



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**



FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

**FERMENTACIÓN EN PLANTA PILOTO
DE JUGOS DE AGAVE
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIO-ETANOL**

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

Para Obtener el Grado de:
INGENIERO QUIMICO

Asesor de Tesis:
Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Co-asesor:
M.C. Juan Carlos Farías Sánchez

MORELIA, MICH.

MARZO 2016

RESUMEN

El siguiente trabajo tiene como objetivo estudiar el comportamiento del proceso de fermentación de los azúcares presentes en la planta de agave Tequilana Weber a nivel planta piloto, realizando un aprovechamiento integral de toda la planta (piñas, pencas y hojas), para la producción de bioetanol de primera generación.

Estudios realizados han comprobado que la composición de estos fructanos pueden ser empleados en la producción de etanol a partir de la fermentación con levaduras o bacterias.

Cabe mencionar que los jugos contienen microorganismos nativos, los cuales pueden ayudar a que la fermentación sea más rápida y puedan producir alcohol, 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 al contacto con el aire. Por tal motivo se usara un microorganismo del género *Saccharomyces Cerevisiae*.

Es por eso que primeramente se hace un tratamiento térmico en las piñas y con el fin de desdoblar la inulina presente, de igual manera se hace para las hojas, y así poder obtener los azúcares para realizar la fermentación y así poder llevar a cabo la producción de bioetanol a nivel planta piloto, que posteriormente pasara al proceso de destilación.

Se describe una metodología referente al proceso de fermentación, así como las condiciones de operación y una metodología para ser llevada a nivel planta piloto en base a las proporciones que se adaptan a la capacidad del reactor.

Palabras clave: *Saccharomyces Cerevisiae*, Jugos, Hidrolisis, Fermentación, Levadura.

ABSTRACT

The following paper aims to study the behavior of the fermentation of sugars present in the agave plant Tequilana Weber to pilot plant level , making a full use of the whole plant (pineapples, stalks and leaves) , for the production of bioethanol first generation.

Studies have shown that the composition of these fructans can be used in the production of ethanol from fermentation with yeasts or bacteria.

Include juices contain native microorganisms , which can help fermentation faster and can produce alcohol, however inconvenient this is the poor selectivity , because they may already be fermented in turn generate undesirable side products to change your metabolic pathway in contact with air. Therefore a microorganism of the genus *Saccharomyces cerevisiae* was used.

That is why first heat treatment is done in pineapples and in order to unfold this inulin , just as is done for the leaves, and thereby obtain sugars for fermentation and thus be able to carry out production bioethanol pilot plant level , which later passed to the distillation process.

One concerning the fermentation method and the conditions of operation and a methodology to be carried pilot plant level based on the proportions to suit the capacity of the reactor is described.

Keywords: *Saccharomyces Cerevisiae*, Juice, Hydrolysis, Fermentation, Yeast.

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INDICE DE TABLAS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.2 Justificación	5
1.3 Hipótesis.....	6
1.4 Objetivos	7
1.4.1 <i>General:</i>	7
1.4.2 <i>Específico:</i>	7
2. MARCO TEORICO	8
2.1 Biocombustibles	8
2.1.1 Biocombustibles Sólidos	10
2.1.2 Biocombustibles Gaseosos.....	10
2.1.3 Biocombustibles Líquidos	11
2.1.3.1 Biocombustibles líquidos de primera generación	12
2.1.3.2 Biocombustibles líquidos de segunda generación.....	13
2.1.3.3 Biocombustibles líquidos de tercera generación	14
2.1.3.4 Biocombustibles líquidos de cuarta generación.....	14
2.2 Bioetanol.....	15
2.2.1 Producción de bioetanol en la actualidad	16
2.2.2 Producción de bioetanol utilizando el agave <i>Tequilana Weber</i> como materia prima.....	20
2.3 Descripción de la planta de <i>agave Tequilana Weber</i>.....	21
2.4 Fermentación	23
2.5 Enzima inulinasa	26
2.6 Factores a controlar durante la fermentación	27
2.6.1 Temperatura	27
2.6.2 pH.....	27
2.6.3 Nutrientes.....	27
2.6.4 Aireación	28

2.7 Limitantes de la fermentación	29
2.7.1 Concentración de alcohol	29
2.7.2 Acidez del sustrato	30
2.7.3 Concentración de azúcares	30
2.7.4 Temperatura	30
2.7.5 Ritmo de crecimiento de las cepas	30
2.8 Microorganismos empleados en la fermentación	31
2.8.1 Características principales de los cultivos microbianos utilizados en la fermentación alcohólica	31
2.9 Destilación	31
3 METODOLOGÍA	33
3.1 Material	33
3.2 Levadura	33
3.3 Medio de cultivo Sólido (YPD)	33
3.4 Medio de cultivo Líquido	34
3.5 Reactivos	35
3.6 Equipo	35
3.7 Métodos	36
3.8 Descripción de la Planta Piloto	36
3.9 Determinación del pH	37
3.10 Determinación de los grados Brix	38
3.11 Caracterización química de los jugos obtenidos del agave <i>Tequilana Weber</i>	38
3.11.1 Acondicionamiento de la materia prima	38
3.11.2 Balances de masa	40
3.12 Determinación de azúcares reductores totales	41
3.13 Fermentación	43
3.13.1 Condiciones de operación de la fermentación	43
3.13.2 Fermentación de los jugos de piñas de <i>agave Tequilana Weber</i>	45
3.13.3 Fermentación de los jugos de las hojas de <i>agave Tequilana Weber</i>	46
3.14 Determinación de azúcares y etanol mediante HPLC	46
4 RESULTADOS Y DISCUSIONES	48

4.1 Procesos	48
4.1.1 Proceso 1	48
4.1.2 Proceso 2	50
4.1.3 Proceso 3	51
4.1.3 Proceso 4	53
4.1.4 Proceso 5	54
4.2 Inulina	57
4.3 Porcentaje de humedad	58
4.4 Cuantificación de azúcares reductores totales	58
4.5 Determinación individual de azúcares	59
4.6 Resultados obtenidos con la fermentación de los jugos de las piñas de <i>agave Tequilana Weber</i>	62
4.6.1 Rendimiento total de jugos de piñas	63
4.6.2 Balance de materia de las piñas	64
4.7 Resultados obtenidos con la fermentación de los jugos de las hojas de <i>agave Tequilana Weber</i>	65
4.7.1 Rendimiento total de jugos de las hojas	66
4.7.2 Balance de materia de las hojas	66
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
6 BIBLIOGRAFÍA	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Biocombustibles de primera generación [15].	12
Tabla 2: Biocombustibles de segunda generación [15].	13
Tabla 3: Comparativo gasolina, etanol y ETBE [24].	19
Tabla 4: Análisis Químico del Agave Tequilana Weber [28].	22
Tabla 5: Condiciones de operación del Filtro Prensa.	40
Tabla 6: Solución stock para la curva de equilibrio.	42
Tabla 7: Diluciones para realizar curva de equilibrio.	42
Tabla 8: Azúcares resultantes del proceso 1.	48
Tabla 9: Azúcares resultantes del proceso 2.	50
Tabla 10: Azúcares resultantes del proceso 3.	51
Tabla 11: Azúcares resultantes del proceso 4.	53
Tabla 12: Azúcares resultantes del proceso 5.	54
Tabla 13: Procesos experimentales para la producción de etanol de primera generación.	56
Tabla 14: Porcentaje de humedad en la planta de Agave Tequilana Weber.	58
Tabla 15: ART de los extractos.	58
Tabla 16: Identificación y cuantificación de azúcares de la piña cruda de A. Tequilana.	60
Tabla 17: Identificación y cuantificación de azúcares de las hojas crudas de A. Tequilana.	60
Tabla 18: Identificación y cuantificación de azúcares de la piña cocida de A. Tequilana.	61
Tabla 19: Balance de materia para las piñas.	64
Tabla 20: Balance de materia para las hojas.	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción de agaves en México [8].	4
Figura 2: Estados productores de Agave [8].	5
Figura 3: Biocombustibles desde la materia prima hasta el uso final [10].	8
Figura 4: Esquemas de la producción de etanol [12].	9
Figura 5: Conversión de materias agrícolas en biocombustibles líquidos [10].	11
Figura 6: Demanda mundial de energía [20].	17
Figura 7: Usos principales de etanol en el mundo [20].	17
Figura 8: Demanda mundial de etanol [20].	18
Figura 9: Sustratos utilizados para la producción de alcohol [22].	18
Figura 10: Anatomía del agave Tequilana Weber [27].	21
Figura 11: Fotografía de una piña de Agave Tequilana Weber.	22

Figura 12: Reacción global de obtención de Etanol.	24
Figura 13: Reacción que se tiene durante la fermentación a través de las rutas metabólicas.	29
Figura 14: Saccharomyces Cerevisiae sembradas en el medio sólido.	34
Figura 15: Planta Piloto.	37
Figura 16: Molino MAGRITEP.	39
Figura 17: Prensa tornillo para extracción de jugos.	39
Figura 18: Equipo para moler las hojas del Agave.	40
Figura 19: Reacción presentada en el método DNS.	41
Figura 20: Soluciones obtenidas de la aplicación del método DNS.	43
Figura 21: Airlock empleado para liberar el CO2 producido.	44
Figura 22: Proceso de fermentación.	45
Figura 23: HPLC utilizado para analizar las muestras para la producción de etanol.	47
Figura 24: Diagrama de flujo del proceso 1.	49
Figura 25: Bagazo resultante del proceso 1.	49
Figura 26: Diagrama de flujo del proceso 2.	50
Figura 27: Bagazo resultante del proceso 2.	51
Figura 28: Diagrama de flujo del proceso 3.	52
Figura 29: Autoclave donde se llevó a cabo el proceso 3.	52
Figura 30: Diagrama de flujo del proceso 4.	53
Figura 31: Materia Prima resultante en el proceso 4.	54
Figura 32: Diagrama de flujo del proceso 5.	55
Figura 33: Materia prima cocida del proceso 5.	55
Figura 34: Reactores donde se llevaron a cabo los procesos.	57
Figura 35: Desdoblamiento de la Inulina a Fructosa.	57
Figura 36: Cromatograma de la piña de Agave Tequilana Crudo.	60
Figura 37: Cromatograma de las hojas de Agave Tequilana Crudo.	61
Figura 38: Cromatograma de la piña de Agave Tequilana Cocido.	62
Figura 39: Gráfica que muestra el proceso de fermentación de los jugos de piña.	63
Figura 40: Diagrama con los resultados de extracción de jugos de piñas.	64
Figura 41: Gráfica que muestra el proceso de fermentación de los jugos de hojas.	65
Figura 42: Diagrama con los resultados de extracción de jugos de hojas.	67

1. INTRODUCCIÓN

El etanol se perfila como un recurso energético potencialmente sostenible, con alta viabilidad técnica, que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a largo plazo puesto que a diferencia del petróleo, éste se puede obtener de fuentes vivas como microorganismos (levaduras), los cuales realizan la fermentación de azúcares que pueden provenir de subproductos de grandes procesos industriales; emplear éstos subproductos, como sustratos para ser fermentados y obtener etanol, generan una oportunidad importante en el desarrollo de nuevas formas de energía renovable que generen menos contaminación atmosférica, creando así un desarrollo sostenible con el medio ambiente.

En la actualidad el etanol es producido a precios muy competitivos, a partir de sustratos renovables como la caña de azúcar en Brasil y el maíz en Estados Unidos.

Independientemente de la caña de azúcar y del maíz como materia prima, el maíz es empleado como alimento primordial y al utilizarlo para este fin incrementa no solo su valor si no el de sus derivados. Debido a lo anterior y a que la producción en la actualidad no es suficiente para satisfacer la demanda energética, se han desarrollado nuevos procesos biotecnológicos que utilizan residuos agrícolas y forestales ricos en celulosa y lignina, como sustratos para la obtención de bioetanol.

1.1 Antecedentes

En el mundo el etanol ha adquirido un gran valor por la posibilidad de poder usarlo como combustible, ya sea mezclado con gasolina o utilizarlo directamente, sobre todo porque es una fuente de energía renovable. Al ser mezclado con los productos anteriores nos proporciona un combustible limpio y de mejor calidad [1].

El bioetanol, producto de la fermentación alcohólica de diversos materiales orgánicos a través de la acción de microorganismos, está siendo seriamente estudiado, gracias a la elevación de los precios del petróleo. En la actualidad se está trabajando en la búsqueda de materias primas baratas, que sustituyan a las tradicionales, esto con el fin de alcanzar una mayor eficiencia en los procesos de fermentación, destilación y purificación del etanol producido [2].

El aumento en la producción de etanol en el mundo ha contribuido hacia el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten obtener etanol a partir de residuos orgánicos como: madera, desechos sólidos y de todos los materiales que contengan celulosa y hemicelulosa, lo que permite darle un valor agregado a los desechos de varias industrias convirtiéndolos en materia prima para la obtención de etanol [1].

El costo de producción del etanol está íntimamente relacionado y es dependiente del costo de la materia prima, del volumen y de la composición de la misma. El éxito de cualquier plan de desarrollo de los cultivos para la producción de etanol es dependiente de la selección de los cultivos apropiados, los métodos de producción, así como, la ubicación. Un sistema de producción que sea establecido bajo los costos mínimos de la materia prima y esté completamente integrado, de forma que se aproveche todos los derivados que presentes, presenta las mejores oportunidades para ser exitoso [3].

La dotación de recursos naturales de México como el que se utilizara para realizar dicho trabajo, sugiere que el país puede desarrollar una importante industria de agroenergía y biocombustibles, y contribuir a disminuir la pobreza en zonas donde los costos de los combustibles fósiles los hacen inalcanzables. A pesar de que es un exportador neto de combu

stibles, se estima que el potencial de desarrollo de biocombustibles para consumo interno puede llegar a desplazar hasta en un 30% las importaciones que el país debe hacer para el consumo corriente [4].

México posee vastos recursos naturales para la producción de bioenergéticos resultado de su gran diversidad agrícola y de sus condiciones climáticas y geográficas idóneas para este propósito [5].

Para el año 2007, Brasil y Estados Unidos eran los principales países productores de bioetanol en el mundo; el primero a partir de la caña de azúcar y el segundo a partir del almidón de maíz. Buscando materiales que no compitan con materia prima de origen alimentario se han realizado trabajos en los que se ha utilizado como materia prima plantas de Agave para la obtención del bioetanol, tal es el caso de *Agave Fourcroydes Lem* [6], las pencas enteras (bases y puntas) de Agave Tequilana y otras investigaciones, en las que se ha demostrado que el residuos procedentes de la industria Tequilera, contienen azúcares que pueden ser convertidos en etanol para uso combustible [7].

Es por eso que a nivel nacional se ha optado por buscar fuentes de materias primas que no sean de origen alimenticio, 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 [8].

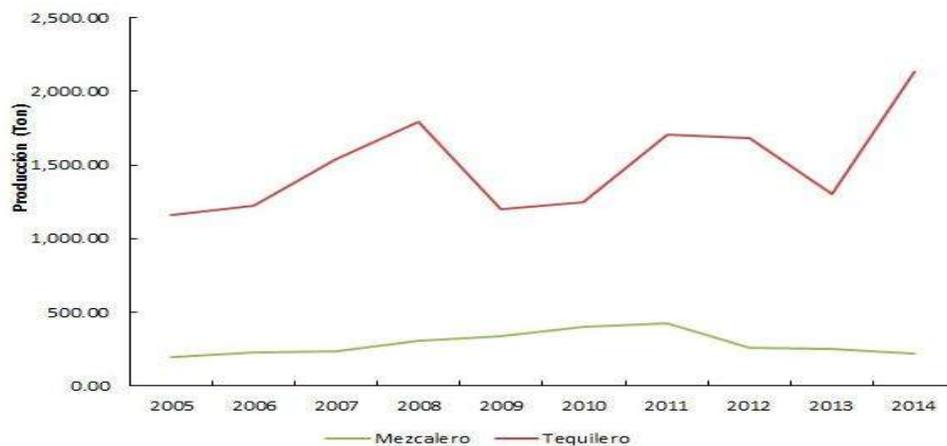


Figura 1: Producción de agaves en México [8].

