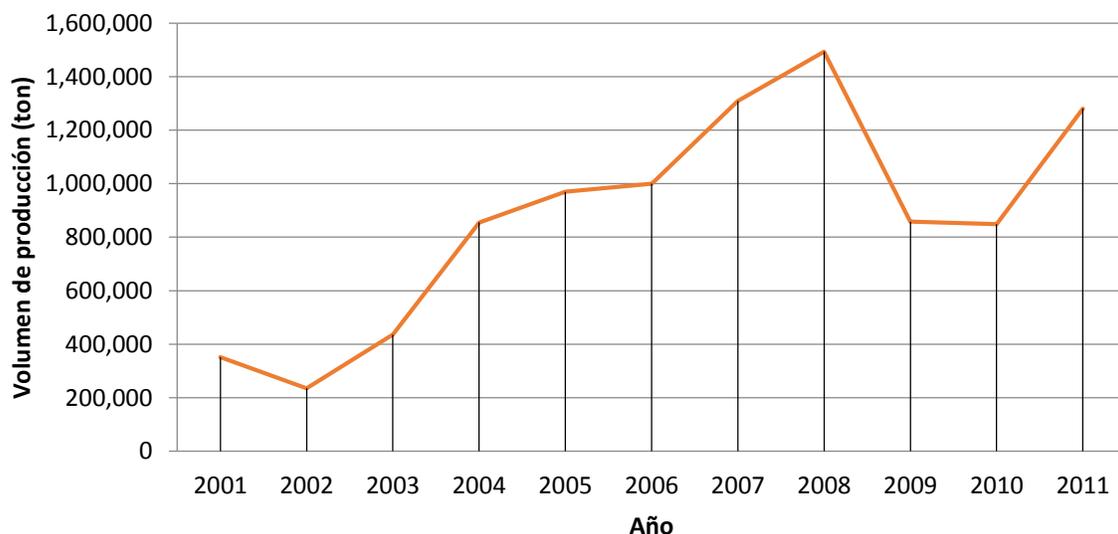


Fig. 1: Volumen de producción de agave tequilana a nivel nacional.

Fuente: SAGARPA.

Cada año se generan 52,000 toneladas de cultivos agrícolas, 2379 toneladas de bagazo proveniente de la industria tequilera, 17689 toneladas de residuos de los ingenios azucareros. Todos estos residuos son fuente importante de materia prima para la producción de bioenergéticos.

La producción de agave a nivel nacional se centra en 5 estados, los cuales, junto con sus respectivos municipios son los siguientes: [4]

- Jalisco
- Guanajuato: Abasolo, Ciudad Manuel Doblado, Cuerámara, Huanímaro, Pénjamo, Purísima del Rincón y Romita.
- Michoacán: Chavinda, Chilchota, Churintzio, Cotija, Ecuandureo, Jacona, Jiquilpan, Maravatío, Nuevo Parangaricutiro, Numarán, Pajacuarán, Peribán, La Piedad, Régules, Los Reyes, Sahuayo, Tancítaro, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tanhuato, Tingüindín, Tocumbo, Villamar, Vistahermosa, Yurécuaro, Zamora y Zináparo.
- Nayarit: Ahuacatlán, Amatlán de Cañas, Ixtlán, Jala, Xalisco, San Pedro de Lagunillas, Santa María del Oro y Tepic;
- Tamaulipas: Aldama, Altamira, Antigua de Morelos, Gómez Farías, González, Llera, Mante, Nuevo Morelos, Ocampo, Tula y Xicoténcatl.

El consumo de agave *tequilana Weber* para la producción de biocombustibles no afecta o corrompe la dieta y vida diaria de la población a nivel nacional, además, favorece a los productores primarios de dicha materia prima, ya que a mediano-largo plazo, la demanda de agave tanto por el sector tequilero, como el de la industria de biocombustibles puede llegar a ser igual a la oferta. Realizando una comparativa con otros países, en México sólo 9.5% de la oferta total de energía es renovable, mientras que en Brasil 38.7% de su energía es de fuentes renovables [4].

1.2. JUSTIFICACION

Actualmente los problemas en cuestión de materia energética son un tema importante dado la diversidad de conflictos ambientales que se tienen hoy en día. Por lo cual es necesario realizar estudios encaminados a desarrollar nuevas tecnologías de producción de biocombustibles cuyas combustiones disminuyan la producción de gases de efecto invernadero.

México ha presentado iniciativas para introducir el etanol combustible como aditivo de las gasolinas; sin embargo, no se han podido implementar ya que no hay autosuficiencia en la producción de este combustible, por lo que se han definido temas estratégicos convocados para la presentación de propuestas de desarrollo científico y tecnológico que puedan satisfacer esta demanda. El estudio y el análisis del *agave tequilana Weber* conllevará a la exploración de una nueva alternativa para la obtención de etanol combustible a partir de una materia prima diferente a las empleadas comúnmente y de dónde se propone dar respuesta a varias interrogantes con respecto a la factibilidad de emplear el agave tequilana, como son:

- La búsqueda de nuevas alternativas en combustibles que sean rentables y que disminuyan la emisión de gases de efecto invernadero.
- El aprovechamiento de residuos agrícolas provenientes de la industria tequilera.
- Impulsar y reactivar la actividad agrícola en el país.

En el presente trabajo se propone la producción de bioetanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos de *agave tequilana Weber*, generados durante la producción de un proceso previo. La producción de este biocombustible se hará a nivel planta piloto desde la parte del pretratamiento, culminando con la fermentación, llevando a cabo 3 procesos diferentes con los cuales se determinara cuál de ellos es viable a esta escala para su implementación a nivel industrial.

1.3. HIPOTESIS

La producción de bioetanol de segunda generación es un proceso viable y con buenos rendimientos a nivel laboratorio, los cuales pueden ser escalados a nivel planta piloto mediante 3 procesos diferentes. Por lo tanto, se espera que los resultados a nivel planta piloto sean similares a los rendimientos que se obtuvieron con anterioridad.

1.4. OBJETIVO GENERAL

- Obtener un biocombustible de segunda generación aplicando los conocimientos teóricos respecto al proceso completo que conlleva la fermentación empleando como materia prima la biomasa del agave, manipulando de manera correcta y la planta piloto en donde se llevara a cabo su producción, partiendo de diversos pretratamientos, seleccionando aquel que presente los mejores rendimientos.

1.4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar la materia prima y compararla con la reportada en la bibliografía.
- Desarrollar una metodología viable a nivel planta piloto considerando los imprevistos que pudieran presentarse durante el proceso y elevando el rendimiento de la biomasa, junto con las condiciones óptimas de operación.
- Determinar la composición porcentual de azúcares individuales obtenidos en la etapa de Hidrólisis realizando una comparativa a diferentes tiempos.
- Comparar los rendimientos finales de las concentraciones de bioetanol obtenido en la etapa de fermentación de cada uno de los procesos.
- Seleccionar el proceso que arroje la mayor conversión de azúcares reductores a alcohol.

2. MARCO TEORICO

2.1. BIOCOMBUSTIBLES

Como biocombustible se puede definir a todo aquel combustible de origen biológico obtenido de manera renovable a partir de restos orgánicos. Desde una perspectiva etimológica, serían los combustibles de origen biológico, pero esta definición incluiría el petróleo, ya que este procede de restos fósiles que existen desde la antigüedad. Una definición más certera sería que son aquellos combustibles renovables obtenidos de manera biológica a partir de restos orgánicos. Los biocombustibles constituyen la primera fuente de energía que conoció la humanidad. Entre las fuentes de los biocombustibles, están la biomasa proveniente de cultivos como caña de azúcar, maíz, sorgo, residuos de agave, yuca y otros, usada para producir etanol [5].

Los biocombustibles en estado líquido pueden ser definidos como aquellos producidos a partir de biomasa con fines de transporte o producción de calor.

Estos pueden ser producidos a partir de productos agrícolas, forestales y de la parte biodegradable de los residuos industriales y municipales. El término biocombustible se refiere a los combustibles líquidos o gaseosos para el sector de transporte, que son predominantemente producidos por la biomasa [6].

Actualmente se tienen términos respecto a los biocombustibles en base a una clasificación, la cual desglosa en biocombustibles de primera, segunda y tercera generación, pero no hay definición técnica estricta para tales designaciones.

La Figura 2 muestra las vías viables para producir bioetanol de primera, segunda y tercera generación a partir de diferentes fuentes de materias primas.

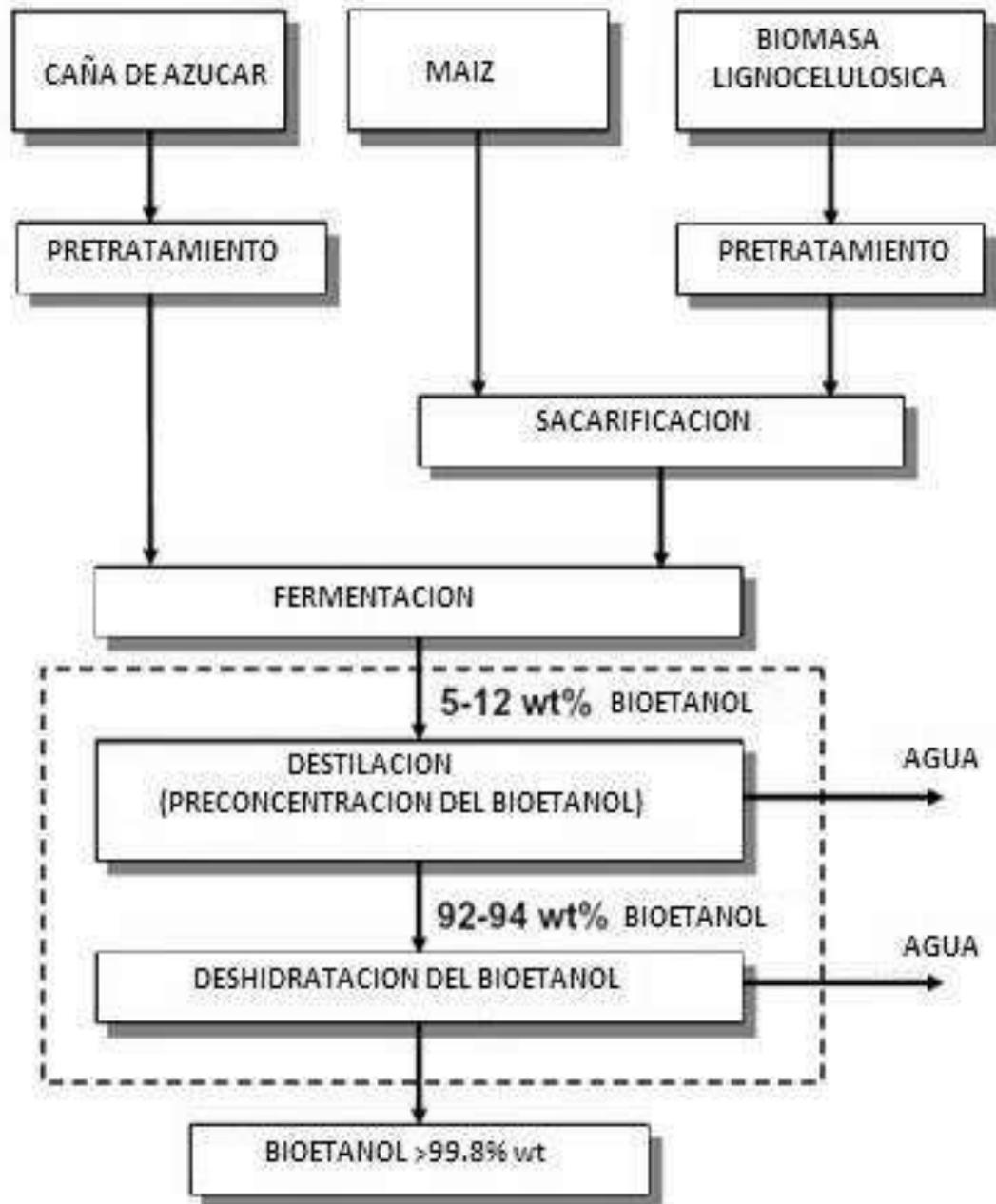


Fig. 2: Esquema de la producción de bioetanol a partir de varias fuentes de materia prima

2.1.1. BIOCOMBUSTIBLES DE PRIMERA GENERACION

Los biocombustibles de primera generación son todos aquellos que se producen de azúcar, almidón y aceites de plantas tradicionales como caña de azúcar, trigo, maíz, palma aceitera y soya, materias primas de fuentes alimenticias. Esos biocombustibles (etanol) ya son producidos y comercializados en cantidades significativas por diversos países.

Su característica principal es la abundancia de hidratos de carbono en su estructura molecular. Los biocombustibles de primera generación son producidos empleando metodologías como la fermentación, transesterificación, y la digestión anaerobia. De estos procesos se obtiene etanol, biodiesel y biogás.

Una de las principales ventajas de estos biocombustibles es que son de procesamiento sencillo, además de reducir las emisiones de contaminantes y generando un equilibrio ambiental evitando la propagación del efecto invernadero [7].

Este tipo de combustibles solo requiere cantidades de azúcares reductores, los cuales son base para poder llevar a cabo un proceso de fermentación y posteriormente, con un proceso de destilación obtener el biocombustible.

2.1.2. BIOCOMBUSTIBLES DE SEGUNDA GENERACION

Los combustibles de segunda generación tienen como materias primas los residuos sólidos provenientes de bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz, paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles, o de pulpa.

También se conocen como biocombustibles celulósicos, debido a que se elaboran de materias primas no alimenticias como residuos agroindustriales de alta producción de biomasa.

Su producción es más compleja y se clasifican según el proceso bioquímico o termoquímico utilizado en la conversión de biomasa:

- Bioquímicos: Hidrólisis enzimática, fermentación, sacarificación y fermentación simultánea.
- Termoquímicos: Pirolisis, gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch.

La síntesis de Fischer-Tropsch que también se conoce como proceso GTL (Gas To Liquids) y proceso BTL (Biomass To Liquids). Estos procesos consisten en la gasificación del carbón y de la materia lignocelulósica de la biomasa, para después sintetizar algún combustible líquido [7].

Las tecnologías para la conversión de biomasa celulósica a biocombustibles son existentes, pero no son aplicadas a gran escala.

2.1.3. BIOCOMBUSTIBLES DE TERCERA GENERACION

Los biocombustibles de tercera generación son aquellos que provienen de la materia prima modificada genéticamente de modo que facilita los procesos siguientes.

Para estos combustibles se utilizan insumos vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos. Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verde azules.

2.2. BIOETANOL

El etanol o bioetanol es un combustible, es decir, libera significativas cantidades de calor al quemarse. Sin embargo, presenta algunas diferencias importantes con relación a los combustibles convencionales derivados de petróleo. El bioetanol se puede emplear directamente como un único combustible en vehículos, o como compuesto oxigenado de la gasolina aumentando su contenido y permitiendo una mejor oxidación de hidrocarburos, reduciendo la cantidad de compuestos aromáticos y el monóxido de carbono liberado a la atmósfera. Las características del etanol posibilitan la combustión más limpia y un mejor desempeño como combustible, lo que contribuye a reducir las emisiones contaminantes, aún al mezclarlo con la gasolina. En estos casos, actúa como un verdadero aditivo para el combustible normal, mejorando sus propiedades. Posee un poder calorífico de 29,000 KJ/Kg [8]. El etanol tiene como propiedades físicas y termodinámicas las siguientes características: [9]

- Líquido diáfano de olor característico
- Sabor picante
- Volátil
- Considerado inflamable
- Viscosidad (cP): 1.17 (a 20°C)
- Punto de ebullición normal de 78.4 °C
- Punto de fusión de -130°C
- Solubilidad: Miscible con agua en todas proporciones, éter, metanol, cloroformo y acetona.
- Densidad 0.7893 a 20 °C
- Límites de explosividad van de 3.3 a 19%
- Presión de vapor a 20 °C es de 59 mm Hg

El etanol (C₂H₆O) forma un azeótropo con el agua a un intervalo de 95-96% en volumen debido a la constitución química que presenta y el comportamiento de la molécula al sustituir un elemento por un radical [10].

2.2.1. BIOETANOL EN LA ACTUALIDAD

El bioetanol es sin duda una opción factible entre la amplia gama de los biocombustibles, siendo una de las mejores alternativas para reducir los daños del efecto invernadero que producen las combustiones de los combustibles fósiles. Las propuestas presentes en las cuales se justifica al bioetanol como una opción viable de combustible son las siguientes:

- Proviene de una materia prima renovable. En el caso del *agave tequilana Weber* se tiene conocimiento de que en la actualidad la demanda de esta materia es menor a la oferta, lo que genera un gran desperdicio de agave. Por esta razón se puede aprovechar toda la producción que no es consumida por la industria tequilera [11-12].
- Se ha comprobado experimentalmente que los combustibles provenientes de bioetanol reducen las emisiones de monóxido y dióxido de carbono en una gran proporción teniendo un estimado de hasta en un 65% a 70%, al igual que una disminución considerable de las emisiones de óxido de nitrógeno [11].
- Las investigaciones que se han realizado, aunado con el avance tecnológico que presenta Brasil y Estados Unidos como potencias en la producción de bioetanol, muestran la factibilidad de la mezcla bioetanol-gasolina, la cual genera un aumento de octanaje, disminuye la contaminación de aditivos sintéticos y puede ser utilizable en gran parte de los motores [13].