Los productores de Agave tequilero se encuentran en los municipios comprendidos en la región geográfica que tiene la denominación de origen que incluyen a todo el estado de Jalisco, los municipios de Ahuacatlán, Amatlán de Cañas, Ixtlán del Río, Jala, Jalisco, San Pedro de Lagunillas, Santa María del Oro y Tepic, en el estado del Nayarit, los municipios de Abasolo, Ciudad Manuel Doblado, Cuerámara, Huanímaro, Pénjamo, Purísima del Rincón y Romita pertenecientes al estado de Guanajuato, los municipios de Aldama, Altamira, Antiguo Morelos, Gómez Farías, González, Llera, Mante, Nuevo Morelos, Ocampo, Tula y Xicotencatl del estado de Tamaulipas y los municipios de Briseñas de Matamoros, Cabinda, Chilchota, Churintzio, Cotija, Ecuandureo, Jacona, Jiquilpan, Maravatío, Nuevo Parangaricutío, Numarán, Pajacuarán, Peribán, La Piedad, Régules, Los Reyes, Sahuayo, Tancítaro, Tangamandapio, Tangancicuaro, Tanhuato, Tinguindín, Tocumbo, Venustiano Carranza, Villa Mar, Vista Hermosa, Yurécuaro, Zamora, Zináparo y Marcos Castellanos del estado de Michoacán [8].



Figura 2: Estados productores de *Agave* [8].

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 [9].

1.2 Justificación

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

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

Hoy en día uno de los retos importantes consiste en satisfacer la demanda energética a nivel mundial. En las últimas décadas esta ha sido cubierta con combustibles de origen fósil. Sin embargo, la emisión de gases generados de la extracción, producción y uso de estos combustibles ha provocado un gran daño al medio ambiente. De ahí surge la necesidad de crear nuevos procesos para la producción de bioenergía, con ello se podrá diversificar las fuentes de suministro, reducir la dependencia hacia el petróleo y con ello reducir las emisiones de gases contaminantes.

Por otro lado el uso de materiales lignocelulósicos como lo es el *Agave Tequilana Weber*, resulta atractivo debido a su bajo costo de producción y adaptabilidad a climas extremos, con lo cual se aprovecharía gran parte del territorio mexicano que en su mayoría son terrenos de agostadero, marginales o semidesérticos aunado a esto se impulsará el desarrollo agropecuario y se le daría un uso a los residuos generados en la industria de producción de tequila.

En el presente trabajo se propone la producción de bioetanol de primera generación a partir de los jugos extraídos del *Agave Tequilana Weber*. La producción de este biocombustible se hará a nivel planta piloto, desde la parte de caracterización de la materia prima, hasta la producción del etanol. Con lo cual se determinara si es viable a esta escala para la implementación a nivel industrial.

1.3 Hipótesis

Con base en la gran demanda energética y a los grandes cambios climáticos que se está viviendo hoy en día, se estableció la siguiente hipótesis.

*“La planta de agave será rica en azúcares fermentables, para la producción de bioetanol, que puede ser utilizado como un biocombustible puro o como oxigenante de gasolinas, que al ser un hidrocarburo de bajo peso molecular y con **enlaces sencillos “CARBONO-CARBONO”** disminuye considerablemente los gases contaminantes de tipo invernadero”.*

1.4 Objetivos

1.4.1 General:

- Evaluar la producción de bioetanol de primera generación mediante la fermentación directa de los jugos extraídos de agave, desarrollando una metodología para llevarla a cabo a nivel planta piloto.

1.4.2 Específico:

1. Determinar los azúcares “individuales” presentes en los jugos de piñas como de las hojas.
2. Realizar los balances de materia de forma correcta dentro de la etapa de extracción de los jugos.
3. Determinar el rendimiento total de azúcares convertidos a alcohol.
4. Realizar la cuantificación tanto de azúcares reductores como de etanol, mediante un equipo HPLC.

2. MARCO TEORICO

2.1 Biocombustibles

Los biocombustibles se pueden clasificar según la fuente y el tipo. Se derivan de productos forestales, agrícolas y pesqueros o desechos municipales, así como de subproductos y desechos de la agroindustria, la industria alimentaria y los servicios alimentarios. Pueden ser *sólidos*, como la leña, el carbón vegetal y los gránulos de madera; *líquidos*, como el etanol, el biodiésel y el aceite de pirólisis, o *gaseosos*, como el biogás.

Existe una gran variedad de biocombustibles, de materias primas para su producción y de tecnologías de procesos con diversos grados de alcance, como se observa en la figura:



Figura 3: Biocombustibles desde la materia prima hasta el uso final [10].

En el caso de bioetanol, no existen diferencias entre el de primera o segunda generación, ya que en ambos casos se obtiene alcohol etílico. La diferencia está en que el etanol de primera generación, se obtiene de productos agrícolas que tienen valor alimenticio, pero su costo de producción es más bajo comparado con el de segunda generación [11].

La producción de etanol de primera generación o convencional, se fabrica a partir de caña de azúcar y de maíz, siendo éstos los cultivos más utilizados a nivel mundial. En ambas materias primas, el procesamiento consiste en la conversión bioquímica de los carbohidratos en alcohol. Si bien esta tecnología se utiliza desde la Antigüedad, ésta se ha mejorado enormemente gracias al desarrollo de la tecnología [11].

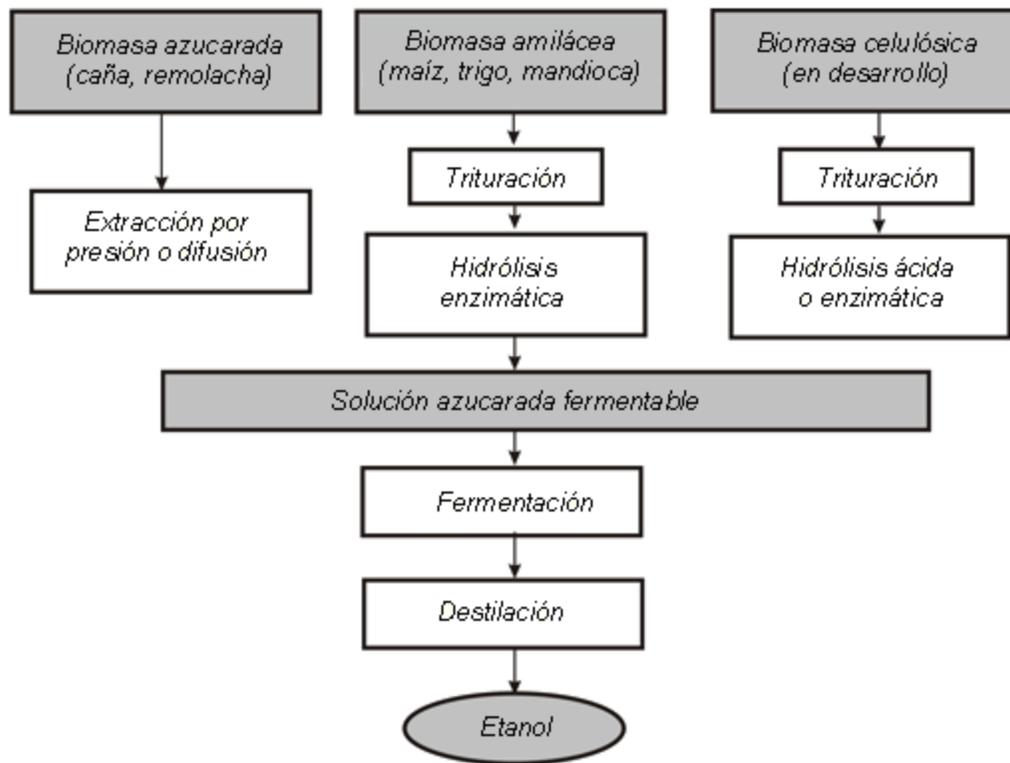


Figura 4: Esquemas de la producción de etanol [12].

Los biocombustibles de acuerdo a su estado de agregación se clasifican de la siguiente manera:

2.1.1 Biocombustibles Sólidos

Se consideran biocombustibles sólidos a aquellos combustibles no fósiles, compuestos por materia orgánica de origen vegetal o animal o producidos a partir de la misma mediante procesos físicos, susceptibles de ser utilizados en aplicaciones energéticas [13].

Las características de cada biocombustible varían según su composición y humedad, de manera que la energía que puede generarse por unidad de masa o de volumen depende de estos parámetros, es por ello que es muy importante el poder calorífico de cada material. Actualmente gracias al desarrollo del mercado, existen gran cantidad de combustibles comerciales empleados mayoritariamente en sistemas de calefacción. Los más comunes son los siguientes:

- Pellets ó briquetas, producidos de forma industrial.
- Residuos agroindustriales, como huesos de aceituna, aserrín y cáscaras de frutos secos.
- Astillas, provenientes de la industria de la primera y segunda transformación de la madera o de podas, clareos y cultivos energéticos.
- Leña, obtenida por el usuario o adquirida en el mercado.

2.1.2 Biocombustibles Gaseosos

Los biocombustibles gaseosos son aquellos combustibles de origen no fósil obtenidos a partir de la descomposición de materia orgánica en condiciones de ausencia de oxígeno [13].

El más conocido es el biogás. Este se genera en dispositivos específicos (digestores) o en medios naturales a partir de las diferentes reacciones que sufre la materia orgánica (biodegradación), mediante la acción de microorganismos así como de otros factores en ausencia de aire.

2.1.3 Biocombustibles Líquidos

Los biocombustibles líquidos son aquellos combustibles de origen orgánico obtenidos a partir de aceites vegetales, grasas animales o cultivos con alto contenido en azúcares. Se obtienen a través de procesos químicos, siendo capaces de sustituir total o parcialmente a los combustibles tradicionales procedentes del petróleo.

Los principales biocarburantes son el biodiesel y el bioetanol, el primero se emplea en motores de gasoil y el segundo en motores de combustión de gasolina [13].

- Biodiésel, se produce a partir de cualquier aceite vegetal o grasa animal, mediante un proceso denominado transesterificación.
- Bioetanol, obtenido a partir de cultivos vegetales con alto contenido en azúcares. A través de la fermentación y posterior destilación.

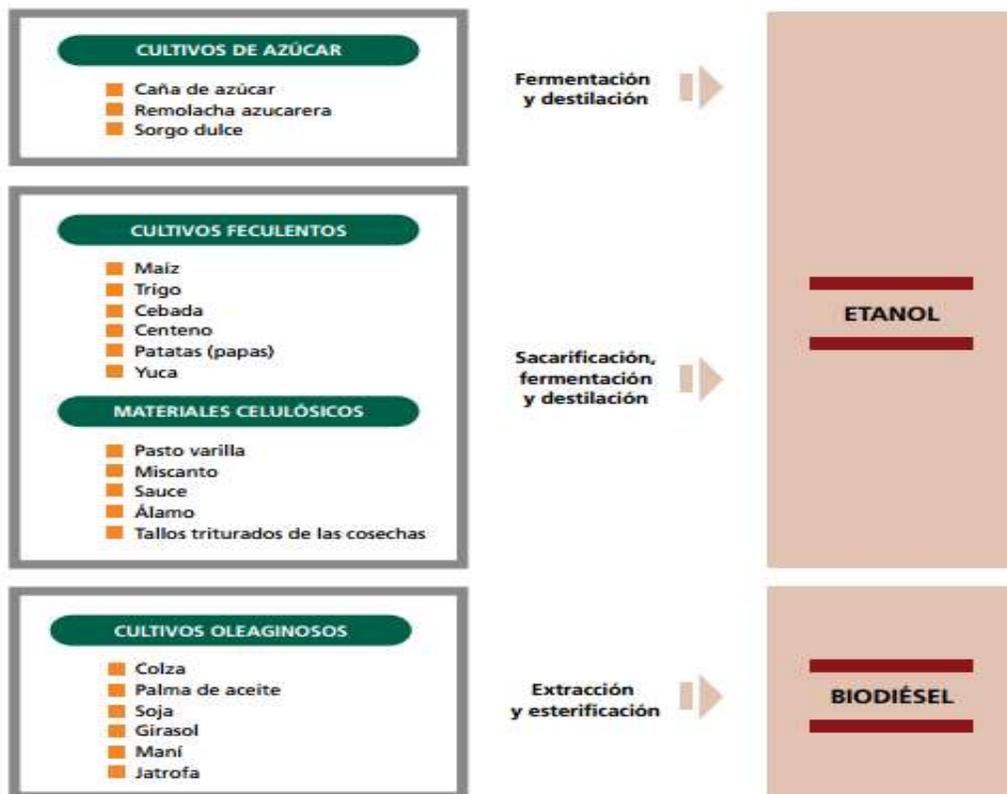


Figura 5: Conversión de materias agrícolas en biocombustibles líquidos [10].

2.1.3.1 Biocombustibles líquidos de primera generación

Los biocombustibles de primera generación son todos aquellos que su producción se basa en su mayoría en materias primas empleadas para la alimentación humana y animal. Por ejemplo los que producen azúcares, almidones y aceites de plantas tradicionales como caña de azúcar, trigo, maíz, palma aceitera y soya. Esos biocombustibles (etanol) ya son producidos y comercializados en cantidades significativas por diversos países.

Los biocombustibles de primera generación son producidos empleando tecnología convencional, mediante un proceso denominado fermentación (para azúcares y carbohidratos), transesterificación (para los aceites y grasas), y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos). La obtención de la realización de los procesos es: etanol, metanol y n-butanol (azúcares), biodiesel (aceites), y biogás (mezcla de metano y anhídrido carbónico, desperdicios orgánicos) [14].

La ventaja de estos biocombustibles es que se obtienen con gran facilidad de procesamiento, con bajas emisiones de gases de efecto invernadero. Pero tiene como desventaja el desvío de recursos alimenticios hacia la producción de energéticos [14].

Tabla 1: Biocombustibles de primera generación [15].

Tipo de Biocombustible	Nombre Especifico	Materia Prima de la Biomasa	Proceso de Producción
Bioetanol	Bioetanol convencional	Remolacha de azúcar, cereales	Fermentación de biomasa hidrolizada
Biodiesel	- Biodiesel proveniente del cultivo energético. - Metanol de semilla de colza (RME) -metanol o etanol de ácido graso (FAME/FAEE)	Cultivo de aceite (ej. Semilla de colza)	Prensado en frío / extracción y transesterificación
Biodiesel	Biodiesel proveniente del derroche	Derroche/ cocinar / aceite freído	Transesterificación

2.1.3.2 Biocombustibles líquidos de segunda generación

Son conocidos como biocombustibles celulósicos, debido a que los insumos con que se producen son residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. Ejemplos de ellos son el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles, etcétera [14].

Los procesos de producción tienen un nivel más complejo que los de primera generación, se clasifican según el proceso bioquímico o termoquímico utilizado:

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

Este último proceso (Fischer-Tropsch) también se le conoce por los nombres de: proceso GTL (Gas-To-Liquids) y proceso BTL (Biomass-To-Liquids), los cuales consisten en la gasificación del carbón y de la materia lignocelulósica, para después sintetizar algún combustible líquido como el etanol [14].

Tabla 2: Biocombustibles de segunda generación [15].