La producción de bioetanol a nivel mundial se centra en 2 países potenciales principalmente Estados Unidos de Norteamérica y Brasil, seguidos de China y Europa. Hasta hace algunos años Brasil se mantenía por encima de Estados Unidos. Sin embargo un estudio elaborado en 2010 arrojó que Estados Unidos ha rebasado el volumen de producción respecto a Brasil como se muestra en la Figura 3 [14].

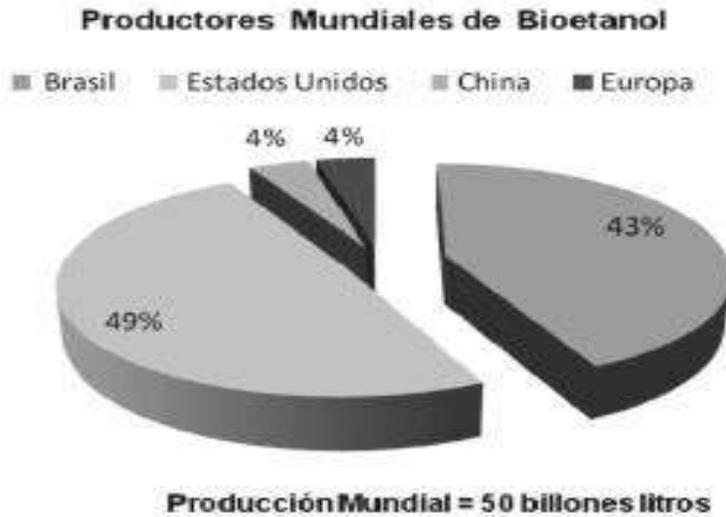


Fig. 3: Principales productores a nivel mundial de bioetanol

Fuente: Ministerio Federal de cooperación Económica y Desarrollo de México.

Actualmente han implementado programas para la producción de etanol combustible o la adición de etanol a la gasolina. De acuerdo a la Asociación de Combustibles Renovables (RFA), la sustitución de la gasolina por bioetanol ayuda a reducir entre un 30 a 50 % las emisiones de dióxido de carbono (CO₂). La Figura 4 muestra los usos a nivel mundial que se le dan al bioetanol, la cual arroja también un crecimiento bastante elevado. Como es notable en el esquema, la utilización de etanol como biocombustible va a la alza.

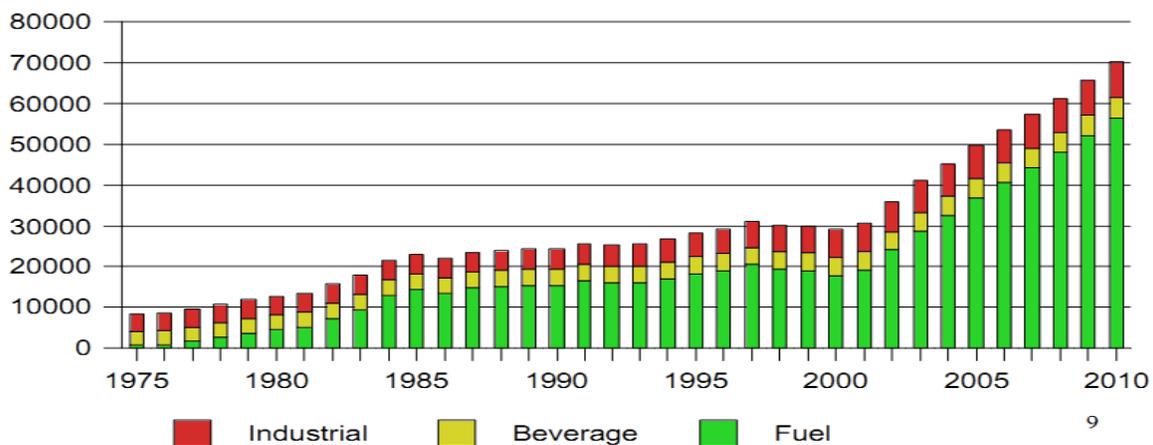


Fig. 4: Usos a nivel mundial del bioetanol

Se puede hacer un comparativo entre las características de la gasolina y el etanol como biocombustible tal como se reporta en la Tabla 1, en el que se puede realizar un análisis desde un punto de vista más objetivo. A pesar de tener propiedades con variación, la mezcla gasolina-etanol se ha demostrado que no presenta efectos secundarios en los motores de los vehículos, siendo viable. Por lo tanto la calidad del combustible se mantiene, cambiando el sentido ambiental y competitivo en cuestión de costos.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de la gasolina y el etanol

Parámetro	Unidad	Gasolina	Etanol
Poder calorífico inferior	kJ/kg	43.500	28.225
	kJ/litro	32.180	22.350
Densidade	kg/litro	0,72 – 0,78	0,792
Octanaje RON (<i>Research Octane Number</i>)	-	90 – 100	102 – 130
Octanaje MON (<i>Motor Octane Number</i>)	-	80 – 92	89 – 96
Calor latente de vaporización	kJ/kg	330 – 400	842 – 930
Relación aire/combustible estequiométrica		14,5	9,0
Presión de vapor	kPa	40 – 65	15 – 17
Temperatura de ignición	°C	220	420
Solubilidad en agua	% en volumen	~ 0	100

La idea de una mezcla gasolina-etanol está dada a razón de que la tecnología actual predominante está orientada al consumo de gasolina nada más, el cambio hacia etanol no puede hacerse de manera inmediata, debido a que actualmente la producción de bioetanol se rige solamente en 2 países. Un automóvil que esté diseñado para funcionar con gasolina puede operar sólo con etano, dicho alcohol tiene un índice de octano mayor que la mayoría de las gasolinas. Por esta razón se hace necesario hacer mezclas de alcohol y gasolina que hasta en un 10% en volumen pueden hacer funcionar un motor de combustión interna de gasolina sin ocasionarle ningún problema.

Estas mezclas se conocen como E5, E10, E15 y E20 denominadas así por su contenido de etanol anhidro en volumen.

No obstante la larga experiencia con el etanol como combustible en algunos países, en particular Brasil, es notable como, en diversos países donde el etanol todavía no se utiliza regularmente, subsisten prejuicios y desinformaciones sobre las reales condiciones de uso y las ventajas que se deben asociar a este combustible y aditivo [15].

2.2.2. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

En cuanto a la producción de bioetanol en términos generales la secuencia del proceso parte a primera instancia en la recepción de la materia prima, la cual es pasada a través de un molino de cuchillas amplias los cuales muelen y trituran al agave separándola tanto en jugos como en bagazo, con lo cual se puede obtener bioetanol de primera y segunda generación. Posteriormente son llevados a un proceso de prensado el cual exprime la biomasa concentrando en mayor cantidad el volumen de jugos extraídos de la biomasa. Las fases anteriores son referidas a procesos físicos, sin embargo la parte fundamental en la cual se centra el proceso de transformación de azúcares a bioetanol consta de tres etapas básicas dentro del proceso, estas son: hidrólisis, fermentación y destilación.

La Figura 5 muestra la secuencia que debe contemplar dicho proceso.

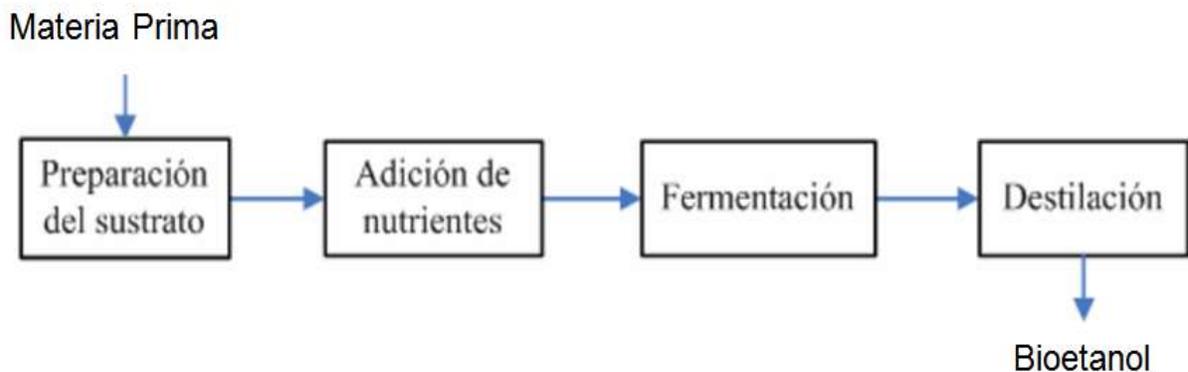


Fig. 5: Diagrama de bloques de la secuencia del proceso para obtener bioetanol

Actualmente los avances tecnológicos presentes para la formulación de nuevos biocombustibles son amplios, se conocen 3 metodologías para la obtención de bioetanol por fermentación de la biomasa, los cuales son los siguientes:

- La primera consiste en la fermentación directa de los polímeros partícipes mediante el uso de microorganismos productores de enzimas inulinasas.
- La segunda metodología consiste primeramente en hidrolizar previamente los concentrados mediante ácidos minerales y posteriormente llevar a cabo la fermentación a etanol por microorganismos que evitan la producción de inulinasas.
- La tercera opción factible en la actualidad consiste en realizar previamente la sacarificación de los concentrados de azúcares mediante un microorganismo productor de inulinasas y posteriormente fermentarlos con un microorganismo productor de etanol tal es el caso de alguna levadura.

2.3. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA DE AGAVE *TEQUILANA WEBER*

La planta de agave *tequilana weber* requiere de un periodo promedio 7 a 10 años para su desarrollo y sus ciclos de cultivo se ven afectados por las condiciones ambientales y diferencias genéticas de las plantaciones [16].

La planta del agave tequilero está conformada por dos partes principales que son: la cabeza o piña y las hojas, de ambos se pueden obtener azúcares que posteriormente bajo cierto proceso podemos transformar en alcohol.

La cabeza representa la parte comercial de la planta y el peso promedio de la cabeza del agave va de 30 a 70 kg, se tienen tendencias respecto a los pesos con dispersión que van de entre 80 y 120 kg, y dentro de estos, cabezas de hasta 150 kg y con un contenido de azúcares reductores totales entre 16 a 28% en peso

fresco. La Figura 6 ilustra una piña de agave de edad avanzada que se puede emplear para fermentaciones alcohólicas. Las pencas constituyen los residuos agrícolas del cultivo, representan del 45 al 50% del peso total de la planta, miden de 90-120 cm de longitud y de 8 a 12 cm de ancho y su contenido de azúcares reductores totales oscila entre 3.3 a 16.1% en peso fresco, lo cual depende de diversos factores tales como la edad de la planta y las condiciones agronómicas del cultivo entre otros [17].

El bagazo por si solo contiene sustancias que ayudan a la producción de bioetanol de segunda generación, siempre y cuando reciban los procesos adecuados para poder efectuar el proceso.



Fig. 6: Fotografía de una piña de Agave Tequilana

El bagazo de las piñas puede ser sometido a diversas pruebas con diferentes técnicas, en las cuales se puede determinar que compuestos son los que presenta y en qué cantidad se encuentran.

La tabla 2 resume las propiedades y cantidades que presenta el bagazo del agave tequilana [17].

Tabla 2. Composición química del agave *tequilana* Weber

Análisis	Valor
Humedad (%)	71
pH	5.4
Materia orgánica (% Base seca)	91.2
Cenizas (% Base seca)	8.8
Carbono orgánico total (% Base seca)	50.6
Nitrógeno total (% Base seca)	0.53
Relación C:N (% Base seca)	95.5
Fibra detergente neutra (% Base seca)	58.8
Fibra detergente ácida (% Base seca)	46.7
Hemicelulosa (% Base seca)	12.1
Celulosa (% Base seca)	41.9
Lignina (% Base seca)	7.2

2.4. COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Los materiales lignocelulósicos, como se muestra en la Figura 7, se conforman principalmente por 3 polisacáridos, estos son celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales se deben someter a pretratamientos termodinámicos y químicos para transformar las amplias cadenas de carbohidratos en azúcares fermentables para posteriormente efectuar el proceso de la hidrólisis. La biomasa lignocelulósica es un representante del material que no puede ser empleado como alimento [18]. Además de estas 3 sustancias, dentro de la materia lignocelulósica la biomasa presenta otros componentes, tales como las cenizas, proteína, pectina y metabolitos secundarios. Sin embargo estos compuestos no se encuentran dentro de la pared celular y cabe mencionar que la cantidad en la cual están presentes es mínima.

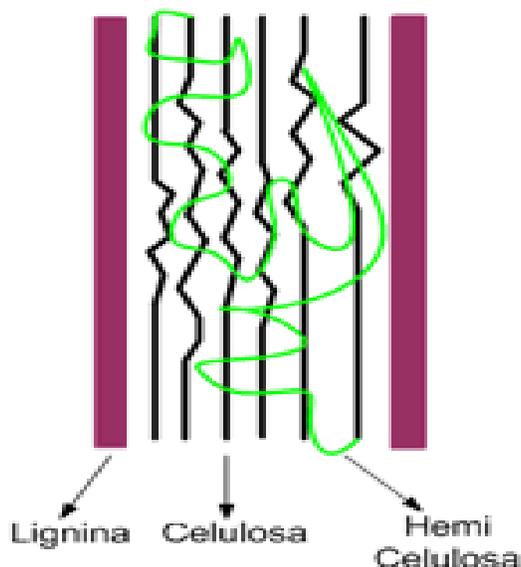


Fig. 7: Estructura de la biomasa lignocelulósica

La materia lignocelulósica se compone de 60 a 75% de celulosa y Hemicelulosa, sin embargo puede presentarse una variación de un $\pm 5\%$, esto puede adjudicarse a factores como el tiempo de las piñas, el periodo transcurrido

entre su recepción o del pretratamiento a realizarse. Entre un 25 a 40% del peso de la materia lignocelulósica contiene lignina, al igual que en las holocelulosas (conjunto que conforman los polímeros de celulosa y hemicelulosa) se tiene una variación de $\pm 5\%$ [19].

2.4.1. LIGNINA

La lignina es un polímero fenólico compuesto de unidades de fenil- propano unidos por enlaces C-C y C-O-C que forman una estructura amorfa tridimensional, la Figura 8 muestra la estructura química de la lignina. Dicho polímero a su vez está conformado por tres unidades básicas (guaiasilo, sinapilo y p-hidroxifenilo). Las unidades estructurales de la lignina son las cinamil alcohol, las cuales son diferenciadas por las varias sustituciones del anillo aromático. La lignina tiene un carácter hidrofóbico y su principal función es actuar como cementante en la pared celular del material. La producción de monómeros de lignina se realiza en el espacio intracelular por medio de un mecanismo oxidativo con 4-hidroxifenilpropanoides y de ahí es transportada a la pared celular por mecanismos que aún no son comprendidos del todo [20].

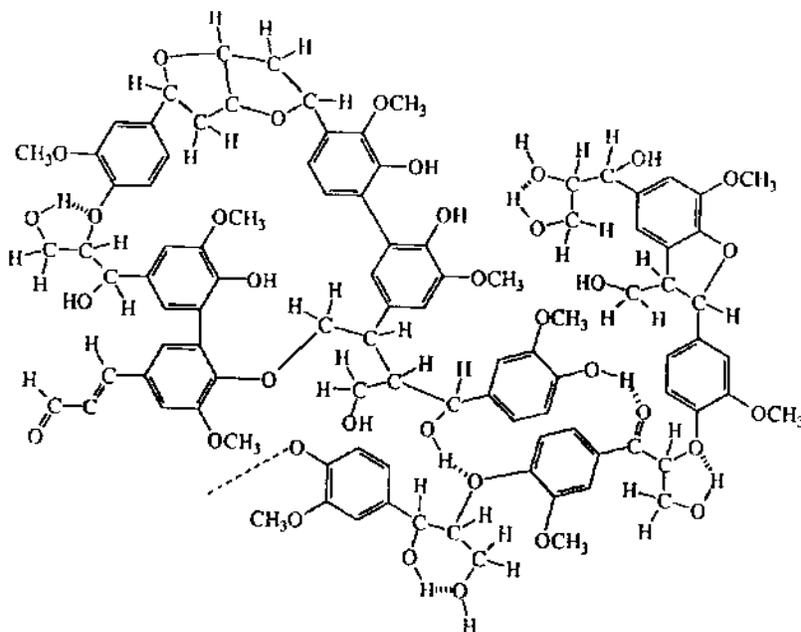


Fig. 8: Estructura de la lignina

2.4.2. CELULOSA

La celulosa es un biopolímero que forma parte de la pared celular y consiste en una unión de β -glucosa mediante enlaces β -1,4-O-glucosídicos. La Figura 9 muestra una cadena de celulosa.

Este polímero lineal (compuesto de monómeros de celobiosa) se sintetiza en la naturaleza como moléculas individuales de D-glucosa que se van ensamblando en el mismo lugar en el que se producen. Las moléculas de celulosa se unen formando moléculas más largas conocidas como protofibrillas que se empaquetan en unidades mayores denominadas microfibrillas [19].

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

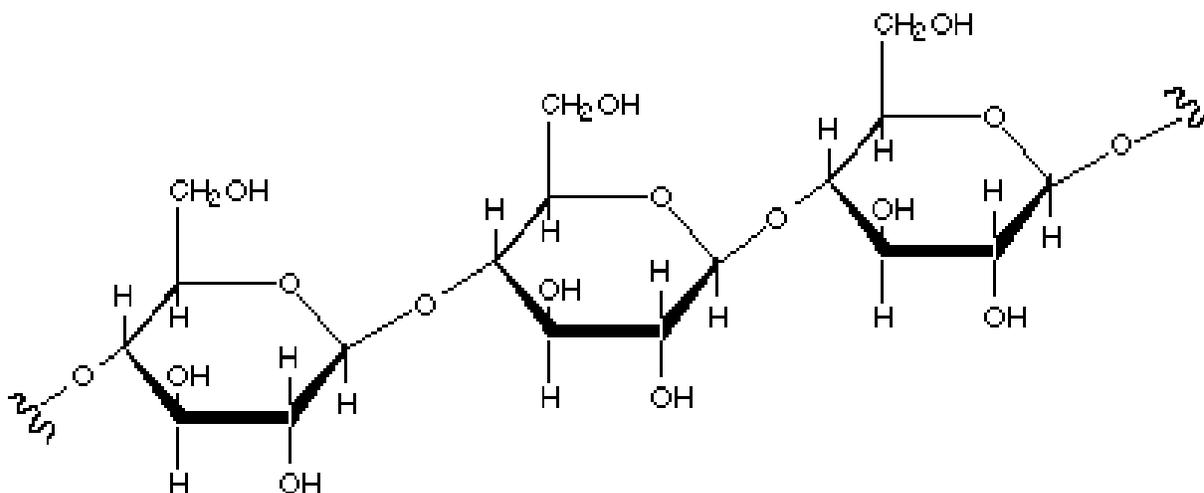


Fig. 9: Estructura de la celulosa

2.4.3. HEMICELULOSA

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

Dichas cadenas, a diferencia de la celulosa, pueden presentar ramificaciones y sustituciones mediante enlaces covalentes. La Figura 10 muestra la estructura química que presenta la Hemicelulosa.

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

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

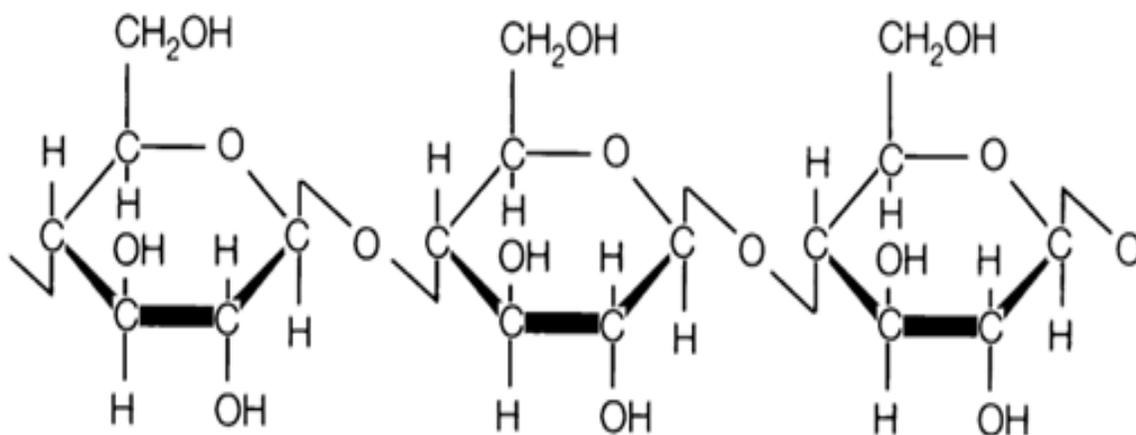


Fig.10: Estructura de la hemicelulosa

2.5. PRETRATAMIENTOS

Los biocombustibles de segunda generación se basan en materiales lignocelulósicos, los cuales representan la fuente más abundante de azúcares fermentables disponibles en la naturaleza [22].

Como principal objetivo, los pretratamientos deben romper la pared lignocelulósica y reducir la proporción de sus componentes, como se muestra en la Figura 11, esto con el fin de que las enzimas puedan tener mayor acceso a los polisacáridos y convertirlos en azúcares fermentables durante el proceso de hidrólisis, y posteriormente mediante un microorganismo realizar una fermentación alcohólica [23].

Para poder efectuar todo el proceso, la biomasa debe ser tratada de tal manera que sus azúcares y polisacáridos constituyentes sean susceptibles a la acción de enzimas y de microorganismos fermentadores [24].

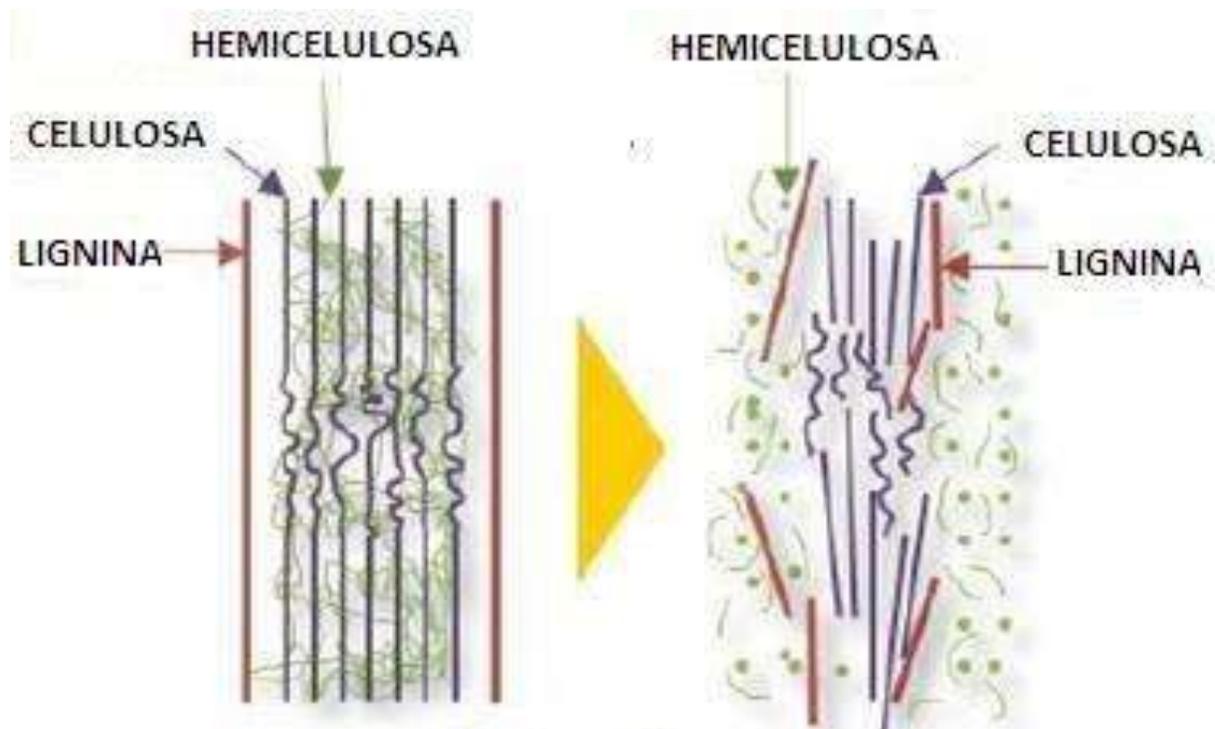


Fig. 11: Ruptura de la pared celular mediante los pretratamientos

Una de las dificultades que presenta la estructura lignocelulósica es que la lignina y hemicelulosa forman un sello que cubre a la celulosa, cuyo polisacárido presenta mayor potencial de liberar glucosa.

Además, la mayoría de la celulosa presente en la biomasa tiene una estructura cristalina derivada de la alineación longitudinal de sus cadenas lineales. En la celulosa, las interacciones polisacárido-polisacárido son favorecidas y las interacciones polisacárido-agua son reducidas, de ahí que este biopolímero sea insoluble en agua. El pretratamiento debe contribuir a la formación de azúcares (hexosas y pentosas) a través de la hidrólisis de la hemicelulosa y evitar la formación de subproductos inhibidores de los bioprocesos consecutivos [22].

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

Los objetivos de un pretratamiento se basan en los siguientes puntos: [25]

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

Se han desarrollado diversos métodos de Pretratamiento de biomasa para producción de biocombustibles de segunda generación, los cuales pueden ser químicos, físicos o biológicos de los cuales podemos citar los siguientes: [17-18]

2.5.1. HIDRÓLISIS CON PRETRATAMIENTO ÁCIDO

Conocida así debido a que implica un componente ácido diluido o concentrado (comúnmente diluido de un 2-5%) para su pretratamiento, generalmente se emplea H_2SO_4 a diferentes concentraciones y temperaturas. Dicho proceso genera una cierta cantidad de azúcares fermentables en muy poco tiempo. Sin embargo el inconveniente que presenta es su inhibición con los microorganismos; por consecuencia la conversión de azúcares a alcohol es mínima, además de ser necesaria una detoxificación para efectuar la hidrólisis, lo que aumenta el gasto en el proceso [26].

2.5.2. PRETRATAMIENTO FISICO

Los materiales lignocelulósicos pueden ser reducidos por medio de métodos de corte, molienda y cocción para reducir la cristalinidad de la celulosa, esto con la finalidad de ablandar la materia y las enzimas puedan penetrar.

El gasto energético para un Pretratamiento basado en procesos mecánicos estará directamente asociado con el tamaño de partícula deseado y de las características de la biomasa.

2.5.3. PRETRATAMIENTO QUIMICO

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

2.6. HIDRÓLISIS

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

Tiene como objetivo liberar los monosacáridos de la parte lignocelulósica y degradarlos a azúcares que puedan ser fermentables, obteniendo pentosas y hexosas [27]. La Figura 12 muestra la reacción química que se produce en la hidrólisis para descomponer un polisacárido en monosacárido: [28]

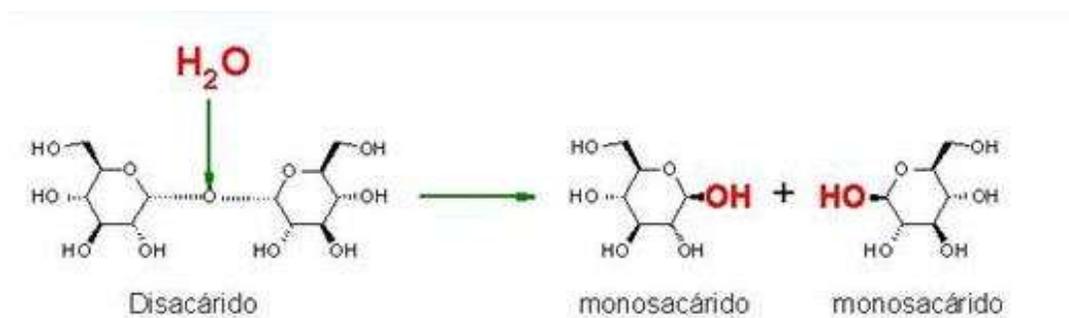


Fig. 12: Representación de la hidrólisis de un polisacárido

La Tabla 3 muestra la clasificación de las moléculas de 4 a 7 carbonos. [29]

Tabla 3: Monosacáridos clasificados respecto al número de carbonos.

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

Se conocen 2 tipos principales de hidrólisis:

- Hidrólisis enzimática
- Hidrólisis ácida.

2.6.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La producción de bioetanol, vía hidrólisis enzimática, a partir de materiales lignocelulósicos, requiere básicamente de tres etapas: pretratamiento, hidrólisis y fermentación. A diferencia de las materias primas ricas en azúcares simples (sacarosa y almidón), los residuos agroindustriales presentan una estructura compleja en la que los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) se encuentran protegidos por un compuesto fenólico, hidrofóbico y muy resistente, llamado lignina. Además, las hemicelulosas presentan en su composición azúcares de cinco carbonos que no son fermentables por los microorganismos comunes [23].

Este tipo de Hidrólisis emplea enzimas biosintetizadas por microorganismos como la bacteria *Clostridium cellulovorans* o los hongos *Aspergillus niger* o *Trichoderma reesei* [30]. Las enzimas necesarias para la hidrólisis de celulosa se pueden catalogar en una de tres clases, las cuales forman complejos sinérgicos: [22]

- Endoglucanasas: que atacan regiones de baja cristalinidad en las cadenas de celulosa y producen oligosacáridos de cadenas variables.
- Exoglucanasas: que atacan los extremos de los oligosacáridos que producen las anteriores y generan moléculas de celobiosa.
- β -Glucosidasas: son las encargadas de separar los dímeros y producir glucosa libre para su aprovechamiento en la fermentación.

Antes de realizar la hidrólisis enzimática primero se emplea un pretratamiento para hidrolizar la hemicelulosa y hacer más digestible la celulosa. Sin embargo al término del mismo se requiere agregar una solución alcalina que pueda precipitar parte del ácido y no genere inconvenientes al momento de iniciar la sacarificación. Posteriormente, se usan enzimas para hidrolizar junto con una solución buffer o un medio líquido de conservación a una temperatura aproximada que va de los 40 °C hasta los 60 °C y un pH de 6 [31]. La celulasa es una mezcla de diferentes enzimas, cada una de ellas con rol distinto en la hidrólisis de la celulosa. En algunos procesos de obtención de biocombustibles, se lleva a cabo una etapa de hidrólisis ácida diluida y después el hidrolizado se prepara para la etapa de hidrólisis enzimática.

2.6.2. HIDRÓLISIS ÁCIDA

Las tecnologías empleadas para llevar a cabo un proceso de hidrólisis ácida contemplan pretratamientos bajo condiciones moderadas de temperatura para efectuar un rompimiento y posteriormente la liberación de las pentosas [32]. Posterior a esta primera etapa, se procede con un cambio drástico de temperatura, trabajando a un rango aproximado de 210-245°C para facilitar la hidrólisis de la celulosa y recuperar los azúcares de seis carbonos. En cuanto a la hidrólisis ácida se conocen 2 metodologías para poder efectuarla, estas son jugando con parámetros de concentración y temperaturas: [22]

- Hidrólisis ácida a altas concentraciones de ácido y a bajas temperaturas.
- Hidrólisis ácida a bajas concentraciones de ácido y a altas temperaturas.

La hidrólisis ácida concentrada involucra un pretratamiento con ácido para liberar los azúcares de la hemicelulosa, posteriormente se seca la biomasa y se agrega ácido sulfúrico concentrado. A condiciones altas de presión y temperatura el hidrolizado se puede efectuar en un tiempo aproximado de 15 a 30 minutos. Los dos procesos involucran distintas variables como son la concentración de ácido, la relación sólido/líquido, temperatura y tiempo de la reacción, entre otros [32].

2.7. FERMENTACIÓN

La fermentación es un proceso biológico en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono para obtener como productos finales etanol, dióxido de carbono en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico [33].

El inicio de la fermentación alcohólica fue determinado cuantitativamente por Lavoisier (1743 – 1794) quien, estudiando este tema, enuncia el principio de conservación de la materia y expresa una relación algebraica para este fenómeno:



Posteriormente a este descubrimiento, Gay- Lussac (1778 – 1850) le dió seguimiento a esta investigación con lo cual, expresa lo mismo con la ecuación que lleva su nombre:



Berzelius describe la fermentación como un fenómeno catalítico, similar a la descomposición del agua oxigenada por una esponja de platino y expresa la idea de fermentos orgánicos.

Sin embargo el mundo científico no aceptaba esta opinión hasta que Pasteur (1822 – 1895) demostró en 1872 que aquellos microorganismos vivían y se desarrollaban a expensas de las materias primas azucaradas, descomponiéndolas en alcohol y CO₂, y que tales organismos vivientes constituían los fermentos organizados. En 1896, Buchner (1860 – 1917) efectuó un descubrimiento importante que compatibilizaba la idea de microorganismos fermentativos de Pasteur y de enzimas de Liebig, demostrando que la acción fermentativa estaba en las células vivas de levaduras, pero que podía ser extraída de ellas destruyendo las células con acetona o triturando con arena, obteniendo

un jugo que a pesar de hallarse libre de células, era capaz de reproducir todas las fases de la fermentación alcohólica de la glucosa [33]. La Figura 13 muestra la reacción que se presenta en la fermentación de manera global, partiendo de azúcares y las diferentes etapas que se conlleva en la formación de alcohol.