Tipo de Biocombustible	Nombre Específico	Materia Prima de la Biomasa	Proceso de Producción
Bioetanol	Bioetanol celulósico	Biomasa lignocelulósica	Fermentación de biomasa hidrolizada
Biocombustibles sintéticos	- Biomasa hidrolizada (BTL) - Gasóleos fabricados por síntesis de Fischer-Tropsch (FT) - (Bio)diesel sintético - Biometanol - Alcoholes más pesados	Biomasa lignocelulósica	Vía térmica: Pirolisis (carbonización) y síntesis
Biodiesel (híbrido entre 1ª y 2ª generación)	NExBTL	Aceites vegetales y grasa animal	Hidrogenización

2.1.3.3 Biocombustibles líquidos de tercera generación

Los biocombustibles de tercera generación son todos aquellos que su producción se basa en los insumos no alimenticios (vegetales) de crecimiento rápido y con una alta densidad, a los cuales se les denomina “cultivos energéticos”. Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verde-azules [14].

Los procesos para la obtención de estos combustibles se encuentran en proceso de desarrollo, sin embargo, se ha logrado producir a nivel planta piloto.

La ventaja en particular de estos biocombustibles son la capacidad que tienen para secuestrar el anhídrido carbónico (CO₂) para la producción de los insumos reflejándose mediante un balance positivo en la emisión de gases de efecto invernadero, su desventaja es que utilizan las tierras que son para cultivo de alimento, para sembrar los insumos, a excepción de las algas verdes [16].

2.1.3.4 Biocombustibles líquidos de cuarta generación

Los biocombustibles de cuarta generación son producidos a partir de bacterias modificadas genéticamente, las cuales emplean (CO₂) o alguna otra fuente de carbono, para obtener los biocombustibles [14].

En las generaciones antes descritas, en las que también se utilizan bacterias y organismos modificados como insumos o para realizar una parte del proceso, en la cuarta generación, la bacteria es la que efectúa el proceso en su totalidad, para obtener los biocombustibles.

En la actualidad esta generación se encuentra solamente en la teoría, sólo se conoce la ruta de síntesis que sigue el (CO₂) para la obtención de etanol, sin embargo, depende totalmente de la información genética de una bacteria artificial y puede tener limitaciones termodinámicas importantes [14].

2.2 Bioetanol

El bioetanol es un alcohol producido a partir de productos agrícolas como el maíz, sorgo, patatas, trigo, caña de azúcar, e incluso biomasa. Es una fuente de energía ecológica que va ganando investigaciones en todo el mundo, en especial porque el fin del petróleo o el gas natural cada vez es más cercano.

En lo que respecta de este biocombustible tiene ventajas medioambientales y económicas, puesto que reduce la dependencia de los combustibles fósiles; mejora la combustión del motor, teóricamente se puede utilizar en todos los vehículos; es fácil de producir y almacenar; y disminuye la contaminación por gases de tipo invernadero.

Algunos estudios cuestionan estas ventajas, al llegar a la conclusión de que no es viable por contar con gastos elevados en la producción respecto de los carburantes convencionales y por ofrecer un balance energético negativo: la energía necesaria para producirlo, además de provenir de combustibles fósiles, es mayor que la energía producida al quemarse. De otra manera, existe la ausencia de una red de distribución y estaciones de servicio, provocado por muchas compañías petroleras que lo ven como su competidor, frenando su desarrollo [17].

Posee un poder calorífico de 29,000 KJ/Kg.

El etanol tiene como propiedades físicas y termodinámicas las siguientes características:

- Líquido diáfano de olor característico
- Sabor picante
- Volátil
- Considerado inflamable
- Viscosidad (cP): 1.17 (a 20°C)
- Punto de ebullición 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 mmHg

El etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) puede llegar a formar un azeotropo 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.

2.2.1 Producción de bioetanol en la actualidad

Petróleo, gas natural y sus derivados representan el 55% del consumo mundial de energía. Son esos combustibles los que permiten la existencia de los medios de transporte rápidos y eficientes que tenemos hoy, así como gran parte de las actividades industriales. Lamentablemente, ellos no van a durar más que algunas décadas: como combustibles fósiles, sus reservas son finitas, la seguridad de abastecimiento es problemática para muchos países que los importan y su uso es la principal fuente de los gases que están provocando cambios climáticos y el calentamiento global.

Entre los biocombustibles más desarrollados se encuentran el bioetanol y el biodiesel; el bioetanol se obtiene a partir de materias primas ricas en carbohidratos como lo son el maíz, sorgo, caña de azúcar y remolacha azucarera principalmente, mientras que el biodiesel se elabora a partir de materias primas ricas en aceites vegetales como la palma aceitera, canola, soya y algodón [18].

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 [19].

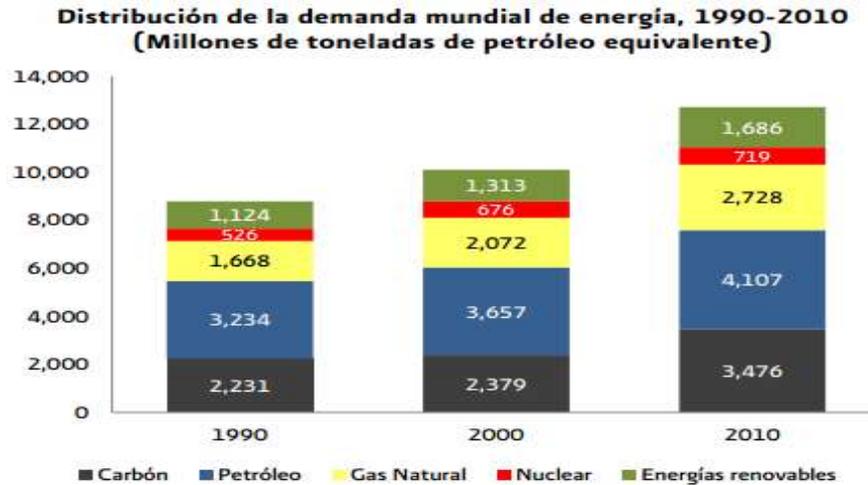


Figura 6: Demanda mundial de energía [20].

Es preciso, entonces, encontrar sustitutos para esos combustibles. Nada más racional que producirlos en base a materia orgánica renovable (biomasa), a partir de la cual en un pasado distante, la naturaleza produjo los combustibles fósiles que utilizamos en la actualidad. Una de las opciones es el etanol, un excelente sustituto para la gasolina, principal combustible usado en automóviles en el mundo.

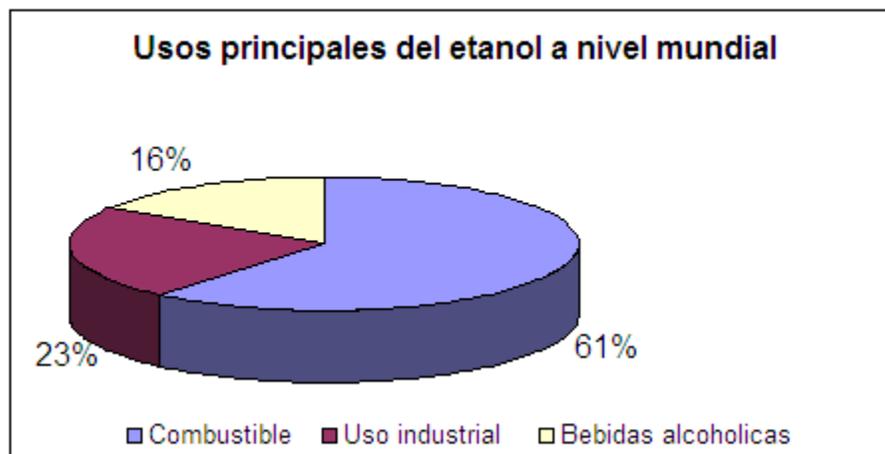


Figura 7: Usos principales de etanol en el mundo [20].

Las energías renovables, como biocombustibles, se presentan como una gran alternativa a los combustibles derivados del petróleo y están tomando fuerza. A partir de biomasa se pueden producir combustibles como biodiesel, biohidrógeno y bioetanol [21], siendo este último en el que se centra esta investigación.

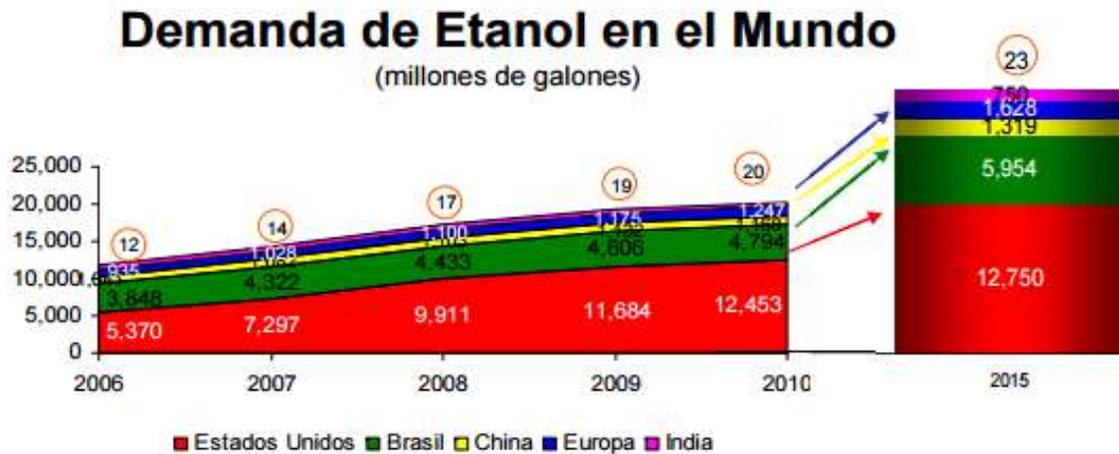


Figura 8: Demanda mundial de etanol [20].

Desde el punto de vista teórico, como materia prima para la producción de etanol, podemos considerar cualquier producto que contenga azúcares o hidratos de carbono fácilmente transformables en azúcares fermentables. Los sustratos para obtener etanol son muy variados y los mismos se muestran de forma resumida en la siguiente Figura:

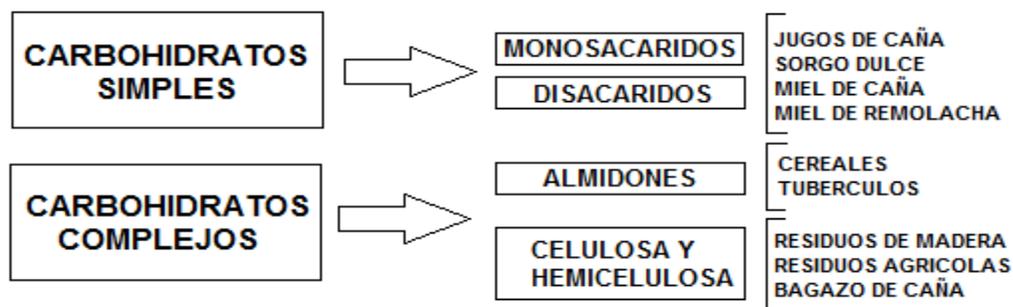


Figura 9: Sustratos utilizados para la producción de alcohol [22].

El etanol puede ser empleado directamente como único combustible en vehículos o como oxigenante de la gasolina, debido a su mayor contenido de oxígeno, permitiendo una mejor oxidación de hidrocarburos que reduce la cantidad de compuestos aromáticos y monóxido de carbono liberado a la atmósfera. Por esta razón, el etanol grado combustible es el mercado con más rápida tasa de crecimiento en América y Europa [23].

Tabla 3: Comparativo gasolina, etanol y ETBE [24].

Característica	Unidad	Gasolina	Etanol Anhidro	Etanol Hidratado	ETBE
Densidad	Kg/l	0.75	0.79	0.81	0.74
Volatilidad	Kg/cm ²	0.75	1.52	1.18	0.34
Relación estequiometría máxima	aire/combust	15.2	..	8.3	..
Calor latente de vaporización	Kj/Kg	376	903	1.141	..
Índice de octano	IOM	85	89	92	102
Índice de octano	IOR	95	106	110	118
Auto ignición	°C	367	550	560	570
Poder calorífico inferior PCI	Kj/Kg	42900	26800	24900	36000

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.

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, principalmente Brasil y USA.

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

En particular, el bioetanol podría reemplazar en forma parcial el uso de la gasolina, sin modificaciones a los motores y con la ventaja de ser renovable y tener un menor impacto ambiental. El proceso de producción de bioetanol de primera generación a partir de residuos comienza con un tratamiento térmico en el caso del agave para desdoblar la inulina presente, lo que permite obtener fructosa que es fermentable por microorganismos como la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* [25].

2.2.2 Producción de bioetanol utilizando el agave *Tequilana Weber* como materia prima

Para la producción de bioetanol en términos generalizados la secuencia del proceso parte a primera instancia en la recepción de la materia prima (Agave Tequilana Weber), la cual es triturada en un molino de cuchillas amplias, enseguida los residuos triturados pasan a una prensa donde se separan tanto en jugos como en bagazo, con lo cual se puede obtener bioetanol de primera (jugos) y segunda generación (bagazo). 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 un tratamiento térmico para desdoblar la inulina presente en el agave, para después proseguir a fermentar los jugos resultantes y continuar con la destilación del bioetanol producido.

En este estudio, utilizando como medio de producción la planta piloto ubicada en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, para obtener etanol (bioetanol) mediante la fermentación de los jugos obtenidos de materia prima de origen agrícola, siendo su objeto principal el agave, y purificarlo hasta obtener una calidad adecuada para su futura deshidratación con el fin de ser destinado a combustible de automoción.

La planta piloto consta de tres etapas básicas del proceso, producción de etanol celulósico: de hidrólisis (ruptura de la matriz celulósica hacia azúcares), de fermentación (transformación del azúcar a alcohol), y de separación (obtención del bioetanol).

En cuanto a lo dicho anteriormente en este trabajo de investigación se trabajara en la segunda etapa de dicha planta (Fermentación), lo cual se trabajara con los jugos obtenidos del agave.

2.3 Descripción de la planta de *agave Tequilana Weber*

El Agave Tequilana Weber requiere de un periodo promedio 7 a 10 años para su desarrollo, es una planta en forma de roseta, crece entre 1.2 y 1.8 m de altura, tallo es grueso, corto y alcanza una altura de 30 a 50 cm al madurar. Es de hojas lanceoladas, acuminadas, de fibras firmes, estriadas, cóncavas, acomodadas de forma ascendente a horizontal, de 90 a 120 cm de largo y de 8 a 12 de ancho. La parte más ancha se encuentra a la mitad de la hoja y son más gruesas y angostas hacia la base. Son generalmente de color azulado o verde grisáceo. El margen es de recto a ondulado o rapando. Los dientes tienen tamaño homogéneo, de 3 a 6 mm de longitud, con bases piramidales y ápices agudos y flexionados, son regularmente espaciados, de 1 a 2 cm de separado, son de color marrón de claro a oscuro. La espina terminal es corta, de 1 a 2 cm de longitud, raramente larga, aplanada o con muescas en haz [26].

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.

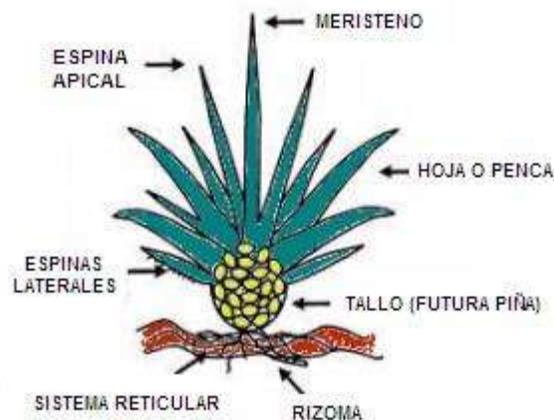


Figura 10: Anatomía del agave *Tequilana Weber* [27].

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.



Figura 11: Fotografía de una piña de *Agave Tequilana Weber*.