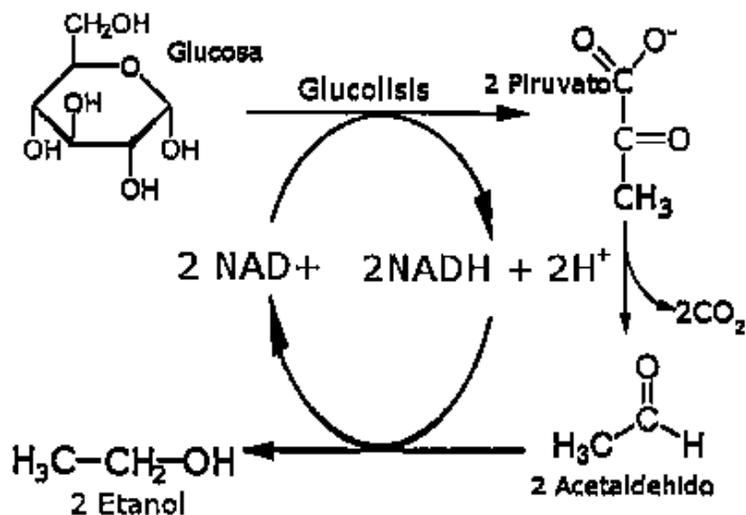


Fig. 13: Reacción global para la obtención de bioetanol partiendo de la glucosa

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

- Sustancias con alto contenido de celulosa
 - Madera
 - Residuos agrícolas

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

A nivel mundial, la fermentación es una de las rutas viables para la producción de bioetanol [8]. Como se puede notar en la Figura 14, tan solo el 5 % es por vías sintéticas

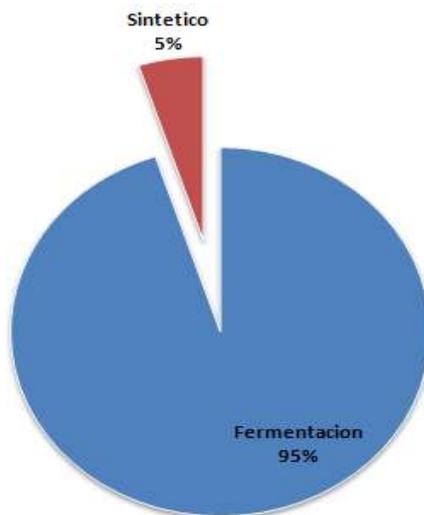


Fig. 14: Gráfico de la ruta de producción de bioetanol a nivel mundial

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

El microorganismo que más se utiliza es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la cual emplea la ruta de Embden-Meyerhoff. La descripción de esta ruta se basa en

obtener un par de moles de ATP por mol de glucosa. Sin embargo la bacteria *Zymomonas mobilis*, es una bacteria gram negativa que pertenece al grupo de las Pseudomonas, utiliza la ruta de Entner-Duordoff de manera anaeróbica, por dicha ruta se produce tan solo una molécula de ATP por mol de glucosa [34-35]. La Figura 15 muestra a detalle la reacción que se tiene durante la fermentación a través de las rutas metabólicas de los microorganismos.

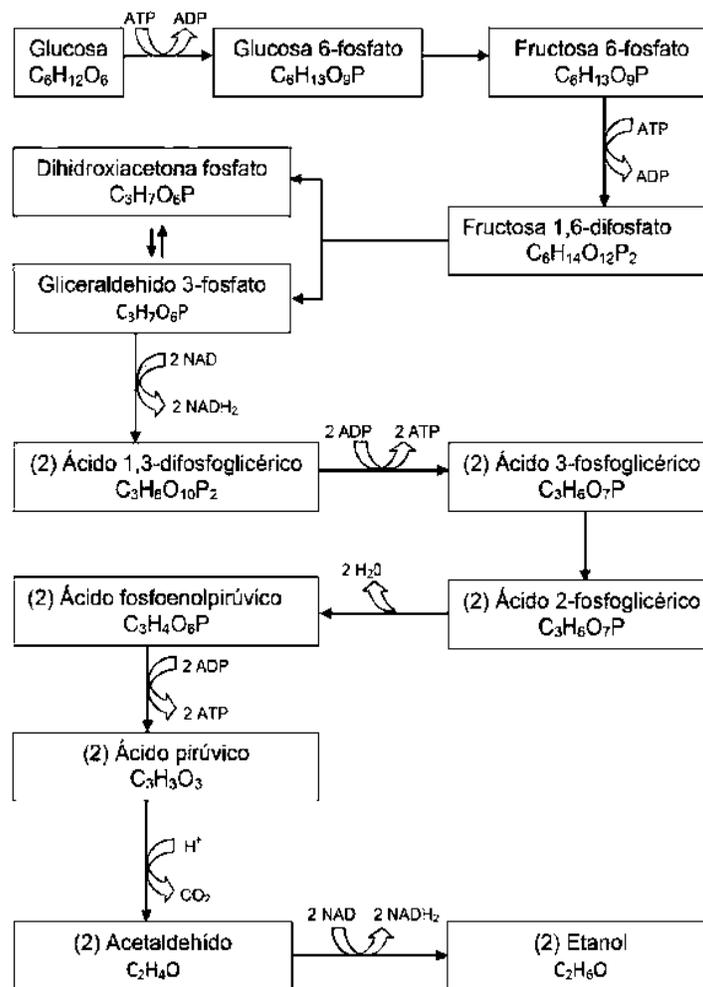


Fig. 15: Diagrama demostrativo de la reacción continua para producir etanol a partir de glucosa

La fermentación es la parte final del proceso para la producir alcohol, el tiempo para que se tenga presente una alta conversión radica entre las 48 y 72 horas [36].

La Figura 16 muestra un panorama general del proceso presente en la producción de bioetanol partiendo de los pretratamientos

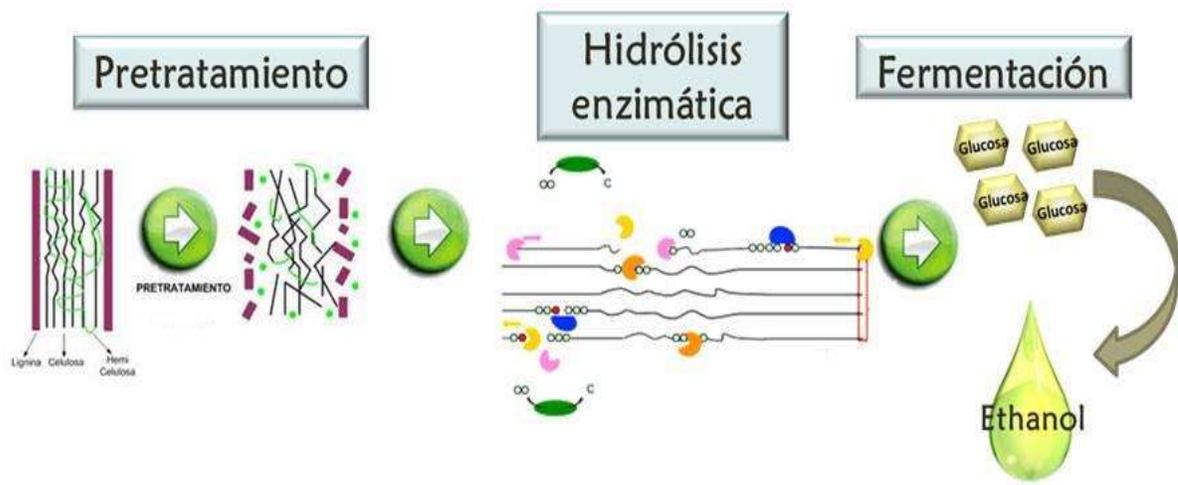


Fig. 16: Proceso global para convertir los polímeros de la biomasa en bioetanol

2.8. DESTILACION

La destilación consiste en la evaporación y recuperación de las sustancias más volátiles, entre ellas el alcohol, de manera que parte del agua y otras materias pesadas quedan como residuo descartable en el fondo. La separación de mezclas azeotrópicas es de gran interés industrial, así como la necesidad de desarrollar una secuencia de nuevos procesos de destilación extractiva o realizar innovaciones en cuanto a su construcción u operación de los equipos, se ha incrementado cada vez más en la actualidad, para atender la gran demanda de procesos económicos y limpios [37].

La mezcla etanol-agua forma una mezcla azeotrópica de punto de ebullición mínima de composición de 89,4 % mol de etanol y 10,6 % de agua a 78,2 °C y a presión atmosférica estándar. Existen varios procesos para producir etanol anhidro estos incluyen: [38]

- Proceso químico de deshidratación,
- Deshidratación por destilación a vacío

- Proceso de destilación azeotrópica
- Proceso de destilación extractiva
- Proceso por membranas
- Proceso de adsorción
- Proceso de destilación por difusión.

El etanol contenido en el fermentado puede separarse por cualquiera de estos métodos de destilación; sin embargo, es necesario alcanzar un porcentaje de pureza del 99% para que éste sea empleado como combustible. Generalmente, se requieren dos columnas de destilación para alcanzar hasta un 90% ó 92% de concentración de etanol [39].

2.9. MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN FERMENTACIÓN

Un microorganismo es un organismo microscópico constituido por una sola célula o agrupación de células. Se consideran como tales a las bacterias, los hongos (levaduras y hongos filamentosos muy pequeños), e incluye también a los virus, aunque la estructura de ellos es más simple y no llega a conformar una célula [35].

2.9.1. LEVADURAS

Las levaduras son organismos eucariontes, y como tales tienen el material genético en el núcleo, cuentan con organelas y sistema de membranas, y tienen pared celular. La levadura más conocida y utilizada para la mayoría de los procesos fermentativos es la *Saccharomyces cerevisiae*. Con ella se produce el pan, el vino y la mayoría de las demás bebidas alcohólicas. La fermentación a gran escala por acción de las levaduras es responsable de la producción de alcohol para fines industriales y de bebidas alcohólicas. Sin embargo es posible adaptar las condiciones requeridas para poder generar biocombustibles de primera y segunda generación empleando como microorganismo fermentador la

levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las bebidas alcohólicas más importantes que se producen industrialmente con intervención de las levaduras son el vino (fermentación de zumo de uvas), la sidra (fermentación del zumo de manzana), la cerveza (fermentación de cereales malteados), y bebidas destiladas producidas por condensación del alcohol proveniente de la fermentación [35- 40].

En todos estos procesos se utilizan levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae*, misma que se utilizaba en la antigüedad para el mismo fin. Desde entonces, las levaduras han sido cultivadas en laboratorio durante tanto tiempo que se han ido seleccionando y mejorando cepas según distintas propiedades.

2.9.2. BACTERIAS

En las bacterias la célula procariota típica de una Eubacteria posee pared celular, membrana citoplasmática y el citoplasma sin organelas ni divisiones, en el cual el material genético se encuentra suelto en el citoplasma ya que no existe envoltura nuclear, en una región conocida como nucleoide. Algunas especies contienen plásmidos, que son pequeñas moléculas circulares de ADN que suelen codificar para genes que le otorgan a la bacteria ciertas ventajas adaptativas, como por ejemplo: enzimas que le permiten degradar distintas fuentes de carbono, enzimas que producen antibióticos o incluso otras enzimas que le permiten tolerar la presencia de ciertos antibióticos.

Entre las especies bacterianas de interés industrial están las bacterias del ácido acético, *Gluconobacter* y *Acetobacter* que pueden convertir el etanol en ácido acético, las *Zymomonas mobilis* (ATCC PTA-7858) la cual es capaz de fermentar pentosas y hexosas, y las bacterias del ácido láctico que incluyen, entre otras, las especies de los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* que producen yogur y queso [35].

2.9.3. HONGOS

Existen tipos de hongos asociados a los alimentos y que no son levaduras. Se trata de los hongos filamentosos, pluricelulares que presentan regiones del cuerpo diferenciadas. Sus células son eucariontes, con pared celular. Dentro del grupo de los hongos filamentosos se encuentran aquellos que son fuente de enzimas comerciales (amilasas, proteasas, pectinasas), ácidos orgánicos (cítrico, láctico), quesos especiales (Camembert, Roquefort) y de las setas [35].

2.9.4. CONVERSIÓN DE AZÚCARES

Los microorganismos empleados principalmente en la producción de bioetanol por su rendimiento en la producción de etanol, son la *Zymomonas mobilis* y las *Saccharomyces cerevisiae*, de los cuales se tienen estudios previos respecto a la conversión de azúcares reductores procesados a alcohol respecto del tiempo, realizando corridas experimentales a nivel laboratorio bajo la variable de la concentración [11-41].

Se han realizado estudios comparando la actividad que presentan ambos microorganismos, los cuales sirven como parámetro para generar modelos experimentales a diferente escala. Los resultados que se han tenido hasta ahora arrojan comportamientos parecidos a concentración altas de azúcares reductores, sin embargo las *Zymomonas mobilis* tienen una disminución de consumo de estos monosacáridos a concentraciones abajo del 10%.

Se ha demostrado que las *Saccharomyces cerevisiae* es poco osmotolerante y fermenta mejor a concentraciones parcialmente bajas de azúcares. Mientras que las *Zymomonas mobilis* toleran mayores concentraciones de azúcares debido a que las enzimas de su ruta metabólica Enter-Doudoroff no se inhiben por las altas concentraciones [10].

3. METODOLOGIA

3.1. MATERIA LIGNOCELULÓSICA

- Bagazo de las piñas de agave *tequilana Weber*

3.2. ENZIMAS

- Se utilizan celulasas comerciales que incluyen Celluclast 1.5 L. Celluclast 1.5 L en una preparación de enzimas de *Trichoderma reesei*. Posee más de un tipo de endocelelulasa, exocelulasa y β - glucosidasas.

3.3. LEVADURA

- *Saccharomyces cerevisiae*

3.4. MEDIO DE CONSERVACION SÓLIDO

- El medio sólido de conservación se prepara mediante los siguientes compuestos y reactivos a las siguientes concentraciones:

➤ Glucosa	20 g/L
➤ Extracto de levadura	10 g/L
➤ Fosfato dibásico (Na_2HPO_4)	2 g/L
➤ Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.5 g/L
➤ Agar bacteriológico	15 g/L

El medio de conservación sólido, posterior a su preparación, es colocado en un Autoclave por 15 minutos a 121°C para su esterilización.

Concluido ese tiempo la solución es vaciada en cajas de Petri (previamente esterilizadas a las mismas condiciones) a un volumen aproximado de 15 mL en una zona estéril.

Se deja reposar por 20 minutos para su solidificación. Posteriormente se dejan 12 horas en una incubadora a 30°C como testigo. Si el medio sólido no presenta contaminación, se prosigue con el sembradío de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) mediante un asa y un par de mecheros (procurando zona de esterilidad) estriando en forma de abanico, procurando un espacio para su reproducción dentro del medio.

Al terminar la técnica se coloca nuevamente en la incubadora dejando transcurrir un tiempo de 12 horas para su crecimiento.

La Figura 17 es una muestra cultivada y con crecimiento transcurridas 12 horas de las *Saccharomyces cerevisiae* en un medio sólido de conservación.



Fig. 17: Medio de conservación sólido sembrado con *Saccharomyces cerevisiae*

3.5. MEDIO DE CONSERVACIÓN LÍQUIDO

- El medio líquido de conservación sirve como inóculo para el medio líquido de fermentación. En esta solución se puede llevar a cabo la reproducción de la biomasa sembrada en el medio sólido de conservación. Se prepara mediante los siguientes compuestos y reactivos a las siguientes concentraciones, las cuales solo se adaptan al volumen a trabajar:

➤ Glucosa	20 g/L
➤ Extracto de levadura	10 g/L
➤ Fosfato dibásico (Na_2HPO_4)	2 g/L
➤ Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.5 g/L

3.6. MEDIO LÍQUIDO DE FERMENTACIÓN

- El medio líquido de fermentación se prepara mediante los siguientes compuestos y reactivos a las siguientes concentraciones, las cuales solo se adaptan al volumen a trabajar:

➤ Glucosa	150 g/L
➤ Xilosa	20 g/L
➤ Extracto de levadura	10 g/L
➤ Fosfato dibásico (Na_2HPO_4)	2 g/L
➤ Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	1 g/L
➤ Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.5 g/L

El medio líquido de fermentación se prepara en 2 pasos. Primero la solución de sales y azúcares se hace en 2 recipientes diferentes, sin alterar el volumen de la solución final.

Posteriormente se meten a esterilizar a un Autoclave a 121°C por un tiempo de 20 minutos. Terminando este tiempo, las 2 soluciones se mezclan y se deja

reposar por 24 horas, el cual servirá como testigo para tener un control respecto a si se contamina o no.

Transcurrido este tiempo se le agrega el inóculo (Solución del medio líquido de conservación con biomasa reproducida) a la solución del medio de fermentación, siempre y cuando transcurridas las 24 horas no se tenga presencia de contaminación. Se deja reposar 12 horas para la reproducción de la levadura en este nuevo medio.

3.7. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico (HCl) al 36.9%
- Hidróxido de sodio (NaOH) al 6%
- Peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 10%
- Hidróxido de sodio (NaOH) al 1%
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 2%
- Hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$ al 10%

3.8. DESCRIPCION DE LA PLANTA PILOTO

La planta piloto está diseñada con los siguientes materiales, manómetros y rotámetros: [43]

- Reactor 1 de 50 L de volumen para efectuar pretratamientos e hidrólisis
- Reactor 2 de 50 L de volumen para efectuar la fermentación
- Una columna de destilación de Vidrio con 11 platos
- Un hervidor
- Un condensador
- 3 bombas P11, P21 y P22
- 1 panel de control
- Presión de los vapores en el circuito principal.

- Presión de los vapores secos corriente arriba del mezclador vapor/agua fría al circuito del encamisado del reactor.
- Presión del agua fría corriente arriba del mezclador vapor/agua fría al circuito del encamisado del reactor.
- Presión de los vapores secos corriente arriba del mezclador vapor/agua fría al circuito del encamisado del reactor.
- Presión del agua fría corriente arriba del mezclador vapor/agua fría al circuito del encamisado del reactor.
- Presión de los vapores secos al circuito del encamisado del hervidor.
- Rotámetro de agua fría.
- Rotámetro del agua fría.
- Rotámetro de condensados a la salida del condensador.

La Figura 18 ilustra la planta piloto en donde se realizaron los procesos de pretratamiento, sacarificación y fermentación. Los materiales con los que está construida la planta piloto son resistentes a los reactivos químicos a emplear.



Fig. 18: Imagen de la planta piloto

3.9. PORCENTAJE DE HUMEDAD

Para determinar el porcentaje de humedad se colocaron 450 gramos de bagazo generado en el prensado de las piñas, en charolas de aluminio (debido a que es una gran cantidad de materia para la prueba) introduciéndolos en una estufa de secado a 60°C por 24 horas (bajo estas condiciones se puede evitar que la muestra se quemara) para obtener un peso constante (en un crisol previamente secado a 105°C). Trascurrido este tiempo se coloca en un desecador para su enfriado por 30 minutos y su posteriormente es pesado [43]. En la Figura 19 se puede notar una muestra para determinar el porcentaje de humedad. Por último se cuantifico el peso final de la muestra y se aplicó la siguiente ecuación para obtener el porcentaje de humedad:

$$\%H = \frac{M_i - M_f}{M_i}$$

Donde:

- M_i = es el peso de la muestra inicial (húmeda).
- M_f = es el peso de la muestra final (seca).



Fig. 19: Muestra húmeda resultante del prensado de las piñas

3.10. DETERMINACIÓN DE HOLOCELULOSA EN LA MATERIA SÓLIDA A PARTIR DE LA TÉCNICA DE HIDROLISIS ACIDA CUANTITATIVA

Se realizó la técnica de hidrólisis ácida cuantitativa para la determinación del porcentaje de hemicelulosa y celulosa presentes en la materia lignocelulósica. Esta técnica se realiza en 2 etapas: [13]

Primera etapa: En esta etapa los polisacáridos se hidrolizan mediante ácido sulfúrico concentrado a temperatura baja, obteniendo una disolución compuesta mayoritariamente por monómeros y oligómeros y un residuo sólido que fundamentalmente corresponde a lignina de Klason. Los pasos a seguir son los siguientes. Se toman 1 g de la muestra de contenido seco conocido y se depositan en tubos en un baño de agua a 30 °C, añadiéndose a cada uno de ellos 10 ml de ácido sulfúrico al 72 % preparado siguiendo las normas estándar. Se mantienen durante 1 h con agitación, con el fin de asegurar que se produzca una buena mezcla con el material lignocelulósico.

Segunda etapa: En esta etapa se trata el contenido de cada tubo de ensayo en medio ácido diluido a una temperatura de 121 °C con el propósito de romper todos los oligómeros a monómeros. Esto se realiza vertiendo el contenido de cada tubo sobre un matraz con tapón de 500 ml. Se arrastra con agua destilada el residuo adherido y se le añade agua adicional hasta obtener un peso total de disolución de 297.34 g (lo que conduce a una concentración de ácido sulfúrico del 4%). Se tapan los recipientes y se introducen en un Autoclave durante 1 hora a 1 atm de presión. Finalizada esta segunda etapa de hidrólisis se retiran los recipientes de la autoclave y se enfrían en chorro de agua.

La fase acuosa de esta técnica contiene los productos de hidrólisis de los polisacáridos (monómeros), que se analizaron por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

3.11. DETERMINACION DE LIGNINA EN LA MATERIA SOLIDA

Tras la hidrólisis acida cuantitativa, se obtiene una suspensión en que la fase sólida corresponde a la lignina de Klason. El porcentaje de Lignina la obtenemos mediante el siguiente procedimiento: Se filtra el residuo con un matraz Kitazato conectado a una bomba de vacío y reteniendo toda la materia sólida en papel filtro con tamaño de poro No. 3. El residuo sólido se lava con agua y se mantiene en la estufa a 105 °C durante 24 h [43]. Posteriormente, se ponen los residuos sólidos en un desecador con gel de sílice a 30°C para su enfriamiento y se determina su peso. La Figura 20 muestra la apariencia del residuo sólido al final de la técnica empleada. El porcentaje de lignina en base seca de calcula empleando la siguiente ecuación:

$$\%L = \frac{P_r}{P_h(1 - H)} \cdot 100$$

Donde:

- %L = porcentaje de lignina
- P_r = es el peso del sobrante (seco).
- P_h = es el peso inicial de la muestra antes de la técnica de hidrólisis ácida cuantitativa.
- H = es la humedad de la muestra



Fig. 20: Muestra final de la técnica para la determinación de Lignina.

3.12. PRETRATAMIENTOS

Se realizaron 3 tipos de pretratamientos diferentes para la materia sólida, cuyos rendimientos deliberaran el proceso óptimo a nivel planta piloto, estos son:

- Alcalino-oxidativo
- Combinado
- Ácido

Estos procedimientos se realizan en 3 ocasiones cada uno, para pretratar aproximadamente 10 Kg de bagazo seco (esto debido a que el volumen del reactor es un impedimento en la cantidad de materia prima inicial a emplear, ya que se debe ajustar en cuanto a la relación sólido-liquido) y poder efectuar una sacarificación y posteriormente una fermentación sin alteraciones en la ruta metabólica.

3.12.1. PRETRATAMIENTO ALCALINO-OXIDATIVO:

Se pesan y colocan 4 kg de biomasa seca previamente cocida, prensada y molida, en el reactor de hidrólisis de la planta piloto, y se agregan 20 L (Relación 1:5) de hidróxido de sodio al 6%. Se opera a 120°C durante un tiempo de 60 minutos; al transcurrir este tiempo, se enfría hasta temperatura ambiente.

Al tener un temperatura estable en el reactor de 25°C aproximadamente, se le agregan 20 L (Relación 1:5) de una solución de peróxido de hidrogeno al 10% procurando que está este a 0°C debido a que la cinética de la reacción es muy rápida a temperatura cercana al ambiente y genera grandes cantidades de espuma que arrastran materia sólida y producen perdidas.

Posteriormente se deja que se lleve a cabo la reacción por 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se le agregan 1.8 L de ácido

clorhídrico concentrado al 36.9% y se agita por un periodo de 10 minutos para obtener un pH en la solución de 5.

Finalmente la materia sólida es separada del efluente para, posteriormente, ser lavada. Se dejó secar a 60°C durante 24 horas y el efluente resultante es analizado. Transcurrido este tiempo la materia sólida se pesa.

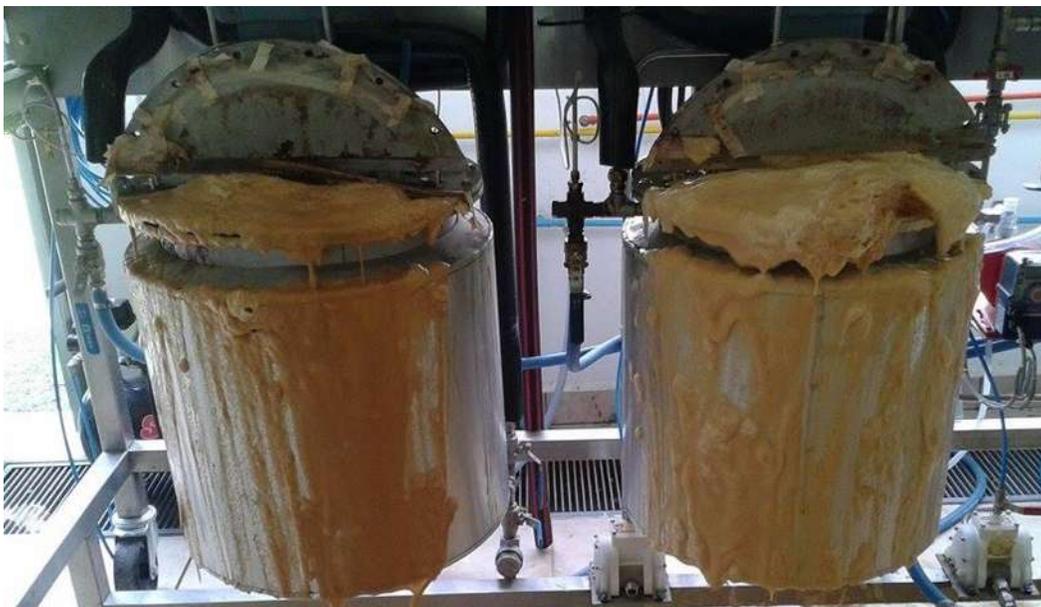


Fig. 21: Reacción efectuada al agregar el peróxido en la parte final del Pretratamiento.

3.12.2. PRETRATAMIENTO COMBINADO:

Se pesan y colocan 3.3 kg de biomasa seca previamente cocida, prensada y molida en el reactor de hidrólisis de la planta piloto, y se agregan 20 L (Relación 1:6) de ácido nítrico al 6%. Se opera a 100°C durante un tiempo de 60 minutos, al transcurrir este tiempo, el sólido se lava con agua destilada y se cuantifica el efluente obtenido. La materia sólida se coloca a 60°C durante 24 horas para su secado. Cumpliéndose las 24 horas, se prosigue con la adición de 20 L (Relación 1:6) de hidróxido de sodio al 1%. Se opera por 30 minutos a una temperatura de 90°C, al transcurrir este tiempo, nuevamente el sólido se lava con agua destilada y

se cuantifica el efluente obtenido. La materia sólida se deja secar a 60°C durante 24 horas. Por último se verifica que se tenga un pH de 5 para posteriormente seguir con la hidrólisis. Transcurrido este tiempo la materia sólida se pesa.

3.12.3. PRETRATAMIENTO ÁCIDO

Se pesan y colocan 4 Kg de biomasa seca previamente cocida, prensada y molida en el reactor de hidrólisis de la planta piloto, y se agregan 40 de ácido sulfúrico al 2% (Relación 1:10 entre materia sólida y el líquido). Se opera a 120°C durante un tiempo de 60 minutos, al transcurrir este tiempo, el sólido se debe detoxificar mediante una solución de hidróxido de calcio al 10%, agregando un volumen aproximado de 800 ml de dicha solución. Posteriormente se lava con agua destilada y se cuantifica el efluente obtenido. La materia sólida se coloca a 60°C durante 24 horas para su secado. Transcurrido este tiempo la materia sólida se pesa. La Figura 22 muestra una porción de materia prima pretratada.



Fig. 22: Porción que ilustra la apariencia de la materia sólida al término y secado de un Pretratamiento ácido.

3.13. DETERMINACIÓN DEL PH

Posterior al Pretratamiento se determinó el pH de cada uno de los sobrenadantes y materia sólida por igual, esto debido a que, en una hidrólisis enzimática el pH se debe ajustar a un rango de 5 con una dispersión de ± 0.5 .

Si el pH se encuentra por debajo de este valor, se procede a un ajuste con una solución de Ca(OH)_2 hasta llegar a ese valor establecido, agregando paulatinamente la solución tomando las lecturas con un pH metro, a los 5 minutos de cada reactivo agregado durante el pretratamiento, para tener una estabilidad y control en cada reacción. Antes de efectuar la hidrólisis es necesario volver a realizar una lectura para controlar alguna variación del pH.

3.14. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Concluyendo los pretratamientos se continuó con la hidrólisis, la cual sigue el mismo procedimiento para los 3 procesos, cambiando solamente las cantidades de los medios líquidos bajo los cuales se acondicionara el proceso, ya que la relación esta basada en la cantidad de biomasa seca obtenida del Pretratamiento.

3.14.1. CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El reactor primeramente se lavó y secó, posterior a esto, se agrega la materia sólida seca y se coloca el medio líquido conservando la relación 1:5. Se esterilizan a 115 °C durante un tiempo de 20 minutos para evitar que pueda contaminarse la biomasa, procurando evitar fugas.

Concluido este tiempo se enfría y se le agregan las enzimas de última generación, Cellic CTec 3 y Cellic HTec 3, bajo una relación del 6 % en volumen de cada una

de las enzimas con respecto a la materia sólida para poder efectuar la hidrólisis enzimática. Finalmente se ajusta a una temperatura 50°C de forma constante durante 72 horas, muestreando cada 24 horas. La Figura 23 muestra las condiciones de operación y pasos que implica la hidrólisis.

Los procesos de forma individual, son mezclados por completo agitando a 80 rpm, esto debido a que la materia sólida precipita complicando la rotación del agitador en el reactor, además de presentar poca homogeneidad y generando una mayor demanda en la potencia.



Fig. 23: Esquema del proceso de hidrólisis.

3.14.2. HIDRÓLISIS ALCALINO-OXIDATIVO

Como la relación entre materia sólida a líquido es 1:5, los volúmenes que se agregan para efectuar la hidrólisis enzimática de un pretratamiento alcalino-oxidativo a nivel planta piloto con relación a la materia sólida obtenida al final del pretratamiento son:

- Cantidad de materia sólida final total: 4 Kg
- Cantidad de medio líquido sin azúcares (Medio de conservación sin azúcares): 20 L

Para un volumen de 20 L del medio líquido se requieren las siguientes cantidades:

➤ Extracto de levadura	200 g
➤ Fosfato dibásico (Na_2HPO_4)	40 g
➤ Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	20 g
➤ Sulfato de magnesio (MgSO_4)	10 g

El volumen de enzimas requeridas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática es:

- 240 mL de enzima Cellic CTec 3
- 240 mL de enzima Cellic HTec 3

3.14.3 HIDRÓLISIS COMBINADA

Como la relación entre materia sólida a líquido es 1:5, los volúmenes que se agregan para efectuar la hidrólisis enzimática de un pretratamiento combinado a nivel planta piloto con relación a la materia sólida obtenida al final del pretratamiento son:

- Cantidad de materia final total: 4.3 Kg
- Cantidad de medio líquido sin azúcares (Medio de conservación sin azúcares): 21.5 L

Para un volumen de 21.5 L del medio líquido se requieren las siguientes cantidades:

➤ Extracto de levadura	215 g
➤ Fosfato dibásico (Na_2HPO_4)	43 g
➤ Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	21.5 g
➤ Sulfato de magnesio (MgSO_4)	10.75 g

El volumen de enzimas requeridas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática es:

- 258 mL de enzima Cellic CTec 3
- 258 mL de enzima Cellic HTec 3

3.14.4. HIDRÓLISIS ÁCIDA

Como la relación entre materia sólida a líquido es 1:5, los volúmenes que se agregan para efectuar la hidrólisis enzimática de un pretratamiento ácido a nivel planta piloto con relación a la materia sólida obtenida al final del pretratamiento son:

- Cantidad de materia sólida final total: 4.8 Kg
- Cantidad de medio líquido sin azúcares (Medio de conservación sin azúcares): 24 L

Para un volumen de 24 L del medio líquido se requieren las siguientes cantidades:

➤ Extracto de levadura	240 g
➤ Fosfato dibásico (Na_2HPO_4)	48 g
➤ Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	24 g
➤ Sulfato de magnesio (MgSO_4)	12 g

El volumen de enzimas requeridas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática es:

- 288 mL de enzima Cellic CTec 3
- 288 mL de enzima Cellic HTec 3

3.15. FERMENTACIÓN

3.15.1. CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA FERMENTACIÓN

En cuanto a la fermentación para obtener bioetanol de segunda generación las condiciones que se requieren después de la hidrólisis, es una temperatura de 30°C, por lo cual, concluyendo el periodo de hidrólisis es necesario descender la temperatura para evitar que la levadura contenida en el medio líquido de fermentación sea destruida, esto, sin abrir el reactor ya que puede ser susceptible a contaminación. Cuando la temperatura en el reactor sea estable, se procede a inocular con dicho medio a un 5% en volumen con relación a la cantidad de materia sólida inicial, el tiempo de fermentación inició en cuanto el inóculo entra al tanque. La reacción de fermentación produce CO₂ por lo que es necesario colocar un equipo airlock como se muestra en la Figura 24, para que pueda escapar el gas sin que genere acumulación dentro del reactor y pueda presentar problemas, además de que se evita una contaminación dentro del mismo.