En la siguiente tabla se resume las propiedades que presenta el *Agave Tequilana Weber*.

Tabla 4: Análisis Químico del *Agave Tequilana Weber* [28].

Parámetro	Fracciones de la Planta		
	Puntas de Hojas	Bases Hojas	Cabeza o Piña
Porción (% Base Húmeda)	16.40 ± 1.25	32.15 ± 1.85	51.45 ± 2.85
Humedad (%Base Húmeda)	80.25 ± 1.45	78.65 ± 1.55	72.50 ± 1.25
ART (% Base Seca)	25.75 ± 2.35	52.45 ± 2.45	80.35 ± 2.25

2.4 Fermentación

La fermentación alcohólica (o fermentación etílica) es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire (oxígeno), originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como pueden ser por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono (CO₂) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico [29].

Elementos que forman parte de una reacción de fermentación alcohólica [30]:

- Azúcar
- Levadura
- Alcohol Etílico
- Dióxido de Carbono

La fórmula simple de la fermentación es la siguiente [29]:

Azucres + levaduras ==> Alcohol etílico + CO₂ + Calor + Otras sustancias

La fermentación alcohólica al igual que la láctica tiene como propósito obtener energía. Como se muestra en el esquema, el ácido pirúvico se oxida. La glucosa (en la glucólisis) forma dos moléculas de ácido pirúvico (piruvato) que se oxidan nuevamente para obtener un acetaldehído y como producto residual alcohol etílico (etanol) y CO₂. En la siguiente imagen podrás observar este proceso:

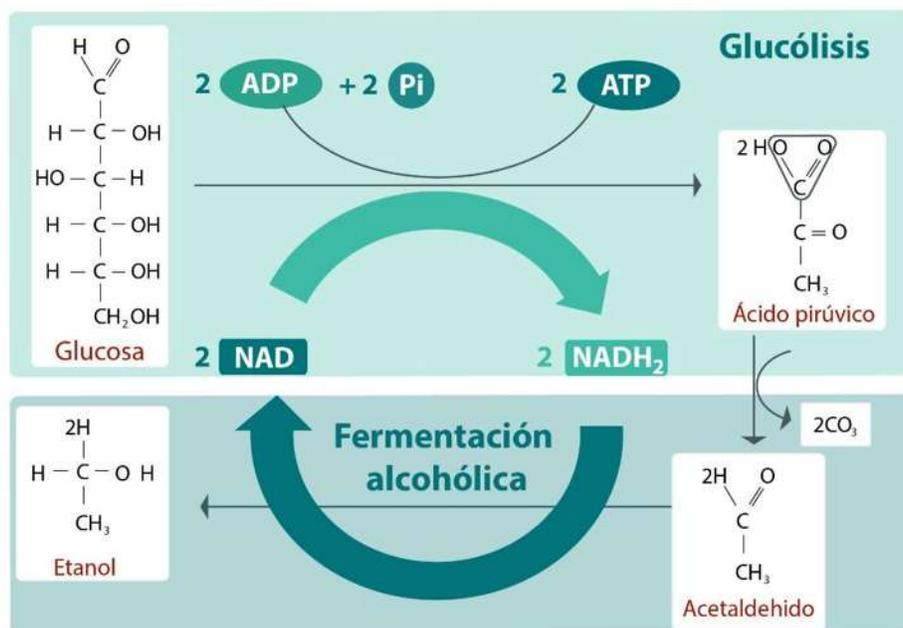


Figura 12: Reacción global de obtención de Etanol.

Las principales responsables de esta transformación son las levaduras y/o bacterias. La *Saccharomyces Cerevisiae*, es la levadura más utilizada a nivel laboratorio e industrial. Existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como la *Zymomonas Mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínima [31].

La fermentación fue descubierta por el químico francés, Louis Pasteur, el cual, en un principio, se refirió al proceso, la vida sin aire. Anteriormente se creía que las fermentaciones eran procesos químicos, donde no se necesitaba la presencia o intervención de ningún microorganismo. Fue Pasteur, quien desmintió esta creencia, gracias a la ayuda del microscopio, pudiendo identificar a los microorganismos que participaban en los procesos de fermentación, e incluso destacando a dos tipos diferentes de levaduras, las cuales jugaban un papel clave en dicho proceso. Una de las levaduras producía alcohol, y la otra daba ácido láctico, el cual estropeaba el vino, dándole un sabor agrio, siendo precisamente los estudios del vino encargados por una fábrica, que quería resolver el problema del vino, lo que llevó a Louis Pasteur a dar con la clave de la fermentación [31].

La humanidad ha empleado la fermentación alcohólica desde tiempos inmemoriales para la elaboración de cerveza (empleando cereales) y del vino (empleando la uva en forma de mosto) fundamentalmente. Algunos procesos similares como en la destilación alcohólica ya surgen en el año 1150 de la mano de Arnau de Vilanova. Fue un elemento más a considerar en el desarrollo histórico de la alquimia durante la edad media.

En el año de 1864 el gas CO₂ resultante de la fermentación por el químico Mac Bride. En 1766 Cavendish lo describió como: “el gas existente en la atmosfera” determinando además la proporción de dióxido de carbono con respecto a la azúcar empleado en el proceso, que rondaba el 57%.

En esta época se empezó a descubrir, gracias a observaciones científicas, que la fermentación alcohólica se producía también en sustancias “no dulces” Antoine Lavoisier hizo experimentos en 1879 determinando las cantidades de los elementos intervinientes en la fermentación (carbono, oxígeno e hidrógeno).

Con el advenimiento de los descubrimientos químicos en el año 1815 el investigador francés Josep Louis Gay-Lussac fue el primero en determinar una reacción de fermentación obteniendo etanol a partir de glucosa, a pesar de este logro los fundamentos de la fermentación alcohólica eran completamente desconocidos [31].

Éstos son el producto final de fermentación de algunos microorganismos:

- Saccharomyces: alcohol etílico y dióxido de carbono
- Streptococo y Lactobacillus: el ácido láctico
- Propionibacterium: ácido propionico, ácido acético, y el dióxido de carbono
- Escherichia coli: ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, alcohol etílico, dióxido de carbono e hidrógeno
- Enterobacter: ácido fórmico, alcohol etílico, ácido 2,3 butanodiol y láctico, dióxido de carbono, e hidrógeno.

- Clostridium: ácido butírico, alcohol butílico, acetona, alcohol de isopropílico, dióxido de carbono, e hidrógeno

En las fermentaciones el resultado que se obtiene es el crecimiento de bacterias, levaduras, hongos o combinaciones de estos. Los cambios ocurridos son causados por los metabolitos que liberan los microorganismos, que son los que juegan un papel fundamental y primario en la fermentación. Un microorganismo que comienza una fermentación se desarrollará hasta que los productos en exceso inhiban el crecimiento [32].

2.5 Enzima inulinasa

Es la enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces β -D-(2-1)- fructosídicos en la inulina originando fructosa y glucosa se le denomina inulasa o β -D-(2-1)-fructano fructohidrolasa, comúnmente conocida como inulinasa, perteneciendo al grupo de clasificación de enzimas hidrolasas glicosidasas [33].

Las enzimas inulinasas se pueden dividir en exoinulinasas y endoinulinasas. Las exoinulinasas empiezan con la separación de la primera molécula de D-fructosa y va hasta el último enlace para liberar glucosa de la unidad de sacarosa. Las endoinulinasas actúan sobre enlaces internos y rinde un conjunto de inulo-oligosacáridos (inulotriosa, inulotetrosa y inulopentosa) pero sin actividad invertasa para hidrolizar el residuo de sacarosa. Estas actividades dependen del origen microbiano de la enzima. [34].

Se ha descrito que la glucosa o fructosa libres en presencia de inulina por lo general moderan la formación de inulinasas [35]. Para corroborar esta prueba el medio de cultivo (estéril) de las fermentaciones se analizó antes de inocular y se encontró que a pH 5.5 las polifruktosas son el sustrato principal, sin embargo, a pH 4 las polifruktosas son hidrolizadas completamente a fructosa y glucosa. De aquí que a valores de pH bajos exista represión catabólica por azúcares residuales. Estos desenlaces demuestran que el pH influye bastante sobre la

producción de la enzima para este microorganismo en particular, y se confirma la represión por azúcares libres.

2.6 Factores a controlar durante la fermentación

2.6.1 Temperatura

La temperatura afecta de manera notable tanto el crecimiento microbiano como la capacidad de desdoblar los azúcares, debido a que los microorganismos tienen un rango restringido de temperatura para su crecimiento, por lo que es necesario controlar la temperatura, ya que por encima de 28/29°C, las levaduras empiezan a morir, deteniéndose el proceso fermentativo [36].

2.6.2 pH

El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaerobio, cambios en el pH causan la desnaturalización de las enzimas y problemas en el intercambio en la membrana celular, por lo tanto es importante tener un control sobre esta variable durante el desarrollo del proceso de fermentación puesto que los microorganismos poseen un pH óptimo (3.5) en el cual tienen mayor velocidad de crecimiento y rendimiento [36].

2.6.3 Nutrientes

Las levaduras necesitan los azúcares para su catabolismo, es decir para obtener la energía para sus procesos vitales, pero además, necesitan de otros substratos para su anabolismo como son: nitrógeno, fósforo, carbono, azufre, potasio, magnesio, calcio y vitaminas, especialmente tiamina (vitamina B1). Es por eso que es muy importante que el medio disponga de una base nutricional, para poder llevar a cabo la fermentación [37].

El nitrógeno es de todos el más importante, siendo necesario que el mosto contenga inicialmente nitrógeno amoniacal y en forma de aminoácidos por encima de 130-150 ppm. Una deficiencia de estos nutrientes hará que "no les quede más remedio" que atacar contra su pesar las gigantescas proteínas, liberándose H₂S (aroma a huevos podridos).

La presencia de esteroides y ácidos grasos insaturados es también necesaria obteniéndolos inicialmente del mosto y posteriormente de las células madres. Esteroides y ácidos grasos insaturados de cadena larga son necesarios fundamentalmente para que sus membranas celulares puedan ser funcionales [37].

2.6.4 Aireación

En relación a la aireación durante el proceso de fermentación la ausencia o presencia de oxígeno permite la selección del microorganismo como de los productos a obtener. Cuando el cultivo se produce con presencia de aire (oxígeno) la fermentación se denomina aeróbica y cuando se carece de O₂ se denomina anaeróbica. En consecuencia se la fermentación se lleva a cabo de manera anaeróbica, solo el 2 % se asimila como material celular y la mayor parte del carbono se emplea como energía. La levadura *Saccharomyces Cerevisiae* posee una actividad metabólica alta, por lo que si el proceso se lleva a cabo de manera aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y si se lleva a cabo anaeróbicamente generalmente se produce etanol [38].

La siguiente figura muestra a detalle la reacción que se tiene durante la fermentación a través de las rutas metabólicas de los microorganismos.

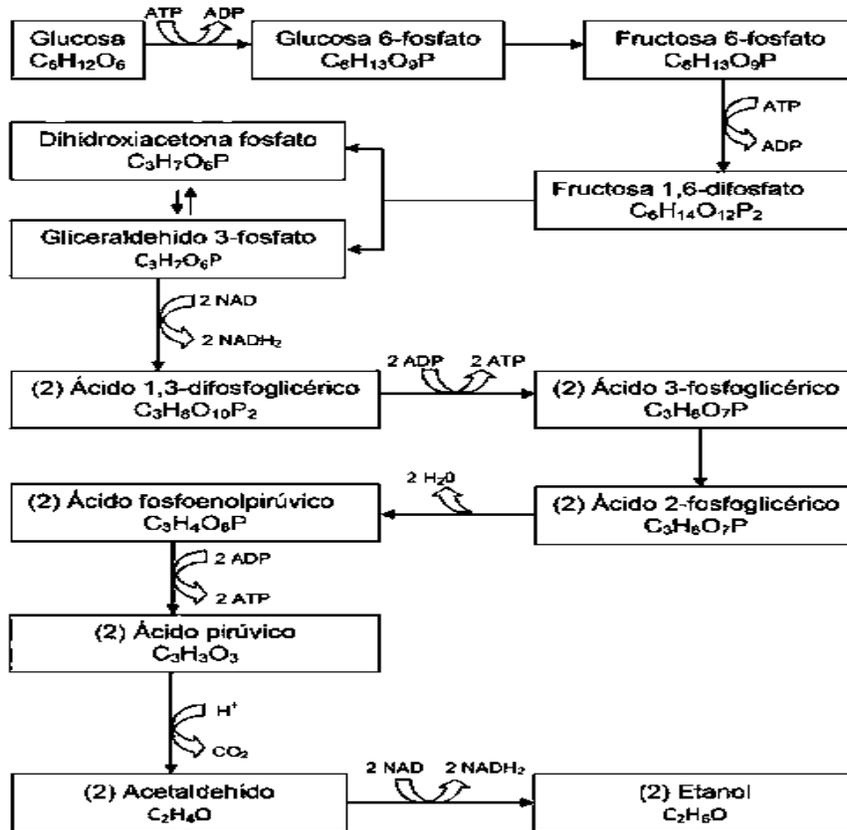


Figura 13: Reacción que se tiene durante la fermentación a través de las rutas metabólicas.

2.7 Limitantes de la fermentación

2.7.1 Concentración de alcohol

En el proceso de fermentación una de las principales limitaciones, es la resistencia que tienen los microorganismos a las concentraciones de etanol que se produce durante la fermentación, algunos microorganismos como la *Saccharomyces Cerevisiae* pueden llegar a soportar hasta el 20% de concentración en volumen [39].

Se llega a la conclusión de que la tolerancia del etanol depende mucho de la habilidad de la membrana y de la fluidez de la misma para exportar el etanol del interior al medio externo.

2.7.2 Acidez del sustrato

En relación a la acidez, el pH es un factor limitante en el proceso ya que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollen, es decir, alcalino o ácido. Se destaca que las levaduras tienen un rango óptimo de pH que va desde 3.5 hasta 5.5. Durante el proceso de fermentación, se producen ácidos, que se forman al tomar el nitrógeno de los aminoácidos lo que ocasiona que el pH tienda a disminuir. En los procesos industriales, se hace uso de soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez [39].

2.7.3 Concentración de azúcares

Durante la fermentación el proceso de osmosis que sucede dentro de la membrana celular se ve afectado por fuentes con un alto contenido de azúcares simples y fermentables como la glucosa, fructuosa y sacarosa, por lo que el rango óptimo es de 10 a 18% en cuanto a la concentración de azúcares, ya que a concentraciones de 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular [39].

2.7.4 Temperatura

Los microorganismos como las levaduras son mesófilos, por lo que su temperatura no debe sobrepasar los 50°C, puesto que a esa temperatura o temperaturas superiores causan su muerte. Debido a que el proceso de fermentación es exotérmico, se debe mantener un control para mantener la temperatura en su valor óptimo que es de 30 °C [38].

2.7.5 Ritmo de crecimiento de las cepas

Durante la fermentación las cepas crecen en número debido a las condiciones favorables que se presentan en el medio presencia de O₂, esto hace que la concentración de levaduras se incremente [38].

2.8 Microorganismos empleados en la fermentación

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

Además, la producción de toxinas es muy inferior a la de otros microorganismos. Entre las especies más utilizadas están: *Saccharomyces cerevisiae* (más usual a nivel industrial), *S. ellipsoideus*, *S. anamensis*, *Candida pseudotropicalis*, *S. carlsbergensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida bytyrii*, *Pichia stipitatis*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia membranaefaciens* [40].

2.8.1 Características principales de los cultivos microbianos utilizados en la fermentación alcohólica

Diferentes investigadores han realizado evaluaciones de cepas alcohólicas de levadura atendiendo a varios aspectos tales como:

- tolerancia al etanol,
- tolerancia a las altas temperaturas
- tolerancia a altas concentraciones de azúcar,
- rendimiento alcohólico,
- eficiencia en la fermentación y productividad.

2.9 Destilación

La destilación es una técnica de separación de sustancias que permite separar los distintos componentes de una mezcla de acuerdo a su punto de ebullición de cada uno de los componentes presentes en la mezcla. Cuanto mayor sea la diferencia entre los puntos de ebullición de las sustancias de la mezcla, más eficaz será la separación de sus componentes; es decir, los componentes se obtendrán con un mayor grado de pureza.

La mezcla etanol/agua forma una mezcla azeotrópica de punto de ebullición mínima de composición de 89,4 % mol de etanol y 10,6 % de agua a 78,2 °C y a

presión atmosférica estándar. Etanol hierve a 78,4 °C y el agua hierve a 100 °C, pero el azeotropo hierve a 78,2 °C, lo cual es bajo respecto a sus constituyentes. En efecto 78,2 °C es la temperatura mínima a la cual la solución etanol agua puede hervir [41].

La separación de mezclas azeotrópicas constituye uno de los problemas técnicos y económicos más importantes y retadores de la industria de procesos químicos para obtener fracciones de elevada pureza. Políticas ambientales como la Ley 693 de 2001 del Ministerio de Minas y Energía de Colombia, donde se establece y se reglamenta que la gasolina debe contener un 10% en volumen de etanol, con lo cual obligan a desarrollar procesos rentables para la producción de etanol anhidro, el cual por limitaciones técnicas debe poseer un contenido muy bajo de agua [42].

Existen varios procesos para producir etanol anhidro, estos incluyen:

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

Las mezclas etanol-gasolina, poseen una baja tolerancia al agua, la cual disminuye al incrementar el porcentaje de etanol o la temperatura. Si la temperatura del motor de un vehículo baja y se sobrepasan los valores máximos permitidos de contenido de agua se forman dos fases se comienzan a generar problemas en el funcionamiento del motor. En este sentido, la producción de etanol anhidro se convierte en una prioridad a nivel ambiental, tecnológico y económico.

3 METODOLOGÍA

3.1 Material

- Jugos de piñas de *Agave Tequilana Weber*
- Jugos de hojas de *Agave Tequilana Weber*

3.2 Levadura

- *Saccharomyces Cerevisiae*

3.3 Medio de cultivo Sólido (YPD)

El medio solido se prepara con los siguientes compuestos a dichas concentraciones.

- | | |
|------------------------|--------|
| • Glucosa | 20 g/L |
| • Peptona | 20 g/L |
| • Agar bacteriológico | 15 g/L |
| • Extracto de levadura | 10 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 se deja enfriar un poco por seguridad, posteriormente es vaciado 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 (para

esterilización de la zona) estriando en forma de abanico, procurando un espacio para su reproducción dentro del medio.

Al terminar el procedimiento anterior se coloca nuevamente en la incubadora boca abajo, es decir, apoyada sobre la tapa. De modo que el agar queda en la parte superior y al condensarse el vapor de agua que generan los microorganismos por su metabolismo, cae sobre la tapa, evitando que los microorganismos se diluyan, manteniéndose fijados al sustrato.

En la siguiente Figura se puede observar las colonias crecidas.



Figura 14: *Saccharomyces Cerevisiae* sembradas en el medio sólido.

3.4 Medio de cultivo Líquido

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

- Glucosa 20 g/L
- Peptona 20 g/L

- Extracto de levadura 10 g/L

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

Concluido ese tiempo la solución se deja enfriar un poco por seguridad, 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 (para esterilización de la zona) tomando las lavaduras de las cajas de Petri antes inoculadas.

Al terminar el procedimiento anterior se coloca en un shaker a 30°C, durante un periodo de 12 hr para que crezcan las levaduras en dicho medio y posteriormente verterlo a los jugos para comenzar la fermentación.

3.5 Reactivos

- D (-) Fructosa (F-2543, S. A.)
- D (-) Xilosa (7665, HY)
- D (-) Manosa (104, HY)
- L (+) Arabinosa (A-3256, S. A.)
- D (+) Glucosa (D-9434, S. A.)
- Ácido 3-5, dinitro-salicílico (D-0550, S. A.)
- Etanol (6417, S. A.)

3.6 Equipo

- Balanza analítica, Sartorius modelo BP61S, precisión ± 1 mg
- HPLC (VARIAN)
- Estufa Felisa FE-291A
- Molino de 4 aspas MAGRITEP
- Prensa tornillo Inventa Duty Motor N° de serie 201082900-100
- Espectrómetro JENWAY modelo 7305 N° de serie 39883
- Autoclave Felisa modelo FE-399

- Bomba cromatografía cuaternaria VARIAN 350
- Detector diferencial de índice de refracción VARIAN 800
- Control de temperatura del HPLC
- Automuestreador VARIAN 410

3.7 Métodos

- Azúcares reductores totales (ART). Método DNS
- Cromatografo HPLC

3.8 Descripción de la Planta Piloto

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

- Reactor 1 de 50 L de volumen para efectuar pre-tratamientos 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 siguiente figura muestra como está conformada la planta piloto donde se efectuaran dicha experimentación para la producción de bioetanol:



Figura 15: Planta Piloto.

3.9 Determinación del pH

Posterior al Prensado se determinó el pH de los jugos obtenidos tanto de las hojas como de las piñas procurando que este esté un poco ácido (3.5-4.5) para que se pueda llevar a cabo la fermentación, característica del *Agave Tequilana Weber*, no necesita ajustarse y si en dado caso que estuviera muy acido se procede a ajustar el pH con una solución de Ca(OH)_2 hasta llegar a ese valor

establecido, agregando paulatinamente la solución tomando las lecturas con un pH metro para tener una estabilidad y control.

3.10 Determinación de los grados Brix

Al igual que la medición del pH, se continuó con la determinación de los grados Brix de los jugos resultantes del prensado, el cual consiste en tomar una muestra de los jugos y agregar unas pequeñas gotas en un refractómetro digital para obtener dicho resultado.

3.11 Caracterización química de los jugos obtenidos del agave *Tequilana Weber*

Para realizar la caracterización química de los jugos extraídos se realizaron las siguientes actividades:

- Molienda y extracción de los jugos tanto de las hojas como de las piñas.
- Determinación del porcentaje de azúcares contenidos en las hojas y piña del Agave.
- Identificación de los azúcares presentes en el Agave.

3.11.1 Acondicionamiento de la materia prima

Para obtener el jugo de la planta, las piñas se pasaron por la banda transportadora del molino para realizar la molienda de estas en una trituradora MAGRITEP de 4 espas con navajas angulares como lo muestra la Figura 16, las fibras fueron recolectadas en una carreta MAGRITEP y posterior a esto se puso a cocer las fibras durante 4 horas y 120°C con el fin de hidrolizar los polisacáridos.



Figura 16: Molino MAGRITEP.

Una vez teniendo ya cocidas las fibras se trasladaron a una prensa de tornillo para realizar la extracción de los jugos utilizando unos discos de contrapeso para retirar el mayor jugo del bagazo.



Figura 17: Prensa tornillo para extracción de jugos.

Se repitió el mismo procedimiento para la obtención del jugo de las hojas a diferencia que estas fueron molidas con otro molino como el que se muestra en la Figura 18. En ambos casos se obtuvo un jugo color verde esmeralda, los cuales fueron recolectados en bidones de plástico cerrados herméticamente, y almacenados a una temperatura de 4°C.



Figura 18: Equipo para moler las hojas del Agave.

3.11.2 Balances de masa

Los balances de masa se realizaron con la finalidad de determinar el porcentaje de jugo y bagazo, para el balance de masa de las piñas 1000 kg entraron al molino ($F=1000$ Kg), repartiéndose en dos corrientes nuevas (B) para el bagazo resultante, (J) para los jugos obtenido. Las pérdidas de materia prima en el molino y del traslado para darles el tratamiento térmico fueron despreciables, por lo que no se consideraron. El mismo procedimiento se hizo para las hojas con una alimentación de ($F= 1000$ Kg).

En ambos casos se determinó la densidad del jugo realizando el filtrado de este y utilizando la técnica de picnometría.

Tabla 5: Condiciones de operación del Filtro Prensa.

Característica	Asignación
Tipo de motor	Asíncrono
Tensión del motor	220 V
Corriente del motor	14.4 A
Frecuencia del motor	60 Hz
Tipo de refrigeración	Automático
Factor de sobrecarga	150%
Frecuencia mínima	20 Hz

-Se prepara buffer de acetatos 0.1 M

2.259 ml de ácido acético en 500 ml de agua

5.213 gramos de Acetato de sodio para 500 ml de agua

Se mezclan para dar 1 L de Buffer de acetatos

-Reactivo DNS

0.25 g de 3, 5 Dinitrosalicílico

0.75 g de Tartrato de Sodio y Potasio

50 ml de NaOH 2M (4 g de NaOH en 50 ml de agua destilada)

Diluir en un matraz de 250 ml y aforar con agua destilada (proteger de UV con aluminio).

Para la determinación de los azúcares reductores totales, se determinó realizando una curva de calibración donde se preparó una solución de 6.0076 mg/ml empleando glucosa como estándar, a partir de la cual por medio de diluciones se prepararon las soluciones con las concentraciones como se indican en la tabla.

Tabla 6: Solución stock para la curva de equilibrio.

Agua	250 ml
Glucosa	1.5019 gr
Concentración	6.0076 mg/ml

Tabla 7: Diluciones para realizar curva de equilibrio.

Solución stock (ml)	Buffer de acetatos	Absorbancia 540nm
0.1	0.9	--
0.2	0.8	0.024
0.3	0.7	0.071
0.4	0.6	0.133
0.5	0.5	0.211
0.6	0.4	0.282
0.7	0.3	0.357
0.8	0.2	0.436
0.9	0.1	0.537
1	0	0.594

-Para determinar las absorbancias (ABS)

Se toman 0.1 ml de cada tubo, se mezclan con 3 ml de DNS, se calienta a ebullición por 8 minutos, pasado el tiempo se realiza un choque térmico introduciendo los tubos a una tina con hielos para parar la reacción, se diluyen con 10 ml de agua destilada, se leen cada uno de los tubos en el espectro y se anotan las absorbancias obtenidas a 540 nm.



Figura 20: Soluciones obtenidas de la aplicación del método DNS.

3.13 Fermentación**3.13.1 Condiciones de operación de la fermentación**

En cuanto a la fermentación, las condiciones que se requieren, es una temperatura de 30°C, para evitar que la levadura contenida en el medio líquido de fermentación sea destruida, esta se vertió, 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 2% en volumen con relación a la cantidad de jugos a fermentar, 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, para que pueda escapar el gas sin que genere acumulación dentro del reactor y pueda presentar problemas, además de evitar una contaminación dentro del mismo.



Figura 21: Airlock empleado para liberar el CO₂ producido.

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 bidones cerrados herméticamente con el fin de evitar que el alcohol generado pueda volatilizarse. Se cuantifica tanto el jugo obtenido como la conversión de los azúcares que se tienen al final del proceso. El jugo posteriormente es llevado a un proceso de destilación.



Figura 22: Proceso de fermentación.

3.13.2 Fermentación de los jugos de piñas de *agave Tequilana Weber*

Posterior al tratamiento térmico se prosigue con la inoculación del reactor mediante un medio líquido de cultivo preparado con un 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 2% con respecto al volumen de jugo presente.

Como se tienen 40 L (capacidad del reactor de la planta piloto) en volumen de jugos hidrolizados, se requiere 0.8 L de dicho medio de fermentación, por lo tanto las cantidades que se requieren para realizar la inoculación son:

- Glucosa 16 g/L
- Peptona 16 g/L
- Extracto de levadura 8 g/L

3.13.3 Fermentación de los jugos de las hojas de *agave Tequilana Weber*

Posterior al tratamiento térmico se prosigue con la inoculación del reactor mediante un medio líquido de fermentación preparado con un 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 2% con respecto al volumen de jugo presente.

Como se tienen 40 L (capacidad del reactor de la planta piloto) en volumen de jugos hidrolizados, se requiere 0.8 L de dicho medio de fermentación, por lo tanto las cantidades que se requieren para realizar la inoculación son:

- Glucosa 16 g/L
- Peptona 16 g/L
- Extracto de levadura 8 g/L

3.14 Determinación de azúcares y etanol mediante HPLC

El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica, mediante este método se analizan diferentes muestras para poder cuantificar la concentración tanto de los azúcares como del etanol presentes en las muestras.

Antes de utilizar esta técnica se preparan disoluciones 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.

La metodología para realizar esta técnica, engloba los siguientes pasos:

- Tomar 0.2 ml de cada una de las muestras de los jugos obtenidos, 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 son 15 minutos a 13300 rpm para la precipitación de los sólidos presentes.
- Al termino del tiempo de centrifugado, las muestras se filtran mediante una membrana Milipore de 0.22 μm , con la finalidad de retener microorganismos que puedan alterar los resultados.
- Finalmente son colocados en viales roscados, procurando que el volumen de la muestra sea mayor a la mitad de su capacidad, para evitar que el cromatógrafo succione aire y se pueda descomponer.
- Los viales serán colocados en el carrusel del HPLC 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

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



Figura 23: HPLC utilizado para analizar las muestras para la producción de etanol.

4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Procesos

Durante este proyecto se prosiguió primeramente con la realización de varios procesos con las piñas de Agave Tequilana, para ver cual nos resultaba más factible para obtener la mayor concentración de azúcares para fermentarlos a bioetanol, los procesos se describen a continuación.

4.1.1 Proceso 1

En este proceso se tenía la materia prima la cual se hizo pasar por el molino MAGRITEP Figura 16, lo resultante de la molienda se hizo pasar por una prensa tipo tornillo Figura 17, de la cual se obtienen los jugos y el bagazo, se prosiguió a filtrar los jugos, los cuales se pusieron a cocer una temperatura de 95°C y 2 horas, en el reactor de fermentación de la planta piloto, terminando el proceso de cocción se cuantificaron los azúcares.

Tabla 8: Azúcares resultantes del proceso 1.

Proceso	Azúcares (HPLC g/L)
1	108.43



Figura 24: Diagrama de flujo del proceso 1.



Figura 25: Bagazo resultante del proceso 1.

4.1.2 Proceso 2

Este proceso fue similar al primero, excepto que a este se le dieron dos molidas, la materia prima se hizo pasar por el molino MAGRITEP Figura 16, después se hizo pasar por el molino pequeño Figura 18, al término de la molienda la materia prima se pasó por una prensa tipo tornillo Figura 17, de la cual se obtienen los jugos y el bagazo, se prosiguió a filtrar los jugos, los cuales se pusieron a cocer una temperatura de 95°C y 2 horas, en el reactor de fermentación de la planta piloto, terminando el proceso de cocción se cuantificaron los azúcares.

Tabla 9: Azúcares resultantes del proceso 2.