Fig. 24: Equipo airlock empleado para la liberación de CO₂ durante la etapa de fermentación.

El tiempo de fermentación es de 72 horas, y se debe muestrear cada 24 horas para tener un control de la conversión de azúcares a etanol.

Pasando las 72 horas de Fermentación el jugo se guarda en garrafas de cristal con el fin de evitar que el alcohol generado pueda volatilizarse. Se cuantifica tanto el jugo obtenido como el residuo de la biomasa. El jugo posteriormente es llevado a un proceso de destilación.

La materia sólida se lava completamente hasta que el residuo líquido sea totalmente cristalino, se seca y se coloca en crisoles que se llevan a una estufa a 60°C por 24 horas. Transcurrido este periodo se coloca por 30 minutos en unos desecadores para su enfriamiento.

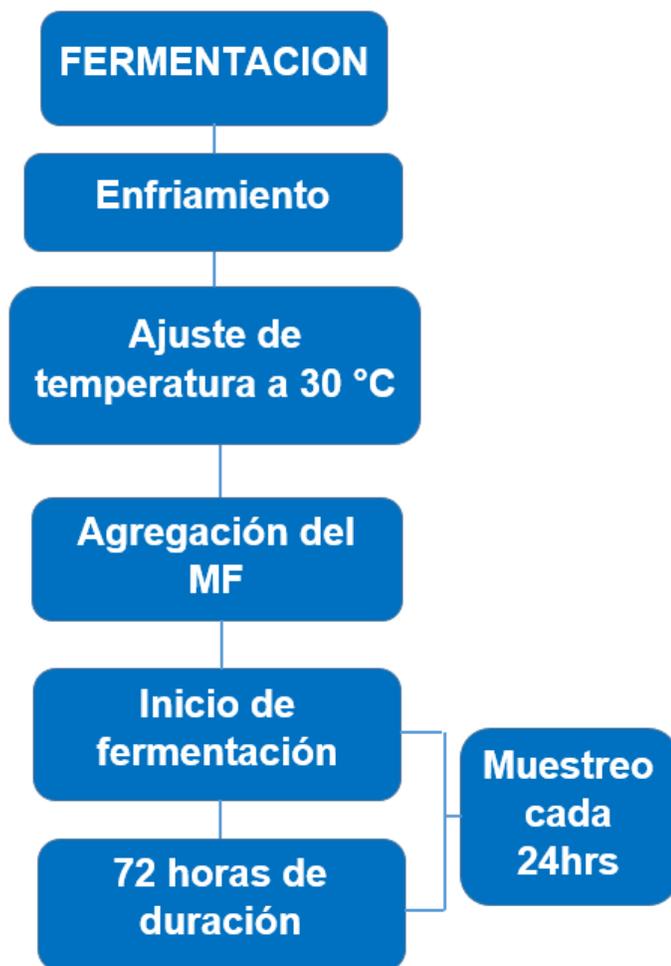


Fig. 25: Esquema del proceso de fermentación.

3.15.2. FERMENTACIÓN DE HIDRÓLISIS ALCALINO-OXIDATIVA

Posterior a las 72 horas de la Hidrólisis se prosigue con la inoculación del reactor mediante un medio líquido de fermentación preparado con 1 día de anticipación con respecto al día en que se efectuó la Fermentación, esto con la finalidad de proveer un tiempo para que dicho medio pueda incrementar la cantidad de biomasa y así, tener un buen rendimiento. El volumen del inóculo que se debe agregar al reactor, es del 5% con respecto al volumen presente desde la relación inicial del hidrolizado.

Como se tienen 20 L en volumen de hidrólisis, se requiere 1 L de dicho medio de fermentación, por lo tanto las cantidades que se requieren para realizar la inoculación son:

➤ Glucosa	150 g
➤ Xilosa	20 g
➤ Extracto de levadura	10 g
➤ Fosfato dibásico (Na_2HPO_4)	2 g
➤ Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	1 g
➤ Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.5 g

3.15.3. FERMENTACIÓN DE HIDRÓLISIS COMBINADA

Posterior a las 72 horas de la Hidrólisis se prosigue con la inoculación del reactor mediante un medio líquido de fermentación preparado con 1 día de anticipación con respecto al día en que se efectuó la Fermentación, esto con la finalidad de proveer un tiempo para que dicho medio pueda incrementar la cantidad de biomasa y así, tener un buen rendimiento. El volumen del inóculo que se debe agregar al reactor, es del 5% con respecto al volumen presente desde la relación inicial del hidrolizado. Como se tienen 21.5 L en volumen de hidrólisis, se

requieren 1.075 L de dicho medio, por lo tanto las cantidades que se requieren para realizar la inoculación son:

➤ Glucosa	161.25 gr
➤ Xilosa	21.5 gr
➤ Extracto de levadura	10.75 gr
➤ Fosfato dibásico (Na_2HPO_4)	2.15 gr
➤ Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	1.075 gr
➤ Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.5375 gr

3.15.4. FERMENTACIÓN DE HIDRÓLISIS ÁCIDA

Posterior a las 72 horas de la Hidrólisis se prosigue con la inoculación del reactor mediante un medio líquido de fermentación preparado con 1 día de anticipación con respecto al día en que se efectuó la Fermentación, esto con la finalidad de proveer un tiempo para que dicho medio pueda incrementar la cantidad de biomasa y así, tener un buen rendimiento. El volumen del inoculo que se debe agregar al reactor, es del 5% con respecto al volumen presente desde la relación inicial del hidrolizado. Como se tienen 24 L en volumen de hidrólisis, se requieren 1.2 L de dicho medio, por lo tanto las cantidades que se requieren para realizar la inoculación son:

➤ Glucosa	180 gr
➤ Xilosa	24 gr
➤ Extracto de levadura	12 gr
➤ Fosfato dibásico (Na_2HPO_4)	2.4 gr
➤ Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	1.2 gr
➤ Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.6 gr

3.16. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES Y ETANOL MEDIANTE LA TÉCNICA POR HPLC

Mediante este método se pueden analizar diferentes tipos de muestras para cuantificar la concentración de azúcares y alcohol presentes. La Figura 26 ilustra el equipo de cromatografía que se empleará para la determinación de las concentraciones de azúcares y etanol.

La metodología que se siguió fue la siguiente:

- Tomar 0.2 ml de cada una de las muestras de los jugos obtenidos transcurridas las 72 horas de la sacarificación y fermentación (7 muestras por proceso), diluirlas a una relación 1:10 (0.2 ml de muestra con 1.8 ml de agua para HPLC) y colocarlas en eppendorfs.
- Se colocan en el carrusel de una centrifuga cuyas condiciones serán 15 minutos a 13300 rpm para que precipite el sólido de la muestra.
- Al concluir ese tiempo, se filtran pasándolo sobre una membrana Milipore de 0.22 μm reteniendo microorganismos que pueden estar presentes y puedan alterar los resultados.
- Finalmente son colocados en viales cónicos, equilibrados a un volumen mayor a la mitad de su capacidad para que el cromatógrafo no succione aire.
- Los viales serán colocados en el carrusel del cromatógrafo y se analizan bajo las siguientes condiciones:
 - Columna Metacarb 87C a 60°C
 - Flujo isocrático de agua a 0.6 mL/min
 - Detector de índice de refracción
 - Tiempo de muestra: 21 minutos

Previamente se prepararon soluciones estándares de diferentes azúcares, alcoholes y lignina, esto debido a que la muestra que será leída en el equipo deberá integrarse para poder identificar los picos resultantes en la cromatografía. Las concentraciones de los estándares deberán oscilar entre 5 y 50 g/L.

Posteriormente, a todas las corridas del cromatógrafo les fueron leídas el área bajo la curva de los picos para determinar las concentraciones.



Fig. 26: Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia (HPLC) empleado para analizar muestras de agave para su caracterización.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. PORCENTAJE DE HUMEDAD EN LA MUESTRA INICIAL

Transcurridas las 24 horas, el peso de la muestra fue de 148 gramos, por lo tanto procedemos a sustituir nuestros valores en la ecuación para determinar el porcentaje de humedad que contenía la muestra de bagazo posterior al prensado de las piñas.

$$\%H = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \times 100 = \left(\frac{450 \text{ g} - 148 \text{ g}}{450 \text{ g}} \right) \times 100 = 67.11\%$$

$$\%H = 67.11\%$$

4.2. COMPOSICIONES DE HOLOCELULOSA EN EL BAGAZO

La Tabla 4 muestra un comparativo entre los resultados obtenidos experimentalmente mediante la técnica de la hidrólisis cuantitativa ácida leídos con el equipo para HPLC, con datos bibliográficos [13-20].

Tabla 4. Comparativa entre los resultados experimentales obtenidos de holocelulosas y citas de porcentajes lignocelulósicos.

% Materiales lignocelulósicos	Experimentación	Referencia 1 [13]	Referencia 2 [20]
Celulosa	39 %	35 %	43 %
Hemicelulosa	13 %	10 %	19 %

4.3. COMPOSICIÓN DE LIGNINA EN LA BIOMASA

Continuando con la misma secuencia del proceso de hidrólisis cuantitativa ácida, procedimos a realizar un análisis del contenido de lignina, mediante el cual podemos realizar una comparación con referencias bibliográficas, arrojando los resultados presentes en la Tabla 5 [6-24].

Tabla 5. Comparativa entre los resultados experimentales obtenidos de lignina y citas de porcentajes lignocelulósicos

	Experimentación	Referencia 1 [6]	Referencia 2 [24]
% Lignina	19 %	23 %	15 %

4.4. CUANTIFICACIONES DE MATERIA EN CADA PROCESO DEL PRETRATAMIENTO Y AL TÉRMINO DE LA FERMENTACIÓN

A continuación se resumen los siguientes balances de materia sólida durante cada uno de los pretratamientos tanto al inicio como al final del proceso, así como un análisis comparativo de los resultados mediante la Tabla 6:

Pretratamiento Alcalino-oxidativo:

- Cantidad de materia sólida inicial total: 10 Kg
- Cantidad de materia sólida final total: 4 Kg

Pretratamiento Combinado:

- Cantidad de materia sólida inicial total: 10 Kg
- Cantidad de materia sólida final total: 4.3 Kg

Pretratamiento Ácido:

- Cantidad de materia sólida inicial total: 10 Kg
- Cantidad de materia sólida final total: 4.8 Kg

Tabla 6. Resultados resumidos a la entrada y salida del pretratamiento

	Pretratamiento		
	Alcalino-oxidativo	Combinado	Ácido
Materia sólida inicial total (Kg)	10 Kg	10 Kg	10 Kg
Materia sólida final total (Kg)	4 Kg	4.3 Kg	4.8 Kg

A continuación, la Tabla 7 resume las cuantificaciones realizadas tanto de la materia sólida como del volumen final del líquido al término de las 72 horas de Fermentación para los 3 diferentes procesos:

Fermentación de hidrolizado Alcalino-oxidativo:

- Cantidad de materia sólida húmeda final total: 91.36 g
- Cantidad de jugo final total: 16 L

Fermentación de hidrolizado Combinado:

- Cantidad de materia sólida húmeda final total: 774.6 g
- Cantidad de jugo final total: 18.3 L

Fermentación de hidrolizado Ácido:

- Cantidad de materia sólida húmeda final total: 3.96 Kg
- Cantidad de jugo final total: 3.4 L

Tabla 7. Cuantificaciones finales en la etapa de Fermentación para los 3 procesos

	Resultados transcurridas las 72 horas de Fermentación		
	Alcalino-oxidativo	Combinado	Ácido
Materia sólida final total (Kg)	0.09136 Kg	0.7746 Kg	3.96 Kg
Jugo final total (L)	16 L	18.3 L	3.4 L

Con los resultados arrojados a la entrada y salida del proceso podemos establecer el rendimiento presente de la materia sólida, desde el momento en el cual se le realizó el pretratamiento hasta obtener la biomasa al final de la etapa de fermentación, con lo cual, los resultados obtenidos para su análisis se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de biomasa sobrante de cada proceso

	Alcalino- Oxidativo	Combinado	Ácido
% Rendimiento	0.9136%	7.746%	34%

4.5. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL PRETRATAMIENTO ALCALINO-OXIDATIVO

4.5.1. CONCENTRACION DE AZÚCARES FERMENTABLES

Durante la etapa de hidrólisis, se determinaron las concentraciones de azúcares a diferentes tiempos, iniciando a un tiempo 0 y concluyendo a las 72 horas, muestreando cada 24 horas. Los resultados arrojados fueron a través del equipo HPLC. En la Figura 27 se puede analizar el crecimiento presente de glucosa y xilosa.

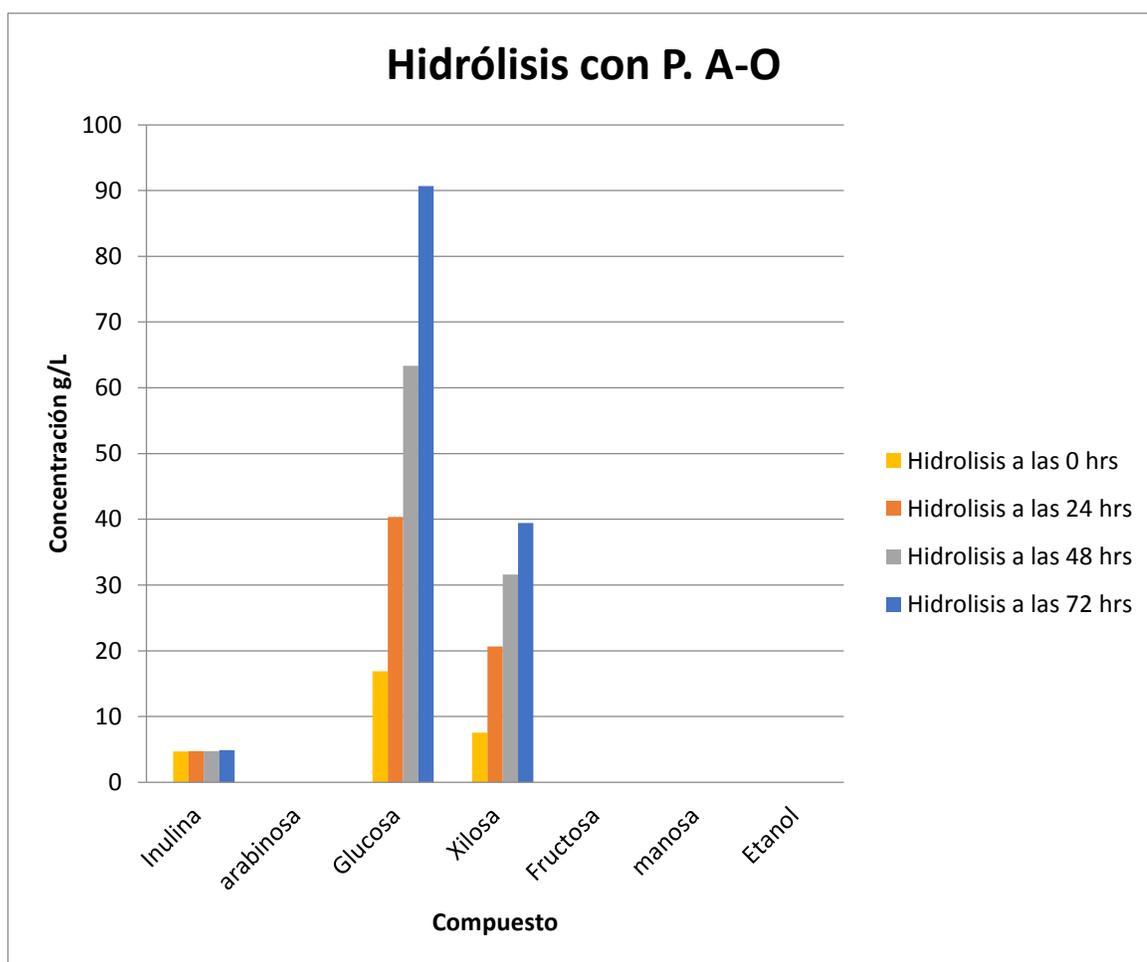


Fig. 27: Gráfica que muestra el avance en la producción de azúcares mediante el proceso de hidrólisis con el pretratamiento alcalino- oxidativo

4.5.2. CONCENTRACIÓN DE BIOETANOL FINAL

Pasando las 72 horas de Hidrólisis es necesario continuar con el proceso de Fermentación. Durante la etapa de dicho proceso, se cuantificaron las concentraciones de azúcares y alcohol cada 24 horas durante las 72 horas que dura el proceso. Los resultados arrojados fueron a través del equipo HPLC. En la Figura 28 se puede analizar el crecimiento de alcohol durante los 3 tiempos, así como la disminución presente de glucosa y xilosa.