Proceso	Azúcares (HPLC g/L)
2	108.43

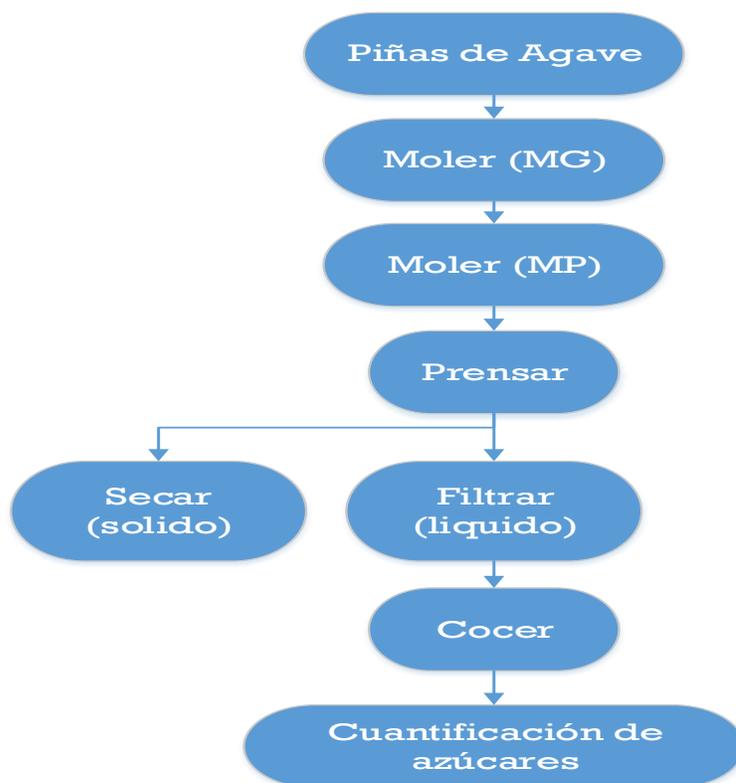


Figura 26: Diagrama de flujo del proceso 2.



Figura 27: Bagazo resultante del proceso 2.

4.1.3 Proceso 3

En este proceso se utilizó pencas de agave, las cuales se pusieron a cocer en un autoclave a una temperatura de 120°C y 3 horas de cocción, estas se hicieron pasar por la prensa tornillo Figura 17, de la cual se obtienen los jugos y el bagazo, al término del proceso del prensado se prosiguió a filtrar los jugos, a los cuales se les cuantificaron los azúcares.

Tabla 10: Azúcares resultantes del proceso 3.

Proceso	Azúcares (HPLC g/L)
3	299.6

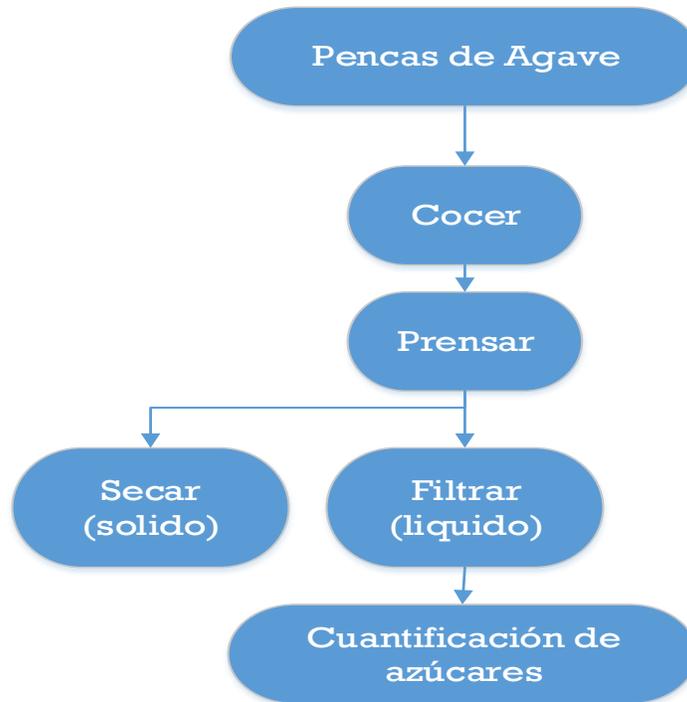


Figura 28: Diagrama de flujo del proceso 3.



Figura 29: Autoclave donde se llevó a cabo el proceso 3.

4.1.3 Proceso 4

Este proceso la materia prima se hizo pasar por el molino MAGRITEP Figura 16, al término de la molienda, la materia prima se puso a cocer en el reactor de fermentación a una temperatura de 95°C por un tiempo de 14 horas, al término del proceso de cocción la materia se hizo pasar por una prensa tipo tornillo Figura 17, de la cual se obtienen los jugos y el bagazo, se prosiguió a filtrar los jugos, terminando el proceso de prensado se cuantificaron los azúcares.

Tabla 11: Azúcares resultantes del proceso 4.

Proceso	Azúcares (HPLC g/L)
4	174.36

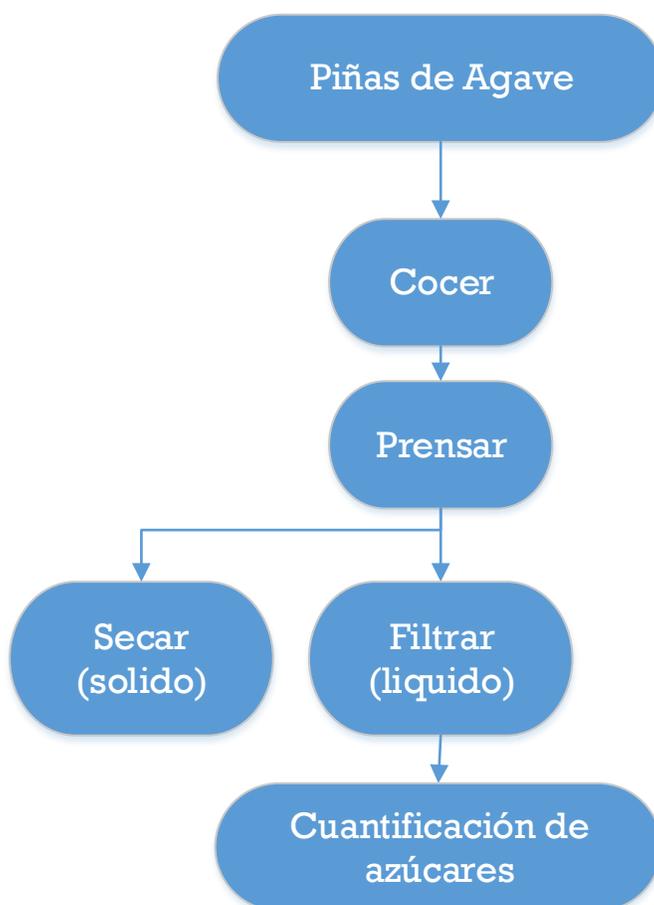


Figura 30: Diagrama de flujo del proceso 4.



Figura 31: Materia Prima resultante en el proceso 4.

4.1.4 Proceso 5

Este proceso la materia prima se hizo pasar por el molino MAGRITEP Figura 16, al término de la molienda, la materia prima se puso a cocer en el reactor de fermentación a una temperatura de 95°C por un tiempo de 10 horas, al término del proceso de cocción la materia se hizo pasar por una prensa tipo tornillo Figura 17, de la cual se obtienen los jugos y el bagazo, se prosiguió a filtrar los jugos, terminando el proceso de prensado se cuantificaron los azúcares. Para este proceso se realizaron varias corridas a diferente tiempo y diferentes temperaturas.

Tabla 12: Azúcares resultantes del proceso 5.

Proceso	Condiciones	Azúcares (HPLC g/L)
5	T=95°C, t=10hr	44.19
5	T=115°C,t=10hr	275.18
5	T=110°C,t=10hr	257.81
5	T=115°C, t= 5hr	207

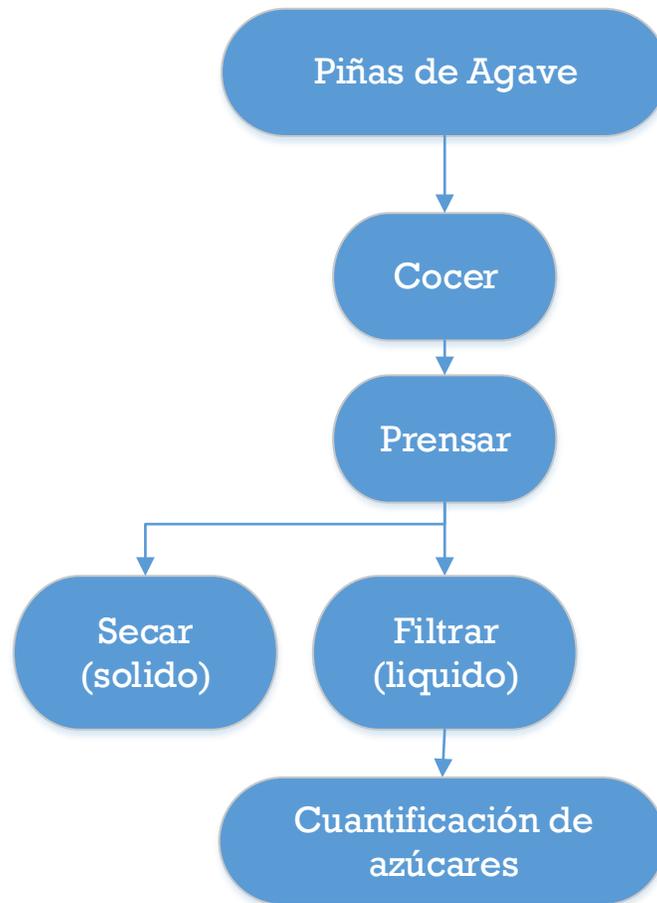


Figura 32: Diagrama de flujo del proceso 5.



Figura 33: Materia prima cocida del proceso 5.

La Tabla 13 muestra los resultados obtenidos en cada uno de los procesos experimentales, que se llevaron a cabo para analizar la producción de etanol de primera generación, estos resultados fueron obtenidos mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

Tabla 13: Procesos experimentales para la producción de etanol de primera generación

Proceso	Condiciones	Azúcares (HPLC g/L)
1	T=95°C, t=2hr	108.43
2	T=95°C, t=2hr	108.43
3	T=120°C, t=3hr	299.6
4	T=95°C, t=14hr	174.36
5	T=95°C, t=10hr	44.19
5	T=115°C, t=10hr	275.18
5	T=110°C, t=10hr	257.81
5	T=115°C, t= 5hr	207

Cabe destacar como se observa en la Tabla 13, que en el autoclave se tiene una mayor concentración de azúcares dado que se lleva a una temperatura de 120°C, de esta manera comparando los resultados obtenidos se optó por trabajar en la planta piloto a una temperatura de 120°C y un tiempo de 4 horas de cocción, ya que a esas condiciones se obtienen muy buenos resultados en cuanto a la concentración de azúcares.



Figura 34: Reactores donde se llevaron a cabo los procesos.

4.2 Inulina

Antes de iniciar con el proceso que se eligió, se hizo una prueba de fermentación con los jugos del proceso 1 y 2, de los cuales se tomó una muestra antes de iniciar la fermentación para ver el comportamiento, lo cual tenía una concentración inicial de azúcares de 108.43 g/L, se le agregó inóculo y se fueron tomando muestras cada 6 horas, cuyos resultados se muestran en la Figura 35:

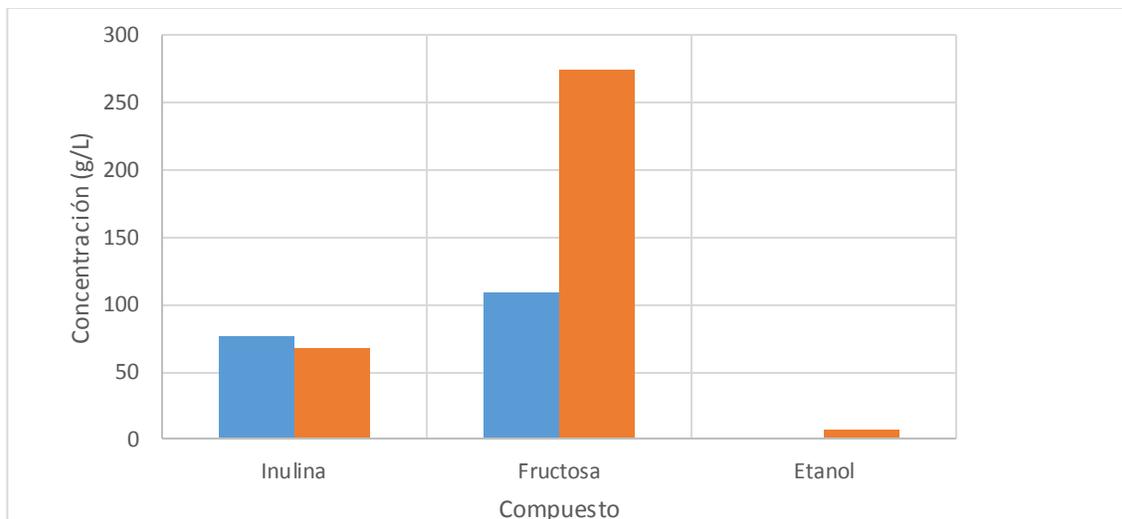


Figura 35: Desdoblamiento de la Inulina a Fructosa.

La inulina presente tiende a disminuir y la concentración de azúcares a aumentar, esto se debe a que las *Saccharomyces* ayudan a desdoblar la inulina presente (ya que es un microorganismo nativo de dicha planta y persevera siempre durante todo el proceso de fermentación). Debido a que a las condiciones que se trabaja (30 °C y a la constante agitación), al medio líquido que agregamos y a los compuestos que contienen los jugos (nitrogenados), la *Saccharomyces* tiende a formar inulinasas que estas ayudan a desdoblar la inulina aun presente en dichos jugos.

4.3 Porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad tanto de las piñas como de las hojas se determinó antes de que se continuara con el proceso así como al salir de la prensa, los datos obtenidos se muestran en la Tabla 14:

Tabla 14: Porcentaje de humedad en la planta de *Agave Tequilana Weber*.

	% Humedad
Piña	86.62
Hojas	80.2
Bagazo de Piña	67.11
Bagazo de Hojas	43.24

4.4 Cuantificación de azúcares reductores totales

Los resultados que se obtuvieron en la cuantificación de azúcares reductores se determinaron empleando una curva de calibración que presento un factor de correlación $R^2 = 0.9949$.

Tabla 15: ART de los extractos.

Muestra	Concentración (g/L)
Extracto Piña Cruda	89.2
Extracto Hojas Cruda	35.5
Extracto Piña Cocida	370.28
Extracto Hojas Cocida	78.2

Con los resultados anteriores se nota claramente que las piñas presentan mayor número de azúcares reductores en comparación con los extractos de las hojas. Sin embargo en varios casos resulta un poco bajo, podemos atribuir dichos resultados a que al ser extractos de la planta cruda, la mayoría de los azúcares se encuentra en forma de polisacáridos especialmente en forma de inulina. Así mismo, se reporta la concentración de azúcares reductores presentes tanto de la piña como de las hojas que fueron sometidas a cocción a una temperatura de 120°C durante 4 horas, el efecto de la temperatura produjo la hidrólisis de la inulina contenida hasta el grado de monosacáridos (principalmente en forma de fructosa), como se muestra en la reacción siguiente.



Se observa claramente en la Tabla 15, que la cocción ayuda a que la piña aumente más del cuádruple el contenido de azúcares que se encuentran en la piña cruda, y la cocción de las hojas la aumenta un poco más del doble.

4.5 Determinación individual de azúcares

Para la determinación de azúcares presentes en las muestras se utilizó el equipo HPLC para obtener los cromatogramas, se obtuvieron dos de cada muestra y se tomó el valor promedio de ambos como criterio para el tiempo de retención. Es por eso que los valores reportados no corresponden a los leídos exactamente por el equipo HPLC si no al promedio de ambos.

Para el extracto de la piña cruda Figura 36 se observaron únicamente dos picos cuyos tiempos de retención promedio son **6.373** y **13.0502** minutos, los cuales se pueden asignar al polisacárido de inulina y a la fructosa respectivamente.

Además de que se sustenta con el resultado que se obtuvo anteriormente Tabla 15, respecto al contenido de azúcares que es muy bajo (89.2 g/L) gracias a la presencia de la inulina en la planta cruda, que se encuentra sin hidrolizar.

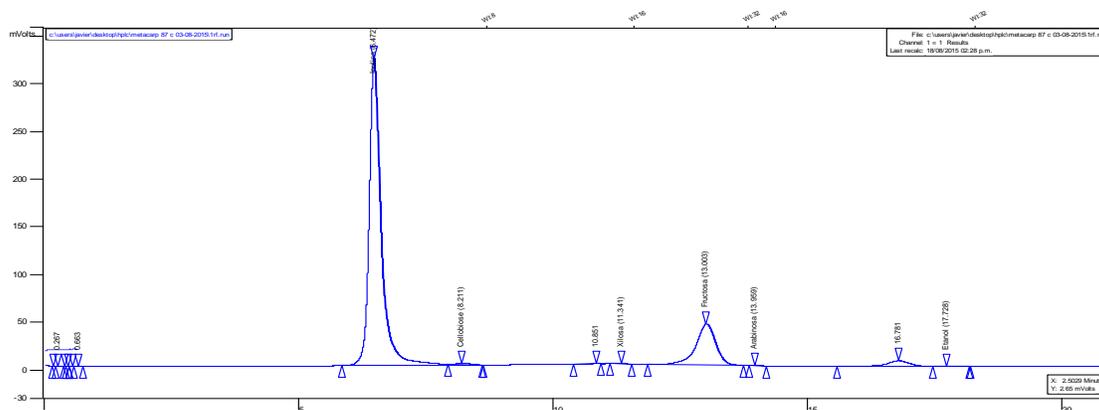


Figura 36: Cromatograma de la piña de *Agave Tequilana* Crudo.

La Tabla 16 muestra las cantidad de azúcares presentes en la piña cruda de *Agave Tequilana*, de acuerdo a los estándares manejados.

Tabla 16: Identificación y cuantificación de azúcares de la piña cruda de *A. Tequilana*.

Piña Cruda	
Azúcar	Cantidad total de azúcar (g/L)
Fructosa	21.13

Respecto a la muestra de jugos de las hojas Figura 37, es posible visualizar más picos cuyos tiempos de retención son los siguientes: **6.423, 8.301, 10.045, 10.886, 11.535, 13.103**, de los cuales algunos no es posible identificarlos de acuerdo a los estándares manejados, sin embargo el tercer pico corresponde a la glucosa, prosiguiendo la manosa, la fructosa y otros azúcares sin identificar. La Tabla 17 muestra los azúcares y la cuantificación de estos.

Tabla 17: Identificación y cuantificación de azúcares de las hojas crudas de *A. Tequilana*.

Extracto de Hojas	
-------------------	--

Azúcar	Cantidad total de azúcar (g/L)
Glucosa	11.2
Manosa	14.02
Fructosa	22.15

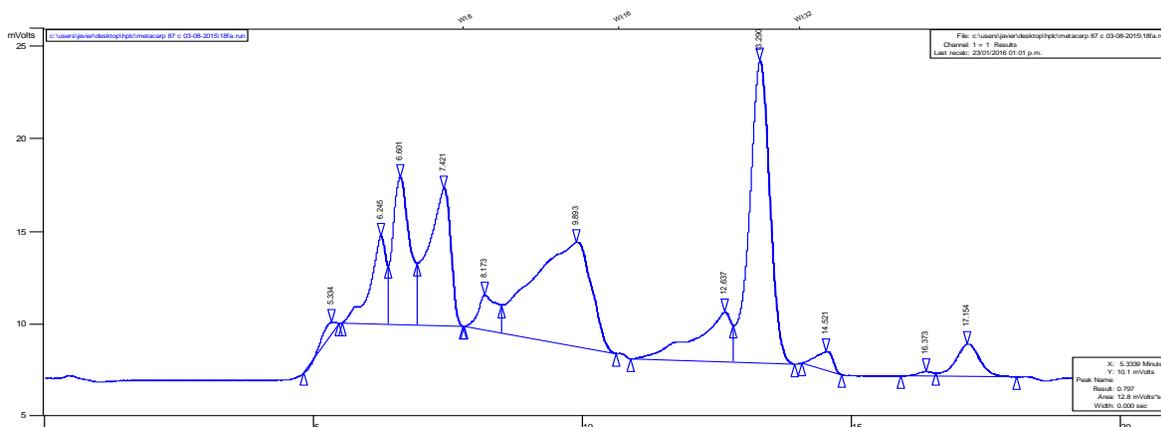


Figura 37: Cromatograma de las hojas de *Agave Tequilana* Crudo.

Finalmente para la piña cocida Figura 38, se puede observar que el pico más grande obtenido en el Cromatograma de la piña cruda disminuyo su área tras la **hidrolisis** a la que fue sometida dando origen a otros azúcares, siendo el de mayor área el correspondiente a la fructosa. La Tabla 18 muestra los azúcares y la cuantificación de estos.

Tabla 18: Identificación y cuantificación de azúcares de la piña cocida de *A. Tequilana*.

Piña Cocida	
Azúcar	Cantidad total de azúcar (g/L)
Xilosa	2.36
Glucosa	14.04
Fructosa	350.23

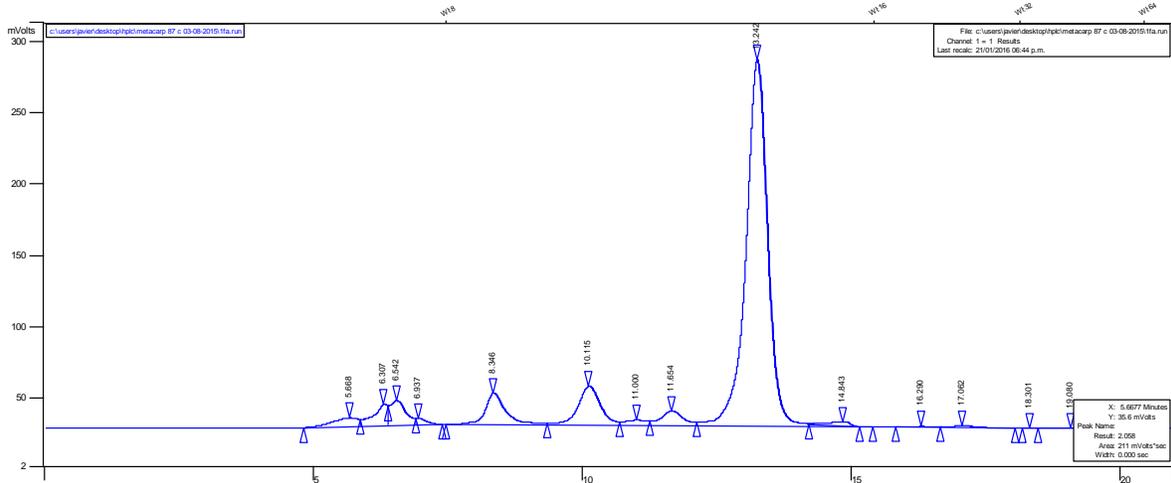


Figura 38: Cromatograma de la piña de *Agave Tequilana Cocido*.

4.6 Resultados obtenidos con la fermentación de los jugos de las piñas de *agave Tequilana Weber*

Pasando el proceso de extracción de los jugos es necesario continuar con el proceso de fermentación, cabe destacar que se obtuvo una elevada concentración de azúcares **360 g/L** aproximadamente, por lo cual se diluyo por mitad, ya que en estudios previos con *Saccharomyces Cerevisiae* se concluye que esta levadura tiene mayores rendimientos a concentraciones menores de azúcares fermentables. Durante la etapa de dicho proceso, se cuantificaron las concentraciones de azúcares y etanol cada 24 horas con el fin de verificar como se está llevando a cabo la fermentación y así continuamos muestreando hasta completar las 72 horas que dura en proceso. Los resultados arrojados fueron obtenidos con el equipo HPLC. En la Figura 39 se puede analizar el crecimiento de la concentración del etanol, así como, las hexosas (preferencia de las *Saccharomyces Cerevisiae*), van disminuyendo su concentración.

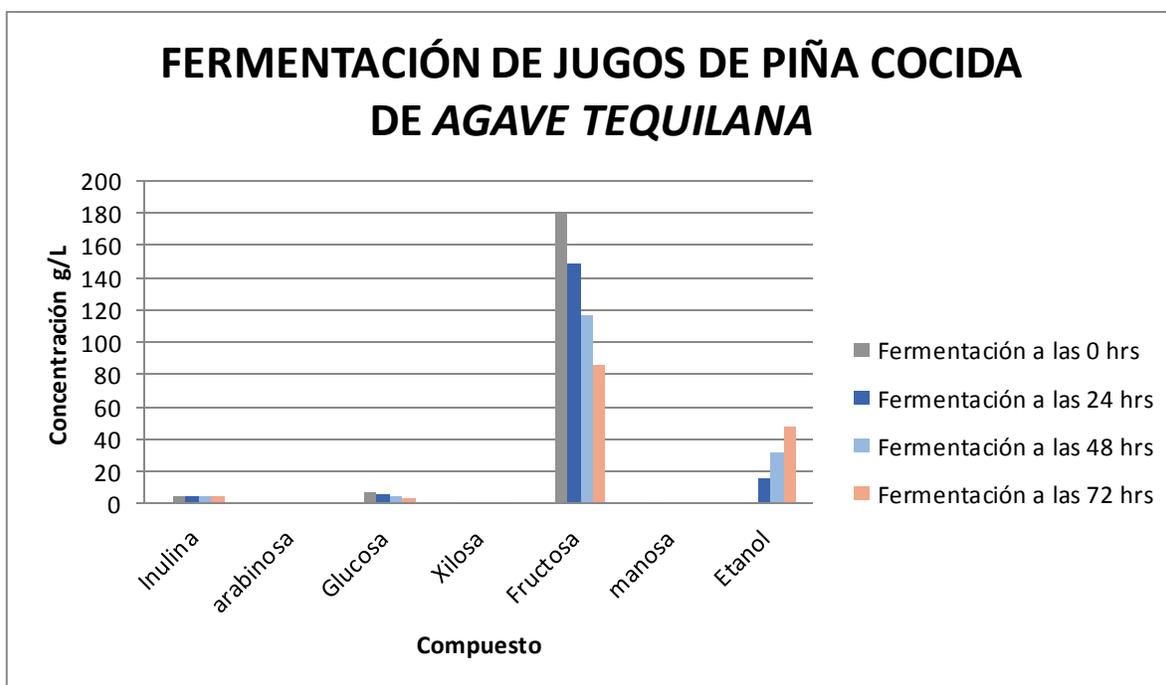


Figura 39: Gráfica que muestra el proceso de fermentación de los jugos de piña.

4.6.1 Rendimiento total de jugos de piñas

El grafico anterior muestra la proporción en la cual se encuentra presente la mayor cantidad de azúcares fermentables y posteriormente la conversión de estos en etanol. Por lo tanto el rendimiento porcentual de la conversión efectuada se realizara mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \left(\frac{A}{B}\right) \times 100 \quad \text{Ec. 4. 1}$$

Donde:

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

Sustituyendo los valores en la ecuación 4.1, se tiene:

$$\%R = \left(\frac{47.20919}{97.5598}\right) \times 100 = 48.39\%$$

$$\%R = 48.39\%$$

4.6.2 Balance de materia de las piñas

El resultado de los balances de masa obtenidos durante la etapa de molienda hasta la extracción de los jugos se muestra en la Tabla 19:

Tabla 19: Balance de materia para las piñas.

ETAPA			
Entrada Molino	1000 Kg		
Salida Molino	1000 Kg		
Entrada Prensa	1000 Kg		
Salida Prensa			
Bagazo	620.7867 Kg		
Jugo	379.21 Kg	Densidad	1.12508 Kg/L
		Brix	34.9

Las pérdidas de materia prima en el molino y del traslado para darles el tratamiento térmico fueron despreciables, por lo que no se consideraron. Ya que al momento de realizar dicho trabajo se tuvo el mayor cuidado de rescatar en su totalidad la materia prima. En tal balance se puede determinar que el **62 %** del peso de las piñas corresponde al bagazo, siendo el **38 %** restante de los jugos que se obtienen, cuya densidad es **1.12508 Kg/L**.

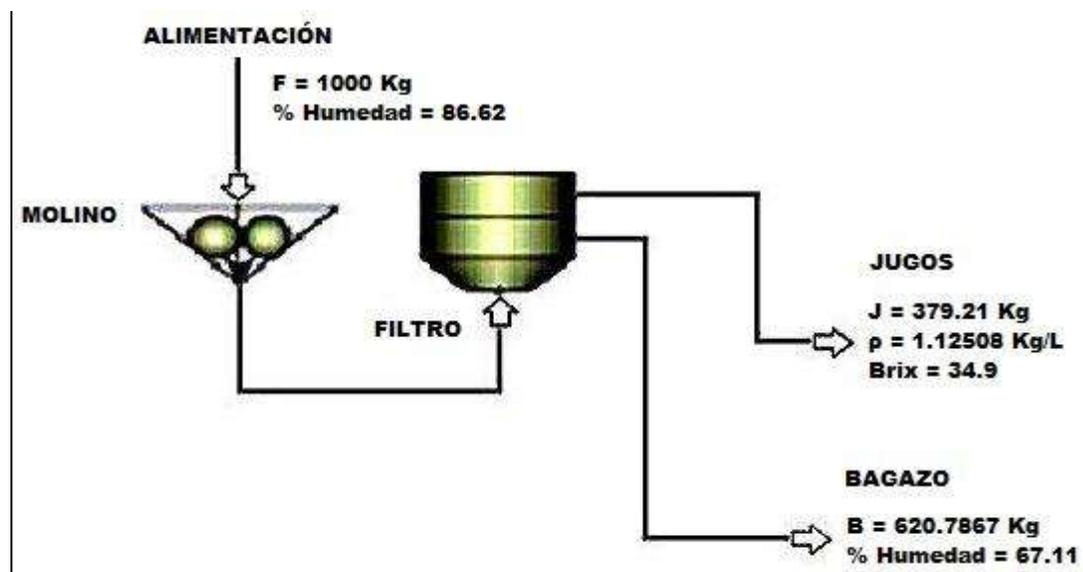


Figura 40: Diagrama con los resultados de extracción de jugos de piñas.

Con forme al estudio realizado se obtiene que para 1 tonelada de piña se pueden obtener 380 kg (338 L) de jugos para fermentar, del cual se podrían obtener un rendimiento muy bueno comparado con el teórico (51 %) y en cuanto al bagazo 620 kg se podría implementar para la obtención de bioetanol de segunda generación.

4.7 Resultados obtenidos con la fermentación de los jugos de las hojas de *agave Tequilana Weber*

De igual manera que en los jugos de las piñas, pasando el proceso de extracción de los jugos es necesario continuar con el proceso de fermentación. Durante la etapa de dicho proceso, se cuantificaron las concentraciones de azúcares y etanol cada 24 horas con el fin de verificar como se está llevando a cabo la fermentación y así continuamos muestreando hasta completar las 72 horas que dura en proceso. Los resultados arrojados fueron obtenidos con el equipo HPLC. En la Figura 41 se puede analizar el crecimiento de la concentración del etanol, así como, las hexosas (preferencia de las *Saccharomyces Cerevisiae*), van disminuyendo su concentración.