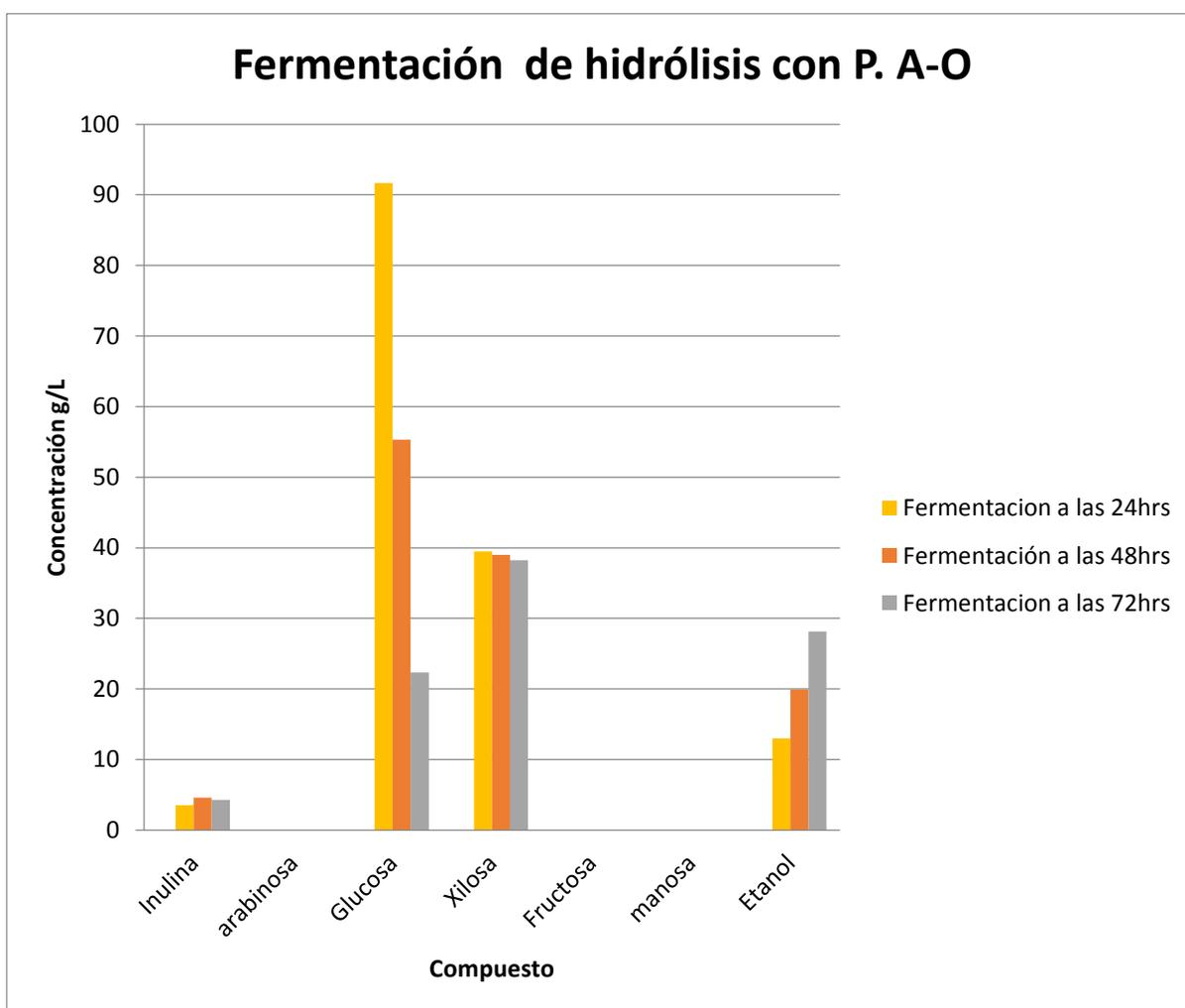


Fig. 28: Gráfica que muestra el avance en la producción de bioetanol mediante el proceso de fermentación de una hidrólisis alcalina- oxidativa

4.5.3. RENDIMIENTO TOTAL

Los gráficos anteriores arrojan la proporción en la cual se encuentra presente la mayor cantidad de azúcares fermentables y posteriormente la conversión de dichos azúcares en alcohol. Por lo tanto el rendimiento porcentual de la conversión efectuada se realizara mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \left(\frac{A}{B}\right) \times 100$$

Donde:

- A = Concentración final de alcohol
- B = Concentración de Glucosa convertida

$$\%R = \left(\frac{28.14}{69.98}\right) \times 100 = 40.211\%$$

$$\%R = 40.211\%$$

4.6. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL PRETRATAMIENTO COMBINADO

4.6.1. CONCENTRACION DE AZÚCARES FERMENTABLES

Durante la etapa de hidrólisis, se determinaron las concentraciones de azúcares a diferentes tiempos, iniciando a un tiempo 0 y concluyendo a las 72 horas, muestreando cada 24 horas. Los resultados arrojados fueron a través del equipo HPLC. En la Figura 29 se puede analizar el crecimiento presente de glucosa y xilosa.

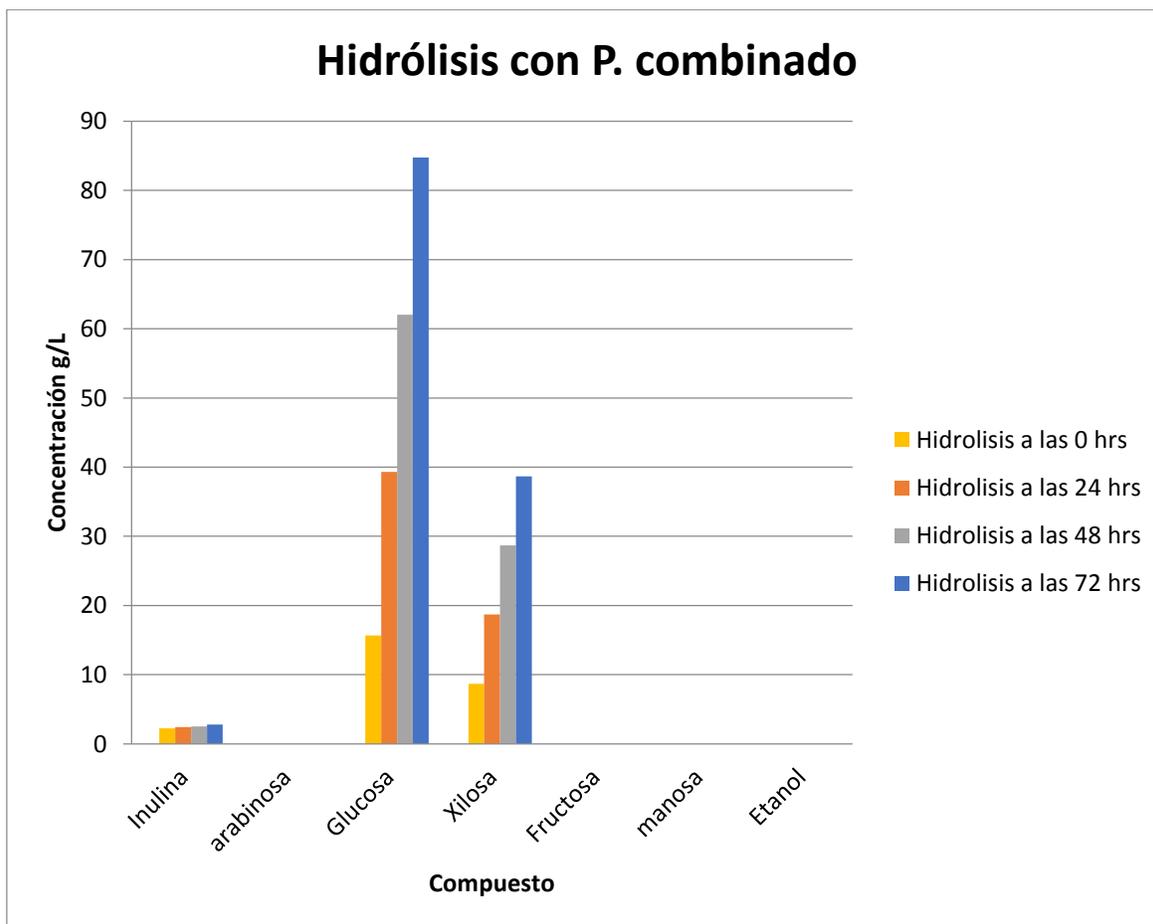


Fig. 29: Gráfica que muestra el avance en la producción de azúcares mediante el proceso de hidrólisis con el pretratamiento combinado.

4.6.2. CONCENTRACIÓN DE BIOETANOL FINAL

Pasando las 72 horas de Hidrólisis es necesario continuar con el proceso de Fermentación. Durante la etapa de dicho proceso, se cuantificaron las concentraciones de azúcares y alcohol cada 24 horas durante las 72 horas que dura el proceso. Los resultados arrojados fueron a través del equipo HPLC. En la Figura 30 se puede analizar el crecimiento de alcohol durante los 3 tiempos, así como la disminución presente de glucosa y xilosa.

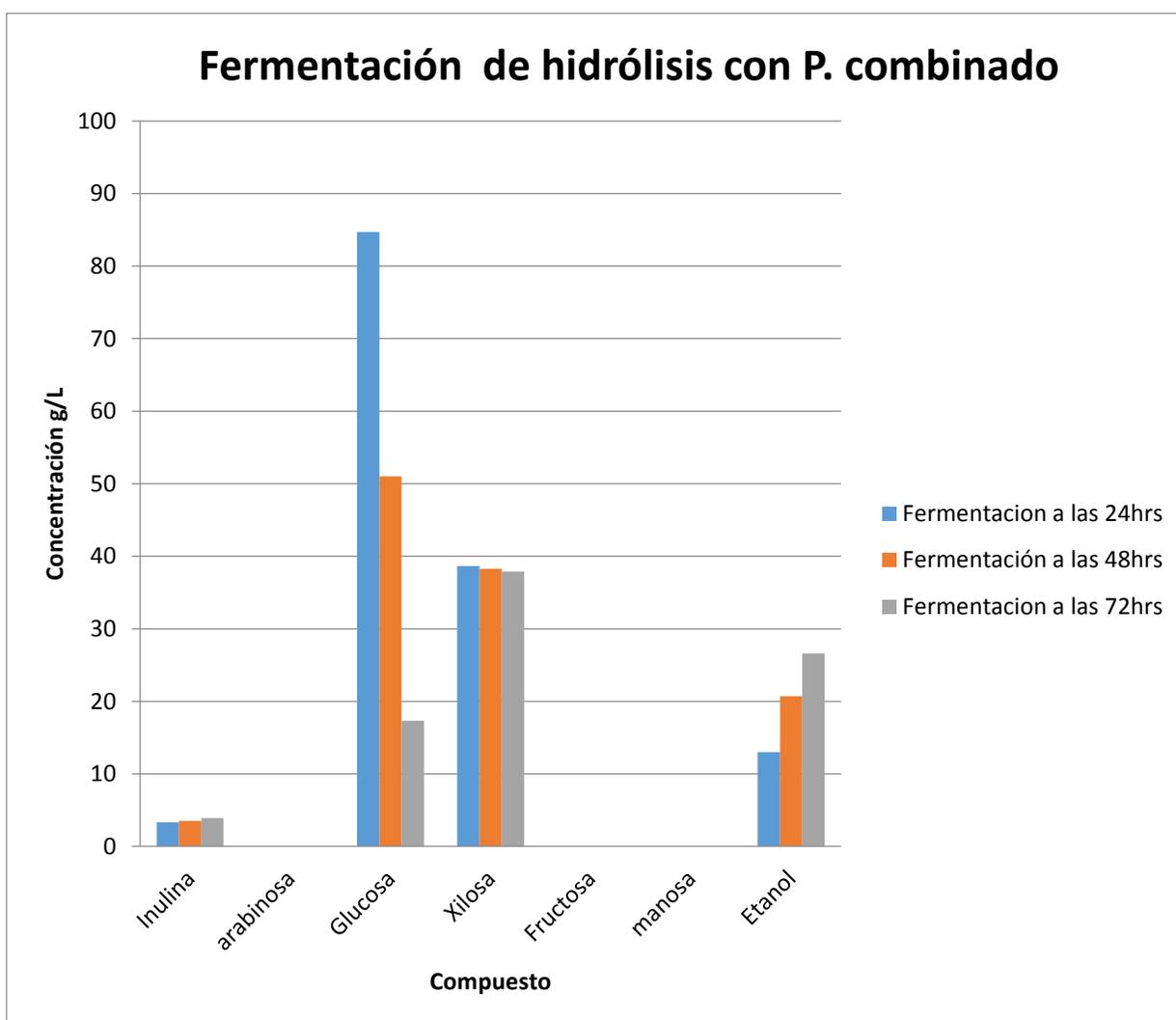


Fig. 30: Gráfica que muestra el avance en la producción de bioetanol mediante el proceso de fermentación de una hidrólisis combinada

4.6.3. RENDIMIENTO TOTAL

Los gráficos anteriores arrojan la proporción en la cual se encuentra presente la mayor cantidad de azúcares fermentables y posteriormente la conversión de dichos azúcares en alcohol. Por lo tanto el rendimiento porcentual de la conversión efectuada se realizara mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \left(\frac{A}{B}\right) \times 100$$

Donde:

- A = Concentración final de alcohol
- B = Concentración de Glucosa convertida

$$\%R = \left(\frac{26.58}{66.72}\right) \times 100 = 39.84\%$$

$$\%R = 39.84\%$$

4.7. RESULTADOS OBTENIDOS CON EL PRETRATAMIENTO ÁCIDO

4.7.1. CONCENTRACION DE AZÚCARES FERMENTABLES

Durante la etapa de hidrólisis con Pretratamiento ácido, se determinaron las concentraciones de azúcares a diferentes tiempos, iniciando a un tiempo 0 y concluyendo a las 72 horas, muestreando cada 24 horas. Los resultados arrojados fueron a través del equipo HPLC. En la Figura 31 se puede analizar el crecimiento presente de glucosa y xilosa.

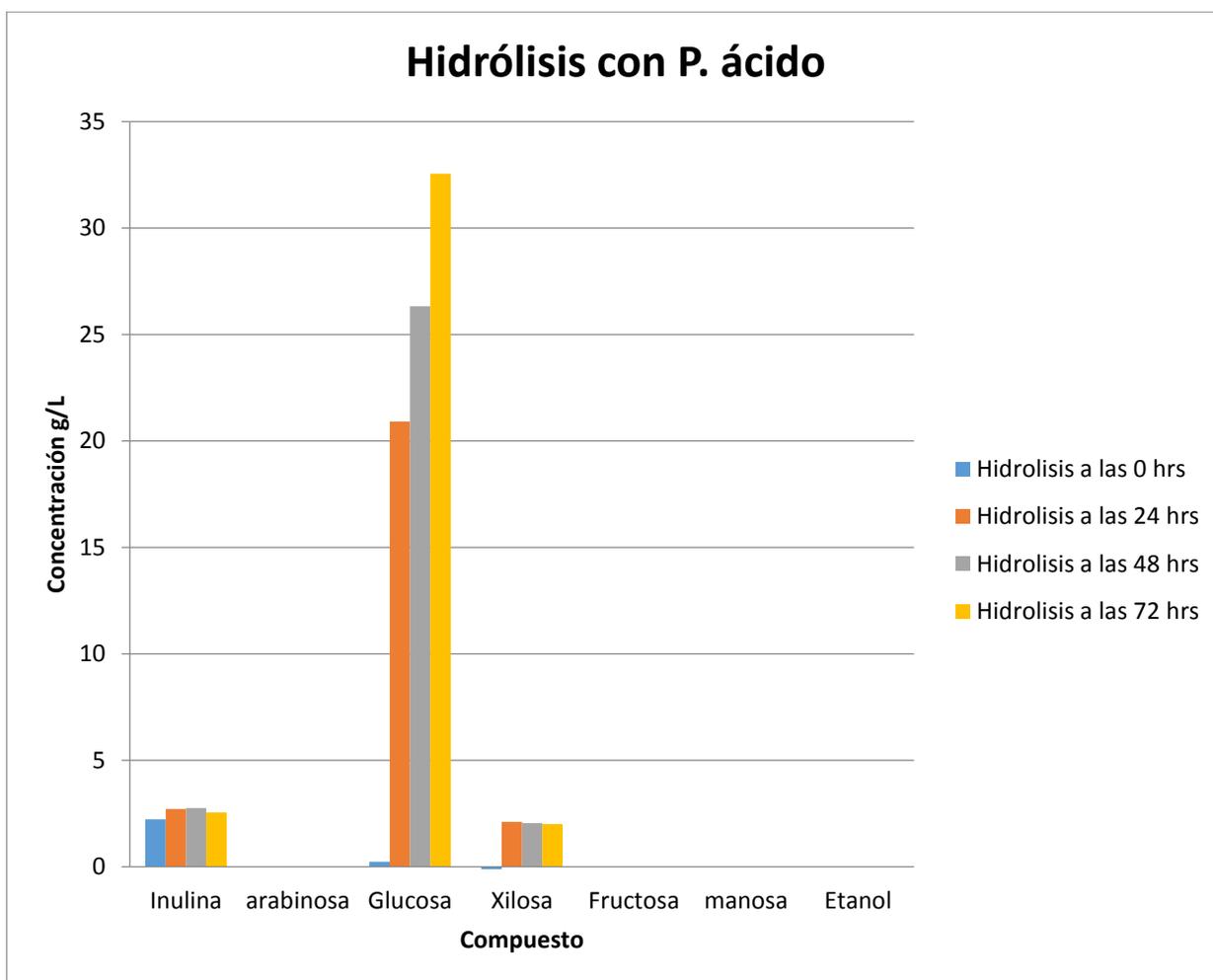


Fig. 31: Gráfica que muestra el avance en la producción de azúcares mediante el proceso de hidrólisis con el pretratamiento ácido.