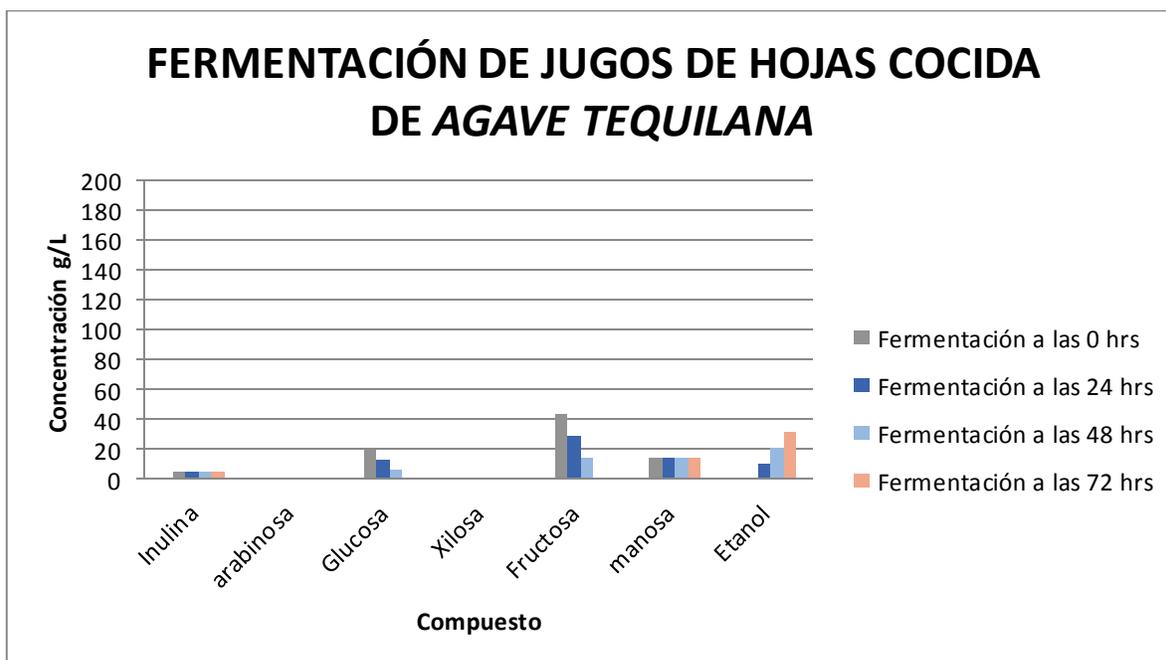


Figura 41: Gráfica que muestra el proceso de fermentación de los jugos de hojas.

4.7.1 Rendimiento total de jugos de las hojas

El grafico anterior muestra la proporción en la cual se encuentra presente la mayor cantidad de azúcares fermentables y posteriormente la conversión de estos en etanol. Por lo tanto el rendimiento porcentual de la conversión efectuada se realizara mediante la siguiente ecuación:

Sustituyendo los valores en la ecuación 4.1, se tiene:

$$\%R = \left(\frac{31.13853}{64.44} \right) \times 100 = 48.32\%$$

$$\%R = 48.32\%$$

4.7.2 Balance de materia de las hojas

El resultado de los balances de masa obtenidos durante la etapa de molienda hasta la extracción de los jugos se muestra en la tabla 20:

Tabla 20: Balance de materia para las hojas.

Etapa			
Entrada Molino	1000 Kg		
Salida Molino	239 Kg		
Entrada Prensa	239 Kg		
Salida Prensa			
Bagazo	303.301 Kg		
Jugo	695.0125 Kg	Densidad	1.253 Kg/L
		Brix	9.6

De igual manera que lo descrito para las piñas, las pérdidas de materia prima en el molino y del traslado para darles el tratamiento térmico fueron despreciables, por lo que no se consideraron. En tal balance se puede determinar

que el **30.5 %** del peso de las piñas corresponde al bagazo, siendo el **69.5 %** restante de los jugos que se obtienen, cuya densidad es **1.253 Kg/L**.

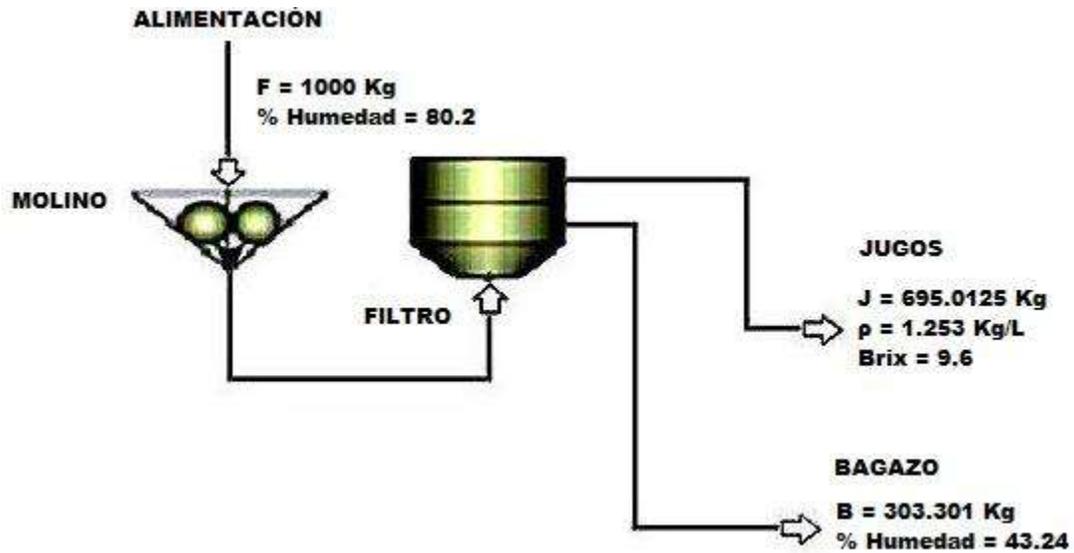


Figura 42: Diagrama con los resultados de extracción de jugos de hojas.

Con forme al estudio realizado se obtiene que para 1 tonelada de hojas se pueden obtener 695 kg (554 L) de jugos para fermentar, del cual se podrían obtener un rendimiento muy bueno comparado con el teórico (51 %) y en cuanto al bagazo 305 kg se podría implementar para la obtención de bioetanol de segunda generación.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El mayor contenido de ART se localiza en la piña en los que predominan los fructanos tipo inulina y fructooligosacaridos, es la razón por la cual esta fracción constituye la parte comercial de esta planta. Lo cual se puede observar con certeza en los resultados obtenidos.

El análisis de ART se observó que de manera natural el Agave tiene azúcares, su contenido en las fracciones de la planta cruda no resultaron del todo lo esperado, resultando 89.2 g/L para la piña y 35.5 g/L para las hojas. Al realizar la cocción de la piña se observó que el contenido de azúcares se cuadruplico, esto como resultado del desdoblamiento de la inulina por el efecto de la temperatura durante la hidrolisis, mientras que para las hojas se duplico.

Del estudio realizado para la identificación de azúcares en la piña únicamente se observó la presencia de fructosa con una concentración de 21.13 g/L, al igual que la presencia de una gran cantidad de inulina (azúcar característico del Agave Tequilana Weber), misma que dio origen a diversos azúcares después de la cocción, siendo los azúcares detectados sacarosa, glucosa y fructosa. Respecto a las hojas en ellas se pudo observar una mayor cantidad de picos en los cromatogramas leídos, que únicamente solo fue posible identificar tres de los azúcares presentes, glucosa, xilosa y fructosa.

La utilización de las hojas o pencas del Agave Tequilana Weber para la producción de bioetanol es una alternativa viable y sustentable que no pone en riesgo la seguridad alimentaria de la población, debido a que éstos residuos agrícolas no ponen en riesgo la seguridad alimentaria de la población, y su utilización en este proceso contribuye al aprovechamiento integral del cultivo.

Es conveniente realizar un estudio específico para las hojas ya que como se muestra en el Cromatograma de estas se aprecian diferentes picos de diferentes oligosacáridos los cuales algunos no fueron identificados con los estándares utilizados, esto con el fin de ver si se pueden obtener más azúcares fermentables que ayuden a obtener un rendimiento muy bueno en cuanto a la

producción de bioetanol y puedan apoyar más la hipótesis planteada en este proyecto.

En cuanto al rendimiento total de conversión de azúcares a etanol comparado con el teórico que presenta la bibliografía (51%), en muy bueno ya que para ambos casos (piñas y hojas) se obtuvo un porcentaje de 48.4 %, sin embargo, como todos sabemos, los rendimientos teóricos comparados con los experimentales tienen una gran dispersión. A pesar de esto, los resultados que se obtuvieron son notablemente satisfactorios.

La justificación al hecho de que no se obtenga una conversión de 51% de azúcares a alcohol como el reportado en la bibliografía, se debe a que la ruta metabólica de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* consume un cierto porcentaje de azúcares del medio, con la finalidad de elevar su cantidad de biomasa y posteriormente, iniciar la etapa de fermentación.

La hipótesis planteada ha sido acertada gracias a los resultados obtenidos que se pueden apreciar en los cromatogramas obtenidos mediante el HPLC, también es conveniente destacar que los azuceres presentes en esta materia prima dependen mucho de la duración de la hidrolisis de este material.

Es importante conocer más acerca de la composición de *Agave Tequilana Weber* variedad azul que puede ser de utilidad para la producción de inulinasas, ya que se sabe que contienen minerales y ceras que favorecen o limitan la producción de la enzima, el conocimiento de su composición permitirá explotar mejor sus propiedades.

6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Dra. C. María Teresa Hernández Nodarse, 2007. **Tendencias actuales en la producción de bioetanol.** Universidad Rafael Landívar, Guatemala.
- [2] Rodrigo Tarkus Patiño Díaz, Antonio Francisco Valdés Delgado, 2011. **La Producción de Biocombustibles y sus Impactos: Estudio de Casos.** Programa CYTED, La Habana.
- [3] Ricardo Javier Abarca Arauz, Verónica Andrea Navarrete Carpio, 2010. **Aislamiento y Caracterización de la Bacteria *Zymomona Mobilis*.** Universidad de Guayaquil, Ecuador.
- [4] Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2007. **Atlas de la Agroenergía y los Biocombustibles en las Américas.** San José, Costa Rica.
- [5] SAGARPA, 2013. **Futuro de la Producción de Biocombustibles en México.**
- [6] Martínez, J.; Barahona, F.; Lappe, P.; Colunga, P.; Magdub, A.; Vergara, S.; Larqué, A. ,2011. **Ethanol Production from two varieties of henequén (Agave fourcroydes Lem) Global Change Biology: Bioenergy.**
- [7] Ramona Ávila Núñez, Bernarda Rivas Pérez, Rómulo Hernández Motzezak y Marluy Chirinos, 2012. **Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave Cocui Trelease.** Universidad del Zulia, Venezuela.
- [8] SAGARPA, 2015. **Datos estadísticos de agave Tequilana a nivel nacional.**
- [9] Bautista-Justo M.; L. García-Oropeza; J. E. Barboza-Corona; L. A. Parra-Negrete. 2001. **EL Agave Tequilana Weber y la Producción de Tequila.** Guanajuato, Gto., México.
- [10] FAO, 2008. **El Estado Mundial De La Agricultura Y La Alimentación.** Roma.
- [11] Patricio Cavieres Korn, 2008. **Biocombustibles de primera generación.** Electro Industria.

- [12] Ing. Francisco Diez Torres, Ing. Norge Garrido Carralero, 2012. **Bagazo de caña de azúcar: ¿energía o etanol carburante?** La Habana, Cuba.
- [13] AGENBUR. **Energía de la Biomasa.** Provincia de Burgos.
- [14] Dr. Carlos Álvarez Maciel, 2009. **Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico.** UNAM.
- [15] NO ET MENGIS EL MÓN, 2008. **Agrocarburos de Primera Y Segunda Generación.** Barcelona.
- [16] Alex Fernández Muerza, 2014. **Biocombustibles de tercera generación.** EROSKI CONSUMER.
- [17] Alex Fernández Muerza, 2006. **Bioetanol, el combustible ecológico de las plantas.** EROSKI CONSUMER.
- [18] José L. Montañez, Juan C. Victoria, Rebeca Flores y María Á. Vivar, 2011. **Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por Zymomonas mobilis y Saccharomyces cerevisiae en la producción de bioetanol.** Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional.
- [19] Mirbella Cáceres-Farfán, Patricia Lappe-Oliveras, Alfonso Larqué-Saavedra, Abdo Magdub-Méndez y Luis Barahona-Pérez. **Producción de etanol a partir de jugo de henequén (Agave fourcroydes Lem) y melaza utilizando una mezcla de levaduras.** Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- [20] SENER. **Prospectiva de Energías Renovables.**
- [21] Molina Korn, Javier Alejandro, 2013. **Producción de bioetanol a partir de algas utilizando la levadura Scheffersomyces stipitis.**
- [22] SUCROMER, 2009. **Estudio de Factibilidad para la Instalación de una Destilería de Etanol en Atencingo.** Municipio Chietla, Estado Puebla, México.
- [23] Sánchez O., Cardona C., 2005. **Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas.** Las Mercedes, Caracas, Venezuela.

- [24] Jaime O. Díaz Ch., Francisco Herrera. **Producción de etanol combustible a partir de lignocelulosas.**
- [25] H.J. Vázquez y O. Dacosta, 2007. **Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícola.** México, Distrito Federal.
- [26] INEGI, 2007. **Censo Agropecuario: El cultivo del agave tequilero en Jalisco.**
- [27] María del Carmen Martínez; M. Elia Leticia Pérez A., 2008. **Análisis del Mercado Potencial del Tequila 100% Agave.** Tesis: Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.
- [28] José L. Montañez, Juan C. Victoria, Rebeca Flores y María Á. Vivar, 2011. **Fermentation of Agave tequilana Weber Azul fructans by *Zymomonas mobilis* and *Sacchamomyces cerevisiae* in the production of bioetanol.** Información Tecnológica Vol. 22 N° 6 – 2011.
- [29] Jesús García Gallego, 2008. **Maridaje, enología y cata de vinos. Antequera: Innovación y Cualificación SL.** Antequera (Málaga).
- [30] Ángel Eduardo Santos Gallego, 2011. **Fermentación Alcohólica.** Xalapa, México.
- [31] ArgenBio, 2007. **Las levaduras y el etanol: bebidas, combustibles y un poco de historia.**
- [32] Ignacio García-Martínez, Nancy Graciela Miranda González, Leandro Rodrigo González González y Federico Nieto Pineda, 2006. **Estudios preliminares de la fermentación de chile jalapeño.** Universidad Simón Bolívar (México).
- [33] Kushi, R.; Monti, R.; Contiero, J. 2000. **Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.
- [34] R J Rouwenhorst, M Hensing, J Verbakel, W A Scheffers, and J P van Duken, 1990. **Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556.** Appl Environ Microbiol.

- [35] Dirk G. Derycke and Erick J. Vandamme, 2008. **Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase.** Journal of Industrial Technology and Biotechnology.
- [36] Lorenzo Agudo García, 2014. **Fundamento de la Fermentación Alcohólica.** IES CENCIBEL Villarobledo.
- [37] Quique Collado, 2001. **Levaduras y la fermentación alcohólica (II).** Valencia (España).
- [38] Bach Sandro Marvin Arimuya Manamu, Bach Edwin Roberto Tecco Pisco, 2014. **Obtención de Etanol a Partir del Residuo Lignocelulósico Cervecerero de la Cervecería Amazónica – Iquitos.** Tesis, Universidad Nacional De La Amazonía Peruana, Iquitos – Perú.
- [39] Jesús E. Larrahondo A., 2013. **Definición y alcances de la alcoquímica: la calidad de las materias primas y su impacto en el proceso alcoquímico.** Corporación Biotec.
- [40] Rosa Isela Viramontes Álvarez y Ramona Pérez Leal, 2014. **Levaduras vínicas.**
- [41] Cipriano Mendoza Rojas, Bernardo Enciso López, 2007. **Estandarización De Parámetros De Operación Para Obtener Bioetanol Anhidro Por Destilación Extractiva.** Ayacucho Perú.
- [42] Vásquez César; Ruiz Cristóbal; Arango Diego; Caicedo Rosario; Sánchez Mauricio; Ríos Luis; Restrepo Gloria, 2007. **Production of Anhydrous Ethanol by Extractive Distillation with Salt Effect.** Medellín, Colombia.