4.7.2. CONCENTRACIÓN DE BIOETANOL FINAL

Pasando las 72 horas de Hidrólisis es necesario continuar con el proceso de Fermentación. Durante la etapa de dicho proceso, se cuantificaron las concentraciones de azúcares y alcohol cada 24 horas durante las 72 horas que dura el proceso. Los resultados arrojados fueron a través del equipo HPLC. En la Figura 32 se puede analizar el crecimiento de alcohol durante los 3 tiempos, así como la disminución presente de glucosa y xilosa.

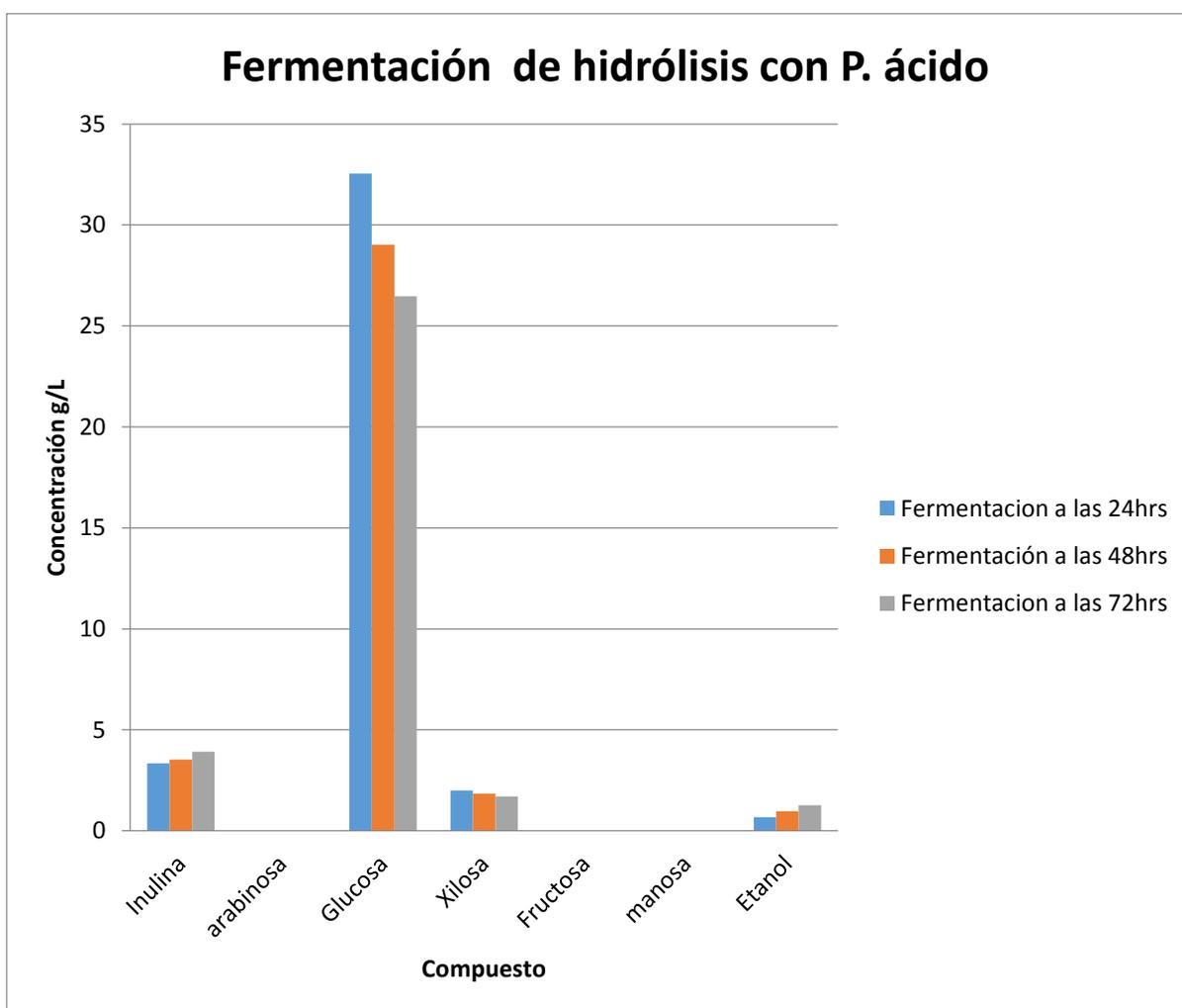


Fig. 32: Gráfica que muestra el avance en la producción de bioetanol durante la etapa de fermentación de hidrólisis ácida

4.7.3. RENDIMIENTO TOTAL

Los gráficos anteriores arrojan la proporción en la cual se encuentra presente la mayor cantidad de azúcares fermentables y posteriormente la conversión de dichos azúcares en alcohol. Por lo tanto el rendimiento porcentual de la conversión efectuada se realizara mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \left(\frac{A}{B}\right) \times 100$$

Donde:

- A = Concentración final de alcohol
- B = Concentración de Glucosa convertida

$$\%R = \left(\frac{1.26}{6.07}\right) \times 100 = 20.923\%$$

$$\%R = 20.923 \%$$

4.8. COMPARACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS ARROJADOS POR LOS 3 PROCESOS

La Tabla 9 arroja un comparativo entre las concentraciones de azúcares fermentables obtenidos a través de los 3 procesos.

Tabla 9. Comparativa de los rendimientos en cuanto a la obtención de azúcares

Concentración (g/L)						
	Alcalino-oxidativo		Combinado		Ácido	
	Glucosa	Xilosa	Glucosa	Xilosa	Glucosa	Xilosa
		91.66	39.47	84.72	38.67	32.55
Azúcares fermentables totales	131.13 g/L		123.39 g/L		34.57 g/L	

en el proceso de hidrólisis.

La Tabla 10 resume y compara las concentraciones de alcohol en la etapa de fermentación obtenidas en los 3 procesos.

Tabla 10. Comparativa de las concentraciones de etanol en los 3 procesos.

Alcalino-oxidativo	Combinado	Ácido
Concentración de etanol (g/L)		
28.14 g/L	26.58 g/L	1.26 g/L

La Tabla 11 resume los resultados obtenidos al final de cada proceso, con lo cual se puede tener un análisis más claro para dilucidar con que pretratamiento es más viable procesar bioetanol de segunda generación.

Tabla 11. Comparativa de los rendimientos en cuanto a la conversión de azúcares a alcohol para cada proceso.

	Alcalino- Oxidativo	Combinado	Ácido
% Rendimiento	40.211 %	39.84 %	20.923 %

La tabla 12 muestra los porcentajes de los rendimientos globales que se obtendrían en cada uno de los procesos a partir de cierta cantidad de materia sólida seca.

Tabla 12. Comparativa de los rendimientos totales a partir de la materia solida seca a pretratar.

	Alcalino-oxidativo	Combinado	Ácido
Azúcares fermentables	69.26 %	63.34 %	35.23 %
Etanol	28.13 %	24.98 %	7.29 %

Los resultados que se obtuvieron a nivel laboratorio en cuanto a la concentración de alcohol y azúcares de 2 referencias en particular se resumen en la tabla 13 [18-22].

Tabla 13. Tabla comparativa de las concentraciones que se obtuvieron a nivel laboratorio.

	Referencia [22].	Referencia [18].
	Alcalino-oxidativo	Combinado
Azúcares fermentables	165.67g/L	136.45 g/L
Etanol	64.59 g/L	27.39 g/L

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al concluir la realización de los 3 procesos a nivel planta piloto, se puede analizar el rendimiento que tienen en cuanto a la conversión de azúcares a etanol en la etapa de fermentación. Esto nos ayudara a deliberar cual proceso es el más adecuado para poderlo efectuar de manera única en planta piloto ó a escala industrial.

El proceso alcalino-oxidativo presenta un amplio porcentaje de rendimiento, además de tener una amplia disminución de la cantidad de azúcares fermentables, seguido del pretratamiento combinado.

El rendimiento teórico que presenta la bibliografía es de un 51% (0.51 g/L) [14], sin embargo, como es bien conocido, los rendimientos teóricos comparados con los experimentales tienen una gran dispersión. A pesar de esto, los resultados que se obtuvieron son notablemente satisfactorios ya que, para los 2 primeros procesos (alcalino-oxidativo y combinado), la concentración de azúcares en la etapa de hidrólisis oscila entre los 120 y 135 g/L.

La justificación al hecho de que no se obtenga una conversión de 51% de azúcares a alcohol como se reporta en la bibliografía, se debe al hecho de que la ruta metabólica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* consume un cierto porcentaje de azúcares del medio en el que se encuentra con la finalidad de elevar su cantidad de biomasa y posteriormente, inicia la etapa de fermentación convirtiendo los azúcares fermentables en bioetanol. Además de que este microorganismo solo consume hexosas.

En el caso del proceso de sacarificación y fermentación con pretratamiento ácido los resultados arrojados no son competitivos en comparación con el alcalino-oxidativo ó el combinado, ya que la mayor concentración de azúcares generados fue de aproximadamente 33 g/L, obteniendo solamente 1.26 g/L de bioetanol. Aunque el rendimiento arrojado sea aproximadamente el 45% del teórico, este

resultado es bastante engañoso ya que en realidad la cantidad de azúcares obtenidos no es factible para un proceso de fermentación.

La principal problemática presente para realizar la metodología de un Pretratamiento ácido, para posteriormente llevarlo a sacarificación y fermentación, es que, se emplea ácido sulfúrico, el cual inhibe el potencial que presentan las enzimas desarrollando una baja concentración de azúcares fermentadores y por ende, una escasa producción de bioetanol. Es por esto que también se opta por emplear microorganismos fermentadores como *Zymomonas mobilis*, la cual produce alcohol a tiempos cortos, sin embargo tiene múltiples inconveniente entre los cuales se pueden citar:

- El tiempo de reproducción es muy tardado
- Se debe tener una rigurosa manipulación ya que fácilmente llegan a contaminarse.
- Presentan rutas metabólicas alternas.

Posiblemente un desarrollo experimental con un ácido diferente a éste, arrojaría mejores resultados, sin embargo la demanda de tiempo es bastante y los modelos experimentales con diferentes variables no son económicos.

Cabe mencionar que los monosacáridos fermentados por la levadura fueron solamente glucosa. En el caso de la xilosa, al poseer una cadena de 5 carbonos, su concentración posterior a la fermentación tan solo es de una disminución de aproximadamente 4gr/L, esto se debe a que las *Saccharomyces cerevisiae* no consumen pentosas, lo que genera un cierto inconveniente al emplearse en este proceso ya que no aprovecha todos los azúcares resultantes de la etapa de hidrólisis. Sin embargo, el rendimiento que presenta para las fermentaciones con pretratamientos alcalino-oxidativo y combinado es muy alto y competitivo con el valor teórico reportado en bibliografía.

La biomasa sobrante del proceso de fermentación presenta una disminución favorable tanto para el proceso alcalino-oxidativo como para el combinado, por lo tanto se puede decir que la materia sólida es aprovechada casi en su totalidad.

Las metodologías desarrolladas a nivel planta piloto presentaron como ventaja una disminución en la porción de la materia sólida lo que demuestra un amplio aprovechamiento de dicho biomaterial. El sobrante no es un desperdicio, ya que actualmente existen procesos que aprovechan este biomaterial para producir combustibles de tercera generación. Cabe mencionar que todos los sobrantes generados durante los pretratamientos, en los cuales quedo desprendida la lignina en el sobrenadante, también se aprovecharon. Ya que actualmente se están realizando bioprocesos que requieren todos estos residuos para obtener un nuevo producto, siendo materia prima del mismo. Se realizó una nueva prueba de humedad al termino del proceso de Fermentación, el cual se mantuvo casi constante como la primer prueba, dando un porcentaje de humedad del 63.45%. En el caso de la caracterización, la experimentación realizada se comparó con datos bibliográficos, uno reportado de literatura y el otro proveniente de un trabajo de tesis reciente. Los resultados que se obtuvieron estuvieron intermedios entre estas dos citas, lo que le da certeza a esta parte experimental.

Las metodologías desarrolladas fueron tomadas de experimentaciones a nivel laboratorio, cuyas relaciones y concentraciones para llevar a cabo el proceso fueron ligeramente cambiadas para fines de disminución de consumo de reactivos. Estos cambios no presentaron ninguna anomalía a los resultados, sino por el contrario, las concentraciones determinadas fueron aceptables y muy similares a las que se tienen reportadas a nivel laboratorio, en donde las concentraciones de azúcares están en un rango de 130 a 160 g/L y un rendimiento de alcohol poco mayor al que se obtuvo en este trabajo, por lo tanto, y bajo esta comparativa se puede decir que la hipótesis es aceptada en base a los resultados obtenidos. La dispersión de la concentración de alcohol en el proceso alcalino-oxidativo se debe a que a nivel planta laboratorio se empleó *Zymomonas mobilis*, el cual aumenta el rendimiento de etanol debido a que consume pentosas y hexosas. Los volúmenes resultantes de la solución final del proceso de fermentación, que contiene bioetanol para efectuar la destilación, son de un 80 a 85% del volumen inicial que se ajustó durante la etapa de Hidrólisis, lo cual hace que su producción sea viable a planta piloto.

6. BIBLIOGRAFIA

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

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

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

[4] Datos estadísticos de agave tequilana a nivel nacional. SAGARPA.

[5] Méndez Romero T. (2015) Evaluación del potencial productivo del agave tequilana como materia prima en la producción de etanol combustible.

[6] C. A. Cardona, Ó. J. Sánchez, L. F. Gutiérrez, "Process synthesis for fuel ethanol production"

[7] Dufey A. (2011). Estudio Regional sobre economía de los biocombustibles 2010: Temas clave para los países de América Latina y el Caribe. Santiago de Chile.

[8] Álvarez, M. C. (2009) Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional.

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

[10] Hoja de seguridad XII. UNAM. Etanol

[11] Scopes, R. y S. Griffiths, Fermentation capabilities of *Zymomonas mobilis* glycolytic enzymes. *Biotechnol. Lett.* (1986).

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

[13] Miliarium, Ingeniería civil y medio ambiente (2009), "Energías renovables";

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

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

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

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

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

[19] Fengel, D. & G. Wegener. (1983). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter.

[20] K. Haider, S. Lim, and W. Flaig., *Holzforschunh* (1964)

[21] Cortínez Villalobos VA., “Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos”. (2010).

[22] Velázquez Valadez U. “Producción de etanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos de Agave Tequilana”

[23] Taherzadeh M.J., Y Karimi K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Inter J Molecular Science*.

[24] Hendriks A.T.W.M., Zeeman, G. (2009). Review: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*.

[25] Canseco, M., B. Couder, Y. Pérez, P. Álvarez y T. Saldaña. Producción de etanol a partir de desechos agroindustriales. Cuerpo académico de Investigación y Desarrollo Agroindustrial. Universidad politécnica de Chiapas. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, (2008).

[26] Zheng, Y., Pam, Z., Zhang, R. (2009) Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric & Biol Eng*. 2, 51-58.

[27] www.ecured.cu/index.php/Lignina; (Consulta 2012).

[28] laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrólisis (Actualización 2003)

- [29] www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.htm; (Consulta 2012).
- [30] Talebnia, Farid y col., Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation, Bioresource technology, (2010)
- [31] Linde M., Galbe, M., ZACCHI, G. (2007). Simultaneous saccharification and Fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast. Enzyme Microb Technol.
- [32] Talebnia F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. Bioresour Technol
- [33] Ward, O.P. Biotecnología de la fermentación. Acribia, S.A. Zaragoza, 1991.
- [34] Gupta, Ram B. y col., Gasoline, Diesel and Ethanol Biofuels from grasses and plants, Cambridge University Press. First Edition, New York, 2010.
- [35] Madigan, Michael T. y col., Biología de los microorganismos, Prentice Hall, Décima edición, 2003.
- [36] Sánchez O., Cardona C., “Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas.”(2005).
- [37] Mendoza Rojas C., Enciso López B., Estandarización de parámetros de operación para obtener bioetanol anhidro por destilación extractiva
- [38] Uyazan, A. M., Gil. I.U.D., Aguler, J. L, Rodríguez, G. Calcedo, L. A., “Producción de alcohol carburante por destilación extractiva: simulación de

proceso con glicerol”, Publicación en revista Ingeniería e Investigación Universidad Nacional de Colombia (2006).

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

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

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

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

[43] A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis.