



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

---



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

**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS  
DE AGUACATE**

**TESIS presentada por:**

**LUIS CABALLERO SANCHEZ**

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de  
Ingeniería Química como requisito parcial**

**para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN**

**INGENIERÍA QUÍMICA**

**Director: Dr. AGUSTÍN JAIME CASTRO MONTOYA**

**Co-Directora: Dra. ANA ALEJANDRA VARGAS TAH**

**Morelia, Mich., Agosto 2021**

## RESUMEN

### PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE AGUACATE.

Por

Luis Caballero Sanchez

Agosto del 2021

Maestría en Ciencias en Ingeniería Química

Dirigida por: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya y Dra. Ana Alejandra Vargas Tah

El desecho principal de la industria de procesamiento de aguacate es su semilla, la cual constituye el 15% del peso total del fruto, es una fuente rica en almidón, por lo cual, la semilla se podría emplear en la producción de bioetanol carburante de 1<sup>a</sup> generación. En este trabajo se propuso una metodología para extraer el almidón, hidrolizarlo a glucosa mediante un tratamiento termoquímico y transformarla en etanol a través de un proceso fermentativo, de esta forma se les dará valor agregado a estos desechos industriales. Los resultados obtenidos mostraron que el porcentaje de extracción de almidón de semillas frescas fue de  $29.79 \pm 3.18\%$ . Por otro lado, la hidrólisis química del almidón extraído, que se transformó en azúcares reductores, permitió obtener un rendimiento de 86.38%, se identificaron los azúcares presentes al final de la reacción donde se obtuvieron  $109.79 \pm 1.14$  g/L de glucosa,  $0.99 \pm 0.06$  g/L de xilosa y  $0.38 \pm 0.01$  g/L de arabinosa a nivel matraz y  $109.86$  g/L de glucosa,  $1.87$  g/L de xilosa y  $0.30$  g/L de arabinosa a nivel planta piloto. En la fermentación se obtuvo un rendimiento de la fermentación de glucosa a etanol a nivel matraz de  $0.41 \pm 0.02$ g de etanol/g de glucosa y una productividad volumétrica de etanol de  $1.89 \pm 0.06$  g/Lh, valores similares a los obtenidos a nivel planta piloto con un rendimiento de  $0.45$ g de etanol/g de glucosa y una productividad de etanol de  $2.09$  g/Lh, utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. La caracterización de la semilla de aguacate demostró tener el potencial para la producción de bioetanol; además el método propuesto de hidrólisis química del almidón logró obtener glucosa sin la presencia de furfural y HMF, compuestos inhibidores en la fermentación de azúcares.

Palabras clave: semilla de aguacate, almidón, hidrólisis ácida, *Saccharomyces cerevisiae*, bioetanol.

## ABSTRACT

The main waste of the avocado processing industry is its seed, which constitutes 15% of the total weight of the fruit, it is a rich source of starch, therefore, the seed could be used in the production of fuel bioethanol of 1st generation. In this work, a methodology was proposed to extract starch, hydrolyze it to glucose through a thermochemical treatment and transform it into ethanol through a fermentation process, in this way added value will be given to this industrial waste. The results obtained showed that the percentage of starch extraction from fresh seeds was  $29.79 \pm 3.18\%$ . On the other hand, the chemical hydrolysis of the extracted starch that was transformed into reducing sugars, allowed to obtain a yield of 86.38%, the sugars present at the end of the reaction were:  $109.79 \pm 1.14$  g/L of glucose,  $0.99 \pm 0.06$  g/L of xylose and  $0.38 \pm 0.01$  g/L of arabinose at the flask level and 109.86 g/L of glucose, 1.87 g/L of xylose and 0.30 g/L of arabinose at the pilot plant level. In the fermentation, a yield of the fermentation of glucose to ethanol was obtained at a flask level of  $0.41 \pm 0.02$  g of ethanol/g of glucose and a volumetric productivity of ethanol of  $1.89 \pm 0.06$  g/Lh, values similar to those obtained at the pilot plant level with a yield of 0.45 g of ethanol/g of glucose and an ethanol productivity of 2.09 g/Lh, using *Saccharomyces cerevisiae*. The characterization of the avocado seed proved to have the potential to produce bioethanol; furthermore, the proposed method of chemical hydrolysis of starch managed to obtain glucose without the presence of furfural and HMF, inhibitory compounds in the fermentation of sugars.

Keywords: avocado seed, starch, acid hydrolysis, *Saccharomyces cerevisiae*, bioethanol.

# CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	viii
GLOSARIO.....	ix
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes .....	2
1.2. Planteamiento del Problema.....	3
1.3. Objetivos .....	3
1.4. Justificación.....	3
1.5. Hipótesis.....	4
Capítulo 2. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1. Biocombustibles.....	5
2.2. Materias primas para la obtención de bioetanol.....	8
2.3. Clasificación de biocombustibles.....	12
2.4. Aguacate.....	17
2.5. Proceso de producción de bioetanol.....	21
2.6. Metodologías para la producción de bioetanol.....	29
2.7. Factores que afectan la conversión de biomasa en etanol .....	30
Capítulo 3. METODOLOGÍA.....	34
3.1. Caracterización química de la semilla de aguacate .....	34
3.2. Producción de bioetanol .....	35
3.3. Diagrama de Flujo Lógico de la Investigación .....	40
Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
4.1. Caracterización.....	42
4.2. Extracción de almidón.....	43
4.3. Hidrólisis .....	43
4.5. Fermentación.....	46
4.6. Evaluación de costos en la producción de bioetanol .....	51
CONCLUSIONES .....	53
REFERENCIAS .....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Especificaciones de gasolina y etanol .....	5
Tabla 2.2. Producción mundial anual de etanol combustible (millones de galones) .....	6
Tabla 2.3. Caracterización química para la cáscara y semilla de aguacate .....	21
Tabla 3.1. Procedimientos empleados en la caracterización de la semilla de aguacate .....	34
Tabla 4.1. Caracterización química de la semilla de aguacate (%masa) .....	42
Tabla 4.2. Caracterización química de los residuos de la extracción de almidón (%masa)..	43
Tabla 4.3. Identificación de azúcares reductores obtenidos por HPLC .....	44
Tabla 4.4. Comparación de las condiciones en la hidrólisis de almidón .....	46
Tabla 4.5. Cuantificación de los componentes en la etapa de fermentación por HPLC .....	48
Tabla 4.6. Comparación de los parámetros cinéticos entre las dos cepas .....	48
Tabla 4.7. Cuantificación de los componentes por HPLC de la fermentación en planta piloto.....	50
Tabla 4.8. Costo de producción por litro de etanol a partir de la semilla de aguacate .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Configuración de la molécula de glucosa (conformación en silla) .....	9
Figura 2.2. Estructura de la amilosa (tres subunidades) .....	9
Figura 2.3. Conformación de la amilopectina (cinco subunidades) .....	10
Figura 2.4. Estructura de tres subunidades de celulosa .....	10
Figura 2.5. Representación de la estructura molecular del xilano, una hemicelulosa .....	11
Figura 2.6. Estructura de la lignina .....	12
Figura 2.7. Unidades de glucosa en laminarina de algas pardas (A) y unidades de ulvanobiosa en ulvanos de algas verdes (B) .....	16
Figura 2.8. Producción nacional anual de aguacate en miles de toneladas .....	19
Figura 2.9. Porcentaje de producción de aguacate por estado en México hasta septiembre 2019 .....	20
Figura 2.10. Proceso de obtención del bioetanol .....	22
Figura 2.11. Pretratamiento del material lignocelulósico .....	22
Figura 3.1. Pretratamiento realizado a la semilla de aguacate .....	35
Figura 3.2. Proceso de extracción de almidón de semilla fresca de aguacate .....	36
Figura 3.3. Hidrólisis ácida: a) semilla molida, b) almidón extraído y c) almidón comercial.....	37
Figura 3.4. Aplicación del método DNS para la identificación de azúcares reductores .....	38
Figura 3.5. Ilustración de la etapa de fermentación: a) condición inicial y b) condición final.....	39
Figura 3.6. Diagrama de flujo de la metodología de esta investigación .....	41
Figura 4.1. Concentración de azúcares reductores en función del tiempo de reacción .....	44
Figura 4.2. Concentración de glucosa en función del tiempo de reacción en planta piloto ..	45
Figura 4.3. Perfil de consumo de glucosa y producción de etanol utilizando la cepa Fermentum-Vocatus .....	47
Figura 4.4. Perfil de consumo de glucosa y de producción de etanol utilizando la cepa DistilaMax® DS .....	47

Figura 4.5. Curvas de consumo de glucosa y producción de etanol utilizando la cepa DistilaMax® DS en planta piloto ..... 50

Figura 4.6. Diagrama de bloques del proceso de producción de bioetanol a las condiciones de operación propuestas ..... 51

## AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Agustín Jaime Castro Montoya por haberme guiado en el transcurso de este proyecto, a la Dra. Ana Alejandra Vargas Tah por el apoyo y acompañamiento en el trabajo de laboratorio y a mis sinodales, Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga, Dr. José Ma. Ponce Ortega y Dr. Miguel Ángel Zamudio Jaramillo, por sus aportaciones durante los avances y revisiones del proyecto de Tesis.

A mis papás, Rodolfo y Juana, y a mis hermanos, Mónica y Eduardo, por el apoyo y motivación en la continuación de mis estudios de posgrado.

A mis compañeros de maestría: Rosalía, Alma, Francisco, Lourdes, Martín y Alexis por haber hecho ameno el trayecto de la maestría.



## GLOSARIO

**CONADESUCA:** Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar.

**Conformación en silla:** la conformación del ciclohexano que se asemeja a una silla.

**DOF:** Diario Oficial de la Federación

**Energías no renovables:** son aquellas cuya velocidad de consumo suele ser mayor que la de su regeneración y como consecuencia de ello e irremediablemente conducirá a su eventual agotamiento.

**Energías renovables:** aquellas que se siguen produciendo indefinidamente, aquellas que luego de su utilización, pueden regenerarse, considerándose las virtualmente inagotables, ya sea por la inmensa cantidad de energía que contienen o porque al ser recursos que al estar involucrados en ciclos naturales, suelen mantenerse más o menos constantes en la naturaleza.

**Índice de octano:** indica el comportamiento que tiene una nafta en comparación con la mezcla de heptano e isooctano que se comporta de forma idéntica en un motor.

**Inóculo:** introducción de células en un recipiente de medio de cultivo estéril.

**Medio de cultivo:** es un sustrato o solución de nutrientes en los que crece y se multiplican los microorganismos en el laboratorio.

**SAGARPA:** Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

**SENER:** Secretaría de Energía.

**SFA:** Subsecretaría de Fomentos a los Agronegocios.

**SIAP:** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.

**Pared celular:** es una cubierta rígida que recubre la membrana plasmática de algunas células separándola del exterior.

**RFA:** *Renewable Fuels Association* (Asociación de Combustibles Renovables).

**Zafra:** periodo en el que se cosechan los campos de caña de azúcar para que pueda ser procesada en los ingenios.

## Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

La principal fuente de energía utilizada a nivel mundial está representada por los combustibles fósiles que conllevan a varios problemas, entre ellos el cambio climático, la disminución de la capa de ozono y el aumento de gases de efecto invernadero, además este tipo de combustibles no son renovables. Es por ello que los avances en energía deberán estar orientados al uso de energías alternas, entre las cuales encontramos a los biocombustibles que se pueden obtener a partir de la biomasa.

El uso de biomasa para producir biocombustibles tiene el potencial de reducir la dependencia del petróleo y las emisiones de gases de efecto invernadero, además de valorizar los residuos de la materia orgánica al dar un valor agregado al producto final.

Uno de los biocombustibles que se puede obtener de la biomasa es el bioetanol mediante la transformación de los polisacáridos que constituyen la materia vegetal a través de un proceso de fermentación. Como función principal, el bioetanol se puede usar en mezclas con gasolina para aumentar el índice de octano y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero.

Una de las principales desventajas de producir bioetanol de primera generación, donde la materia prima contiene azúcares o almidón, es el desvío de recursos alimenticios hacia la producción de energéticos. Es por esta razón que se deben buscar fuentes renovables que no compitan con la alimentación, ejemplo de esto son los residuos del aguacate que pueden ser aprovechados una vez que el fruto ha sido utilizado con fines alimenticios. Con esta propuesta se dará valor a la biomasa que es desechada, al producir un compuesto de valor agregado y que podrá utilizarse como biocombustible, en este caso, bioetanol.

Por otra parte, aún existen importantes limitaciones en lo que respecta al uso de la biomasa:

- Solo es posible la utilización de residuos orgánicos.
- Para conseguir un aporte energético importante, es necesario una gran cantidad de biomasa que requeriría de grandes extensiones.
- El costo de producción de energía por vía petroquímica es aún mucho menos costoso.
- El rendimiento de los combustibles fósiles es aún mayor que los derivados de la biomasa (Romanelli y Pasquale, 2017).

Por estas razones, la producción de biocombustibles deberá estar orientada a la búsqueda de fuentes potenciales de biomasa con alto contenido de carbohidratos, al aprovechamiento de los residuos orgánicos generados y a la optimización de rutas de separación que permitan obtener biocombustibles económicamente viables.

### 1.1. Antecedentes

A continuación, se muestran los antecedentes directos de la semilla de aguacate que estarán dirigidos hacia la producción de bioetanol.

Se ha utilizado la semilla de aguacate como materia prima para la obtención de dextrina, dando un rendimiento de extracción de almidón de 23.15% (Maryam *et al.*, 2016). Por otro lado, diversos autores han tomado la siguiente composición de la semilla de aguacate en base húmeda: humedad alrededor del 50%; cenizas 1.24 - 1.34 %, proteínas 2.38 - 2.45 %, azúcares totales 2.21 - 3.50 %, almidón 27.54 - 29.80 %, fibra cruda 3.65 - 4.14 % y 7.76 - 9.25 % de materiales indeterminados (Lacerda *et al.*, 2013; Chel *et al.*, 2016).

Dávila *et al.*, (2017) evaluaron un modelo de biorrefinería para procesar aguacate Hass: compuestos fenólicos microencapsulados, etanol, aceite y xilitol fueron los productos considerados en la biorrefinería. Se desarrollaron los aspectos tecnoeconómicos y ambientales de la biorrefinería y finalmente se investigaron los costos totales de producción.

Pratywi *et al.*, (2018) reportaron la degradación del almidón durante el calentamiento simple para la producción de bioetanol a partir de la semilla de aguacate; variaron la cantidad de semilla de aguacate en un intervalo de 20 a 100 g con un volumen de agua de 200 ml durante 1 hora a 60 °C con agitación, encontrando que para 80 g de semilla molida de aguacate se tiene la mayor concentración de glucosa.

La extracción de almidón de la semilla de aguacate tiene un rendimiento de alrededor del 27.28 %, (Rivera-González *et al.*, 2019) suspendieron 100 g de harina de semilla de aguacate en 500 ml de solución de bisulfito de sodio al 1% p/v en un recipiente hermético con agitación constante durante 12 h a 25 °C. Después del tiempo, la suspensión pasó a través de una malla US100. La fracción retenida se lavó dos veces con agua destilada, el filtrado se centrifugó para facilitar la precipitación del almidón; ambas fracciones se secaron en un horno de convección ajustado a 40 °C durante 24 h.

## 1.2. Planteamiento del Problema

En México se estima que, por cada millón de toneladas cosechadas de aguacate, al menos 45% de cáscaras y semillas se van a la basura. Una de las principales fuentes generadoras de estos desechos proviene de la industria de procesamiento de aguacate cuyos residuos (cáscara y semilla) no son aprovechados en algún fin específico. La propuesta de esta investigación es desarrollar una metodología para producir bioetanol a partir de la semilla de aguacate, lo cual permitirá la generación de un producto con valor agregado a partir de estos desechos industriales.

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo General

Producir bioetanol a partir de la semilla de aguacate mediante la metodología de hidrólisis y fermentación secuencial.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Llevar a cabo la caracterización química de la semilla de aguacate.
- Evaluar la hidrólisis química de almidón hacia glucosa comparando el rendimiento partiendo de semilla y almidón extraído.
- Determinar las condiciones de operación para la fermentación de glucosa hacia etanol determinando los parámetros cinéticos.
- Reproducir las condiciones del proceso a nivel planta piloto.

## 1.4. Justificación

El uso de combustibles fósiles representa la principal fuente de energía utilizada a nivel mundial con 81.1% de consumo; sin embargo, producen gran cantidad de emisiones que perjudican al medio ambiente, no son renovables y, por lo tanto, agotables. Debido a esto surge la necesidad de otro tipo de energías alternativas, entre ellas los biocombustibles, que se obtienen mediante un tratamiento físico o químico a partir de materia vegetal o restos orgánicos no fosilizados. El uso del bioetanol produce menor cantidad de emisiones al ambiente en comparación con combustibles fósiles, es un recurso renovable y se puede producir a partir de residuos de biomasa. La tendencia de producción de etanol como

combustible a nivel mundial describe un comportamiento ascendente, pasó de 25,700 millones de galones en el año 2015 a 29,000 millones de galones en el 2019, siendo el crecimiento en el uso del etanol como combustible más que para bebidas o usos industriales.

La investigación acerca de la producción de bioetanol a partir de residuos de aguacate permitirá la generación de un compuesto con valor agregado, a partir de materia que se desecha después del procesamiento de la parte de interés del aguacate, que podrá ser utilizado como combustible.

### 1.5. Hipótesis

El almidón contenido en la semilla de aguacate será hidrolizado por un proceso termoquímico con un rendimiento superior al 80% y fermentado a etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

## Capítulo 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Biocombustibles

Los biocombustibles son recursos energéticos procesados por el ser humano a partir de materias producidas recientemente por seres vivos, a las cuales se les denomina biomasa. Pueden ser líquidos, sólidos o gaseosos, y su finalidad última es liberar la energía contenida en sus componentes químicos mediante una reacción de combustión (Álvarez, 2009).

#### 2.1.1. Bioetanol

El bioetanol, etanol o alcohol etílico está compuesto químicamente por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, con un grupo hidroxilo unido a un radical alquilo como su principal característica química ( $C_2H_5OH$ ). Es un líquido incoloro, claro, con aroma característico y agradable, fuertemente penetrante con sabor cáustico y ardiente. Este compuesto es altamente inflamable y un combustible viable con una presión de vapor más baja que la gasolina, lo que resulta en una reducción de las emisiones por evaporación. La clasificación de alto octanaje de etanol sirve como un importante regulador del potencial de detonación cuando se usa como aditivo de gasolina, reemplazando así los aditivos tóxicos como el tetraetilo y tetrametilo de plomo (Peres *et al.*, 2017).

Como alternativa a los combustibles fósiles, el bioetanol, se produce principalmente por fermentación a partir de diferentes materias primas. Es un combustible de alto octanaje y sus características fisicoquímicas son considerablemente diferentes en comparación con la gasolina; en la Tabla 2.1 se muestran las principales características de estos combustibles.

**Tabla 2.1. Especificaciones de gasolina y etanol.**

<b>Especificación</b>	<b>Gasolina</b>	<b>Etanol</b>
Peso molecular (g/mol)	100-105	46.07
Índice de octano	88-100	108
Densidad (kg/dm <sup>3</sup> )	0.69-0.79	0.79
Punto de ebullición (° C)	27-225	78
Punto de congelación (° C)	-22.2	-96.1
Punto de inflamación (° C)	-43	13
Temperatura de autoignición (° C)	275	440
Solubilidad en agua	Insoluble	Soluble

El bioetanol sirve principalmente en el sector del transporte como componente de la mezcla con gasolina o como materia prima para la obtención de etil-terbutil éter (ETBE) y utilizarlo como aumentador de octano. El bioetanol se mezcla con gasolina en las fracciones de volumen de 5, 10 y 85% (nombres de combustible E5, E10 y E85). Un total de 85% de bioetanol en volumen solo puede usarse en vehículos de combustible flexible, mientras que las mezclas de 5 y 10% en volumen pueden usarse sin ninguna modificación del motor. Sin embargo, los problemas relacionados con el uso de bioetanol son: efectos corrosivos en el inyector de combustible y en la bomba de combustible eléctrica (el bioetanol es de naturaleza higroscópica), así como problemas de arranque del motor en condiciones de clima frío (es más difícil de vaporizar que la gasolina) (Bušić *et al.*, 2018).

#### 2.1.1.1. Producción mundial de bioetanol

En 2019 la producción mundial de etanol combustible fue de 29,000 millones de galones. Los dos principales productores a nivel mundial son Estados Unidos con 54.41% y Brasil con 29.62% del total de etanol, seguidos por la Unión Europea, China y Canadá. En la Tabla 2.2 se muestran los principales países productores de etanol para el periodo 2015 al 2019 (RFA, 2021).

**Tabla 2.2. Producción mundial anual de etanol combustible (millones de galones).**

<b>Región</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>
Estados Unidos	14807	15413	15936	16091	15778
Brasil	7200	6750	6650	7990	8590
Unión Europea	1360	1360	1420	1450	1370
China	770	670	800	770	1000
Canadá	450	460	460	460	520
India	190	280	200	430	510
Tailandia	310	340	390	390	430
Argentina	220	240	290	290	280
Resto del mundo	393	487	454	529	522
<b>Total</b>	<b>25700</b>	<b>26000</b>	<b>26600</b>	<b>28400</b>	<b>29000</b>

En Brasil, la mayor demanda de bioetanol se debe principalmente al aumento constante en el número de vehículos de combustible flexible vendidos. Por lo tanto, es probable que Estados Unidos y Brasil sigan siendo los dos principales productores de bioetanol, seguidos de la Unión Europea y China. Alrededor del 40% de la producción mundial de bioetanol proviene de la caña de azúcar y la remolacha azucarera, y casi el 60% proviene de materias primas que contienen almidón. En Europa, las materias primas renovables más convenientes para la producción de bioetanol son los granos (principalmente trigo) y la remolacha azucarera. En Francia también fabrican bioetanol a partir del excedente de vino. Los precios de las materias primas tienen un impacto considerable en los costos de producción de bioetanol y pueden representar 40-75% de los costos totales dependiendo del tipo de materia prima. Los costos de producción de bioetanol a partir de la caña de azúcar en Brasil están en el intervalo de 0.20-0.30 USD/L. En los Estados Unidos y la Unión Europea, el bioetanol producido a partir de la remolacha azucarera y el maíz alcanzó los costos de producción más bajos de 0.30 y 0.53 USD/L, respectivamente. Los costos en China (trigo, sorgo dulce o yuca) son de 0.28-0.46 USD/L dependiendo de los costos de la materia prima. Sin embargo, los costos de producción (refinación) de gasolina (0.10-0.18 USD/L dependiendo del tipo de proceso de refinación) son aún más bajos y los costos de producción de bioetanol son competitivos sólo en Brasil (Bušić *et al.*, 2018).

El costo de producción de bioetanol puede compensarse parcialmente mediante la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, la seguridad del suministro de energía y la estimulación de las actividades agrícolas en las regiones rurales (Bušić *et al.*, 2018).

#### 2.1.1.2 Producción de bioetanol en México

En México la producción de bioetanol va en aumento, 3.18 millones de galones fueron producidos en la zafra 2015/2016 mientras que en el periodo 2018/2019 se alcanzaron 3.64 millones de galones, utilizando como materia prima la caña de azúcar (CONADESUCA, 2019). 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. El potencial productivo es estimado por el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) incluye las tierras agrícolas de temporal en la que es susceptible la siembra de insumos para bioenergéticos; sin embargo, este potencial no significa que estén disponibles para bioenergéticos (DOF, 2016). La caña de azúcar actualmente se cosecha en aproximadamente 700 mil hectáreas, mientras que su potencial productivo es de más de 4 millones de hectáreas. De sorgo grano existen 4.83



millones de hectáreas con alto potencial productivo con un rendimiento de hasta 2,800 L de etanol por hectárea. La remolacha azucarera es un cultivo cuya superficie registrada en México es muy incipiente; sin embargo, su potencial productivo es de más de 2 millones de hectáreas de temporal, mientras que el sorgo dulce existe con un potencial de 2 millones de hectáreas.

Dentro del marco regulatorio, en el 2016 la Norma Oficial Mexicana, NOM-016-CRE-2016, Especificaciones de calidad de los petrolíferos, permite un contenido máximo de 5.8% en volumen de etanol anhidro como oxigenante en gasolinas y se prohíbe su uso en zonas metropolitanas del Valle de México, Guadalajara y Monterrey (DOF, 2016). En 2017 se hicieron modificaciones a esta norma donde ahora las especificaciones de calidad son de 10% en volumen máximo de etanol anhidro en mezcla con gasolinas, manteniendo prohibido su uso en las ciudades mencionadas (DOF, 2017).

Debido a ello surge la necesidad de buscar fuentes potenciales de materiales lignocelulósicos o almidonados para la producción de bioetanol y que éstas no compitan con las fuentes de alimento para satisfacer las necesidades energéticas, entre ellas se estudiará el uso de los residuos del aguacate debido a que se ha reportado un importante contenido de almidón principalmente en la semilla de este fruto.

## 2.2. Materias primas para la obtención de bioetanol

La premisa principal para la obtención de alcoholes como el etanol a partir de materia prima vegetal es la transformación de los polisacáridos que la constituyen mediante un proceso de fermentación que dará lugar a la obtención del alcohol. Todos los vegetales poseen una elevada proporción de celulosa, el polisacárido responsable de aportar la estructura rígida a la planta, gracias a sus largas cadenas lineales formadas por unidades de glucosa (Figura 2.1); sin embargo, algunos de ellos también tienen una importante cantidad de otro polisacárido dentro de sus semillas, el almidón, un compuesto conformado por unidades de glucosa de manera ramificada y que sirve como reserva de energía para sustento del vegetal (Romanelli y Pasquale, 2017).

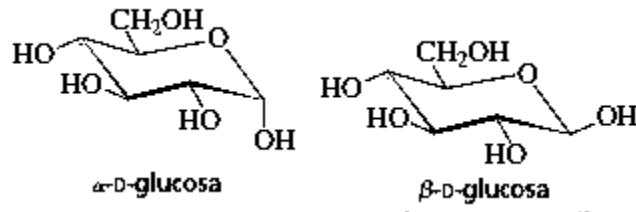


Figura 2.1. Configuración de la molécula de glucosa (conformación en silla).

### 2.2.1. Almidón

El almidón es una mezcla de dos diferentes polisacáridos: amilosa (aproximadamente 20%) y amilopectina (aproximadamente 80%). La amilosa (Figura 2.2) está compuesta de cadenas no ramificadas de unidades D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4' (Yurkanis, 2007).

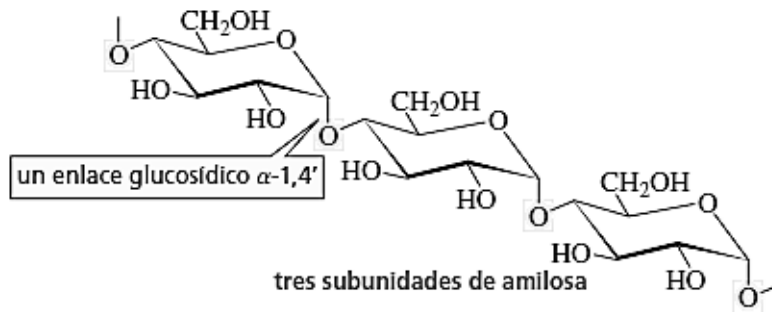


Figura 2.2. Estructura de la amilosa (tres subunidades).

La amilopectina es un polisacárido ramificado (Figura 2.3). Como la amilosa, está compuesta de cadenas de unidades D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4'. Sin embargo, a diferencia de la amilosa, la amilopectina también contiene enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6'. Dichos enlaces crean las ramas en el polisacárido (Yurkanis, 2007).

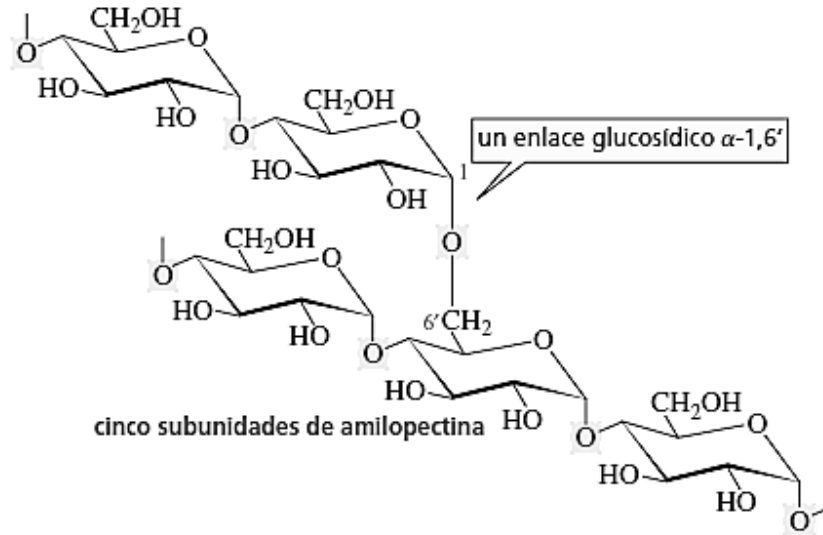


Figura 2.3. Conformación de la amilopectina (cinco subunidades).

### 2.2.2. Celulosa

La celulosa es el material estructural de las plantas superiores. Como la amilosa, la celulosa se compone de cadenas no ramificadas de unidades D-glucosa. Sin embargo, a diferencia de la amilosa, las unidades glucosa en la celulosa se unen mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4' en lugar de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4' (Figura 2.4) (Yurkanis, 2007).

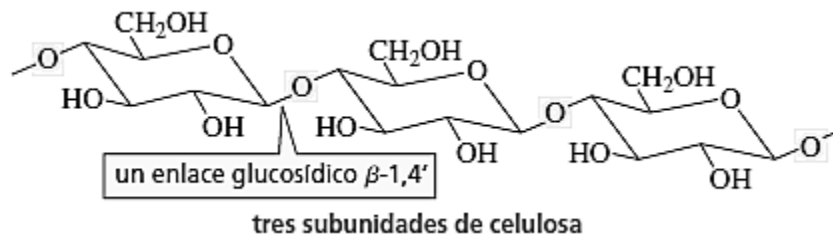


Figura 2.4. Estructura de tres subunidades de celulosa.

La celulosa está rodeada de lignina. La estructura de celulosa es difícil de romper sin hidrólisis enzimática, debido a su carácter cristalino. La cadena celulósica lineal está formada por 500-14,000 unidades de D-glucosa. Alrededor de 36 cadenas de glucano unidas por hidrógeno forman microfibrillas insolubles en la pared celular secundaria. Se necesitan condiciones de alta temperatura y presión, a 320 ° C y 25 MPa respectivamente, para

convertir esta estructura cristalina rígida en una estructura amorfa en agua. Estos requisitos son más altos que para las materias primas con almidón (Robak y Balcerek, 2018).

### 2.2.3. Hemicelulosa

La hemicelulosa se compone de diferentes unidades de azúcar. La hemicelulosa es un heteropolímero de azúcares de cadena corta y ramificada. Además de los monosacáridos, hay ácidos de azúcar llamados ácidos urónicos en la fracción de hemicelulosa. Los ácidos de azúcar típicos en la estructura de hemicelulosa incluyen los ácidos D-glucurónico, 4-O-metilglucurónico y D-galacturónico. El xilano es un ejemplo de hemicelulosa representado por la Figura 2.5. Todos los monosacáridos en las hemicelulosas se clasifican en pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-manosa, D-galactosa y D-glucosa) (Robak y Balcerek, 2018). La combinación de celulosa y hemicelulosas se llama holocelulosa y por lo general representa 65-70 por ciento del peso seco de la planta (Han y Rowell, 1997).

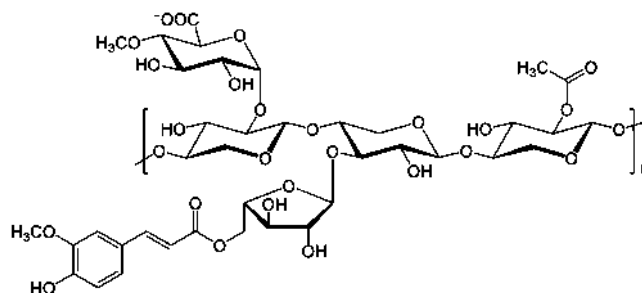


Figura 2.5. Representación de la estructura molecular del xilano, una hemicelulosa.

### 2.2.4. Lignina

La lignina es un polímero aromático sintetizado a partir de precursores de fenilpropanoide. Las unidades químicas básicas de fenilpropano de la lignina (principalmente siringilo, guayacilo y p-hidroxifenol) están unidas por un conjunto de enlaces para formar una matriz muy compleja (Figura 2.6). Esta matriz comprende una variedad de grupos funcionales, tales como hidroxilo, metoxilo y carbonilo, que imparten una alta polaridad a la macromolécula de lignina. El contenido de lignina en seco, generalmente varía del 10% al 40% en peso en varias especies herbáceas, como el bagazo, las mazorcas de maíz, las cáscaras de maní (cacahuete), las cáscaras de arroz y la paja. La lignina es uno de los inconvenientes del uso

de materiales de biomasa lignocelulósica en la fermentación, debido a que hace que la lignocelulosa sea resistente a la degradación química y biológica.

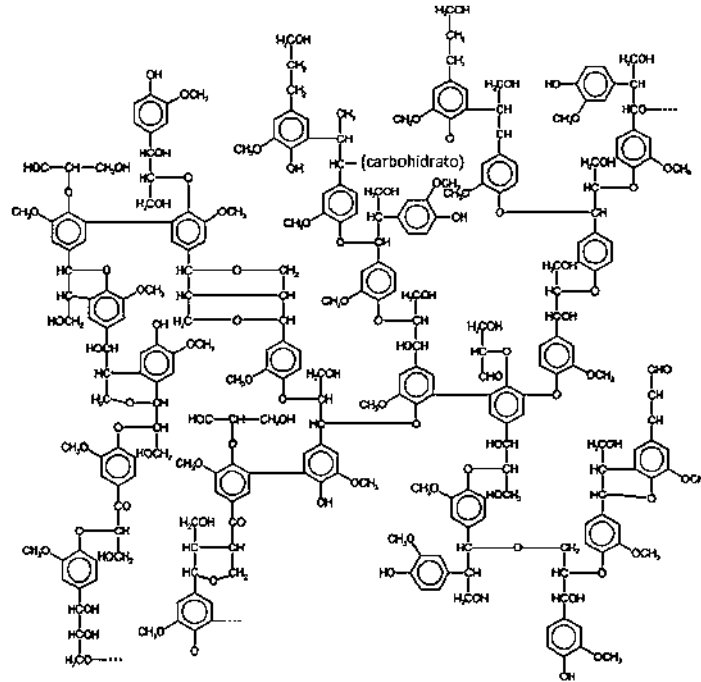


Figura 2.6. Estructura de la lignina.

Debido a ello las principales materias primas para la obtención de bioetanol, la constituyen muchos cereales, ricos en almidón, como el maíz o el trigo, o también otros productos agrícolas ricos en azúcares más sencillos como la caña de azúcar o la remolacha (Romanelli y Pasquale, 2017).

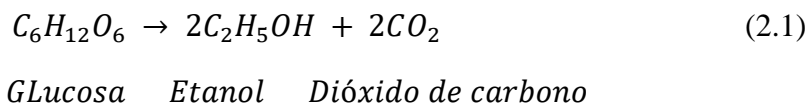
### 2.3. Clasificación de biocombustibles

Existen varios tipos de biocombustibles, a los cuales se les clasifica de acuerdo al insumo o materia prima y a la tecnología empleada para producirlos. Debido a los avances en la tecnología, esta clasificación se realiza por generaciones.

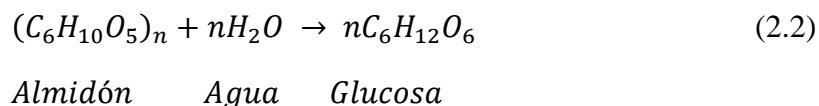
### 2.3.1. Primera generación

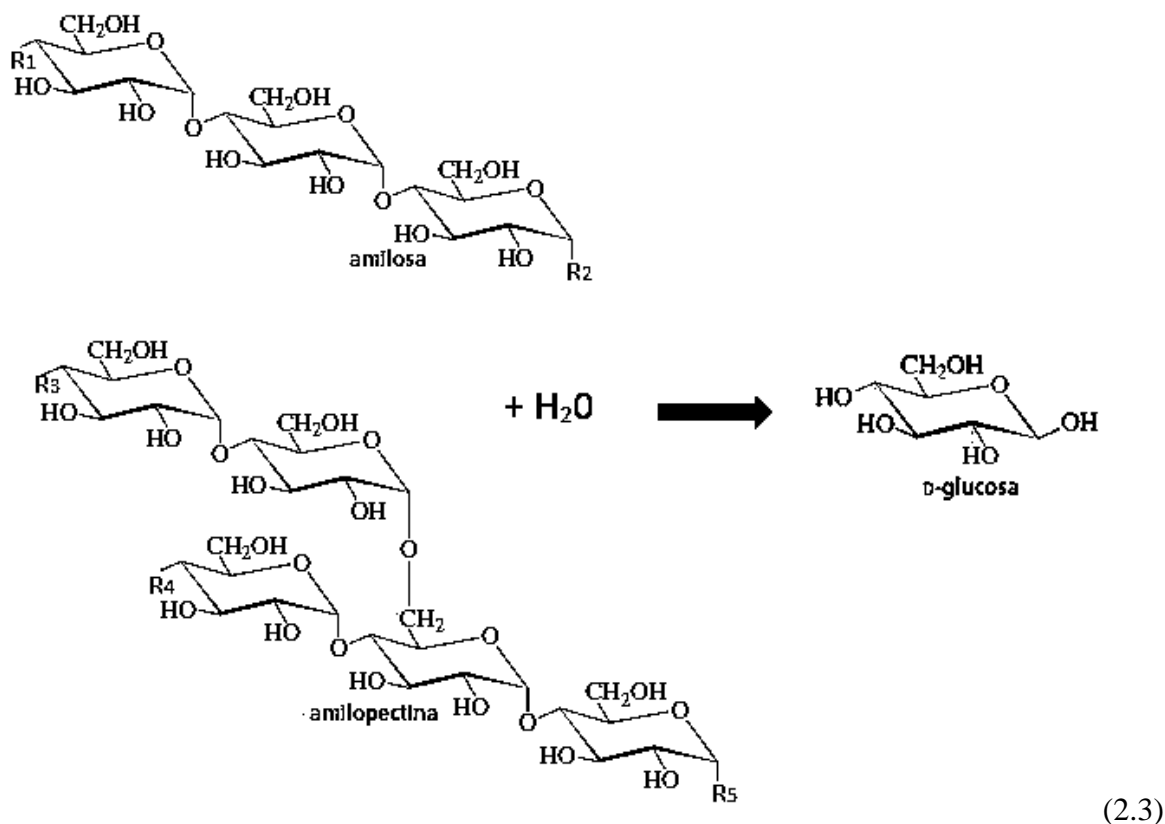
El bioetanol de primera generación es obtenido a través de la fermentación de los carbohidratos disponibles en las materias primas que contienen azúcares o almidón, como la caña de azúcar, la remolacha azucarera, el maíz o el trigo, entre otros. La remolacha azucarera y el trigo son comunes en Europa, mientras que la caña de azúcar y el maíz son las principales materias en Brasil y en los Estados Unidos, respectivamente. Las ventajas de estos biocombustibles son su facilidad de procesamiento y sus bajas emisiones de gases de efecto invernadero, pero tiene como desventaja el desvío de recursos alimenticios hacia la producción de energéticos (Kennes *et al.*, 2015).

Teóricamente, la fermentación de 1 mol de glucosa, como ejemplo de una hexosa monomérica de azúcar, produciría 2 moles de etanol como se muestra en la ecuación 2.1, aunque el rendimiento real es menor porque parte del sustrato es usado para el crecimiento de la biomasa. El azúcar es fermentado por levaduras, por ejemplo, *S. cerevisiae* o bacterias como *Zimomonas mobilis*.



La conversión de almidón a azúcares fermentables (ecuación 2.2) es posible gracias a la actividad de enzimas como las amilasas y glucoamilasas. El proceso de separar la cadena larga de carbohidratos del almidón con la adición de moléculas de agua catalizada por enzimas o ácidos se le conoce como hidrólisis (ecuación 2.2). Después de este proceso, los azúcares simples extraídos de la materia prima son fermentados por levaduras (Ecuación 2.1) (Kennes *et al.*, 2015). La ecuación 2.3 representa la hidrólisis de la amilosa y amilopectina catalizada por la enzima glucoamilasa (Aditiya *et al.*, 2016).

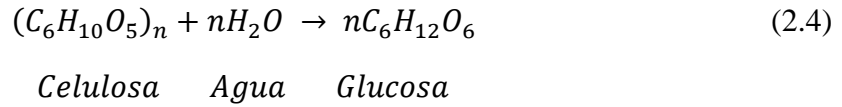




### 2.3.2. Segunda generación

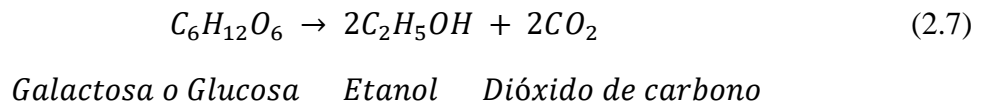
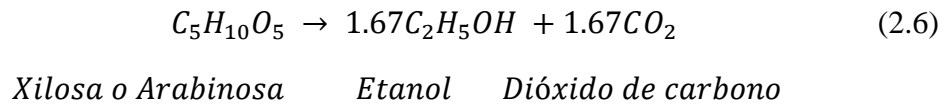
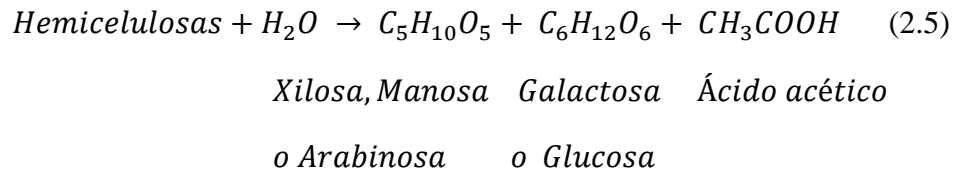
El bioetanol de segunda generación es obtenido principalmente de materiales lignocelulósicos, los cuales son altamente abundantes y renovables. Además, en contraste con las materias primas de primera generación, los componentes lignocelulósicos no son una fuente de alimento directo del ser humano. La lignocelulosa es considerada en ser el tipo más abundante de biomasa renovable en la tierra. Los principales componentes encontrados en la materia lignocelulósica son la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Una cuestión importante es la rentabilidad del bioetanol de segunda generación en comparación con los combustibles fósiles; el precio de la materia prima tiene el mayor impacto en el precio de los biocombustibles (Kennes *et al.*, 2015). Su desventaja es la poca ganancia en disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero durante el procesamiento de los insumos, respecto a los biocombustibles de primera generación (Álvarez, 2009).

Para la celulosa, al igual que el almidón, es necesario romper las cadenas de carbohidratos a azúcares más simples mediante hidrólisis (ecuación 2.4) para su posterior fermentación (ecuación 2.1).



La celulasa es la enzima específica para degradar el compuesto de celulosa. Según la actividad enzimática de las celulasas, la clasificación se ramifica según la tarea específica: endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas (Aditiya *et al.*, 2016).

Varios productos pueden resultar de la hidrólisis de material lignocelulósico. La Ecuación 2.5 ocurre cuando las hemicelulosas se hidrolizan a xilosa, se liberan manosa, ácido acético, galactosa y glucosa (Balat, 2011). Tanto pentosas (ecuación 2.6) como hexosas (ecuación 2.7) serán fermentadas para producir bioetanol.



Cabe destacar que en la ruptura de las cadenas de hemicelulosa no sólo se obtienen monosacáridos simples, también hay producción de componentes indeseados debido a la compleja estructura del material hemicelulósico, como el ácido acético; por lo tanto, los productos obtenidos al final de la etapa de hidrólisis dependerán de la composición de las hemicelulosas.



### 2.3.3. Tercera generación

El bioetanol de tercera generación se centra en el uso de organismos marinos como las algas. Los insumos son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina cultivos energéticos. Las ventajas de estos biocombustibles son el secuestro de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) para la producción de los insumos y un balance positivo en la emisión de gases de efecto invernadero, pero su desventaja es la utilización de tierras de cultivo de alimentos para sembrar los insumos, con excepción de las algas verdes (Álvarez, 2009).

La aceptación pública de la capacidad de las algas para proporcionar biomasa para la producción de bioetanol es positiva, debido a que esta acción puede limitar la competencia de la materia prima de las plantas agrícolas. Las algas representan una materia prima alternativa prometedora debido a su alto contenido de lípidos y carbohidratos, fácil cultivo en una amplia variedad de ambientes de agua, uso relativamente bajo de la tierra y alta absorción de dióxido de carbono. Sobre todo, las algas tienen un bajo nivel de lignina y hemicelulosa, lo que hace que sea importante su uso en la producción de bioetanol.

La exposición de los componentes intracelulares de las algas mediante el uso de hidrólisis es crucial para la producción de bioetanol. Las paredes celulares son las estructuras principales en las algas que necesitan ser despolimerizadas para extraer los contenidos de polisacáridos como laminarinas y ulvanos (Figura 2.7) además de alginatos, fucanos, agaranes y carragenanos. Durante la conversión, el polisacárido se hidrolizará en moléculas de monómero libres que pueden fermentarse fácilmente en bioetanol (Jambo *et al.*, 2016).

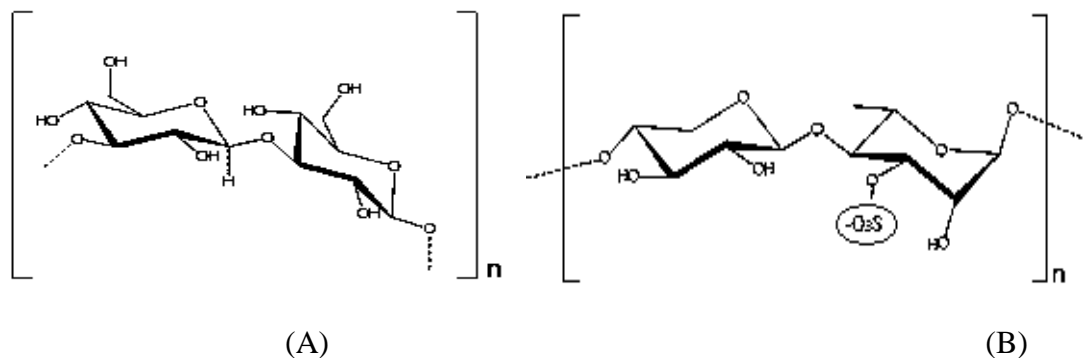


Figura 2.7. Unidades de glucosa en laminarina de algas pardas (A) y unidades de ulvanobiosan en ulvanos de algas verdes (B).

#### 2.3.4. Cuarta generación

Los biocombustibles son producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean dióxido de carbono o alguna otra fuente de carbono para la obtención de los biocombustibles. A diferencia de las generaciones anteriores, en las que también se pueden emplear bacterias y organismos genéticamente modificados como insumo o para realizar alguna parte de los procesos, en la cuarta generación, la bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de los biocombustibles. Actualmente esta generación de biocombustibles se encuentra en fase teórica, sólo se conoce la posible ruta de síntesis del etanol a partir de dióxido de carbono, sin embargo, depende totalmente de la información genética de una bacteria artificial y puede tener limitaciones termodinámicas importantes (Álvarez, 2009).

#### 2.4. Aguacate

El aguacate es un árbol originario de Mesoamérica, su origen tuvo lugar en la parte centro de México y en algunas partes altas de Guatemala, donde ya se cultivaba con anterioridad a la llegada de los españoles. Regularmente, el árbol de aguacate puede alcanzar una altura de hasta 20 metros, sin embargo, cuando se cultiva no se deja crecer más de 5 metros, para facilitar las prácticas de control fitosanitario, cosecha, poda y fertilización foliar. Es de tronco grueso y con hojas alargadas que terminan en punta en la parte alta del tronco. Tiene varias ramificaciones, que generan un follaje denso. El aguacate es considerado un producto perenne debido a que se cultiva durante todo el año. Es un fruto carnoso con un hueso en su interior, en forma de pera, de color verde claro a verde oscuro y de violeta a negro, cáscara rugosa con una pulpa verde amarillenta y un hueso central muy grande. Existen aproximadamente 400 variedades, por lo que podemos encontrar frutos de formas y pesos diferentes, que pueden llegar a pesar de 150 a 350 g (SFA, 2011).

##### 2.4.1. Requerimientos climáticos

La temperatura para el cultivo del aguacate va de los 17° C a 24° C, siendo la temperatura ideal en alrededor de 20° C, temperatura en la cual alcanza su óptimo desarrollo. En cuanto a la humedad, se requiere regímenes pluviales de 1,000 a 2,000 milímetros de lluvia. Además, durante la época productiva, el riego localizado prolonga el periodo productivo, incrementando los rendimientos en alrededor del 30% y mejorando las cualidades organolépticas de los frutos. Para sembrar el aguacate, los suelos más recomendados son los

---

de textura ligera y bien drenados con un pH neutro o ligeramente ácidos de 5.5 a 7. También, se pueden cultivar en suelos arcillosos o franco arcillosos, siempre que exista un buen drenaje. El exceso de humedad es un medio que provoca enfermedades de la raíz, fisiológicas y fúngicas (SFA, 2011).

#### 2.4.2. Clases de aguacate

**Hass** (el más popular en el mercado internacional): cuando está maduro, su cáscara adquiere un tono oscuro, casi negro. Su piel pasa de verde oscuro a verde purpurino. Tiene un gran sabor a nuez y avellana, con textura suave-cremosa y una semilla de pequeña a mediana. Disponible durante todo el año. El aguacate Hass proviene de injerto, mezcla de diferentes variedades de aguacate, desarrollado por Rudolph Hass.

**Fuerte**: su cáscara es gruesa, comparada con otras especies y no se oscurece con la maduración. Su piel es ligeramente áspera, con muchos pequeños puntos amarillos. Lo podemos encontrar desde finales de otoño hasta primavera. Tienen la forma de una pera, de gran sabor y pulpa cremosa.

**Criollo**: se caracteriza por tener una cascara muy delgada y suave, que se aferra a la masa, además, un hueso muy grande. El color de su cascara es oscura y su pulpa al madurar adopta un color amarillo-limón. Tiene entre sus principales características ser resistente al frío.

**Bacón**: fruta disponible durante otoño hasta primavera. El fruto es de forma ovalada, pulpa amarilla verdosa que tiene un gran sabor con textura suave. Es fácil de pelar y contiene un hueso mediano a grande. Al madurar, la piel de este fruto toma un color más oscuro.

**Pinkerton**: tiene cosecha temprana, redondo, con cuello en forma de pera, de tamaño medio. Se trata de una fruta de apariencia larga, pulpa cremosa con excelente sabor. Tiene una cáscara más gruesa que las diferentes clases de aguacate, además es muy fácil de pelar. Lo encontramos de invierno hasta primavera.

**Gwen**: lo encontramos desde principios de primavera hasta finales de verano. Es una fruta redonda, la piel es delgada y granulada de color verde. El sabor de la pulpa es suave y cremoso.

**Reed**: Disponible en verano e inicios de otoño. Su piel permanece gruesa y verde, tienen buen sabor, presenta una suave presión cuando está madura. Es fácil de pelar y contiene una semilla mediana (SFA, 2011).

### 2.4.3. Producción de aguacate en México

La producción nacional de aguacate en México está creciendo, se reportaron 1,644,225.68 toneladas producidas en el año 2015 mientras que para el año 2019 la producción fue de 2,300,888.9 toneladas obtenidas; en la Figura 2.8 se muestra el comportamiento ascendente de la producción de aguacate en México para el periodo 2015 al 2019 (SAGARPA, 2019). México es el principal proveedor del mercado internacional con una aportación de 45.95% del valor de las exportaciones mundiales (SAGARPA, 2019); mientras que Michoacán es el líder en producción a nivel nacional con una contribución del 78% del total de la producción de aguacate, seguido del Estado de México y Jalisco, ambos con un porcentaje del 6%, Morelos y Nayarit representan el 3 y 2% respectivamente (SIAP, 2019). En la Figura 2.9 está representada la contribución de los principales estados de México en la producción de aguacate hasta septiembre de 2019 (SAGARPA, 2019). La producción nacional al mes de septiembre de 2019, fue de 1,367,734 toneladas (ton); 5.7% (88,290 ton) mayor a lo cosechado en igual periodo del año anterior (1,549,444 ton). La superficie sembrada se incrementó en 4,289 hectáreas, 1.9% más que las 231,028 hectáreas reportadas en el periodo 2018. Al mes de septiembre la superficie total cosechada pasó de 199,285 hectáreas en 2018 a 208,347 en 2019.



Figura 2.8. Producción nacional anual de aguacate en miles de toneladas.

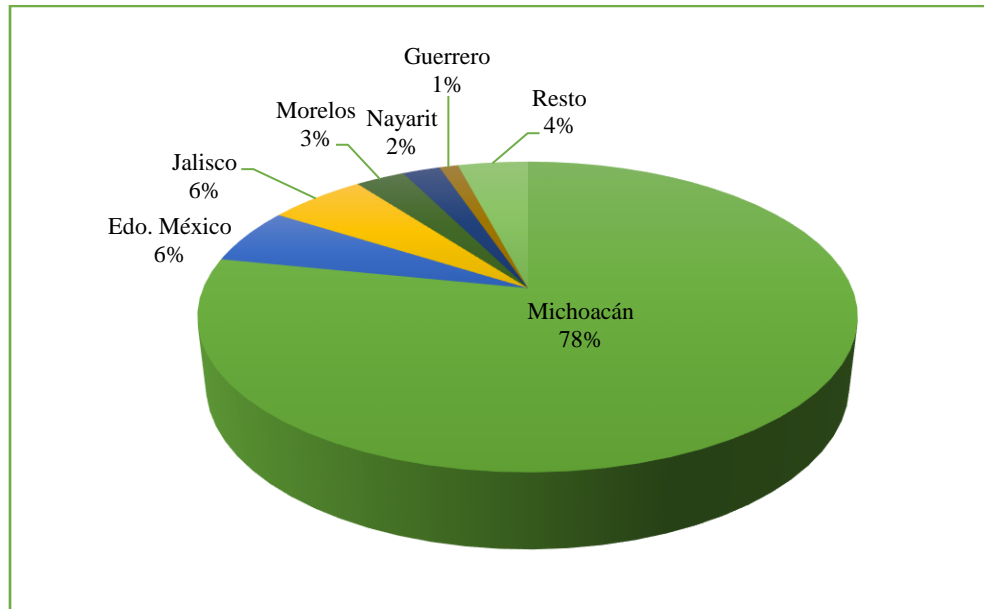


Figura 2.9. Porcentaje de producción de aguacate por estado en México hasta septiembre 2019.

La semilla y la cáscara del aguacate se obtienen como residuos después de su procesamiento. La semilla de aguacate (15%-16% del peso de la fruta) es una de las mejores fuentes de fibra dietética y contiene compuestos valiosos como ácidos grasos, polifenoles, esteroides, antioxidantes y potasio. La semilla de aguacate también contiene saponina, flavonoides, fenoles y glucósidos cianogénicos. Se ha informado que la cáscara de aguacate contiene flavonoides, taninos, fenoles y esteroides y, por lo tanto, exhibe actividad antioxidante. La industria de procesamiento de aguacate genera cantidades significativas de desechos (cáscara y semilla) que pueden procesarse para producir productos de valor agregado para los que existen aplicaciones prometedoras y significativas en las industrias de alimentos y afines (Dávila *et al.*, 2017).

#### 2.4.4. Composición química de la semilla de aguacate

Se ha reportado la composición química de la semilla de aguacate para su aprovechamiento industrial. La Tabla 2.3 contiene la caracterización química de la cáscara y semilla de aguacate (Dávila *et al.*, 2017).

**Tabla 2.3. Caracterización química para la cáscara y semilla de aguacate.**

Componente	Aguacate (%masa)	
	Cáscara	Semilla
Humedad	7.33 ± 1.15	7.02 ± 0.18
Extractivos	34.38 ± 0.34	35.95 ± 1.95
Celulosa	27.58 ± 1.18	6.48 ± 0.38
Hemicelulosa	25.30 ± 1.24	47.88 ± 2.14
Lignina	4.37 ± 0.13	1.79 ± 0.04
Cenizas	1.04 ± 0.05	0.87 ± 0.06
Total	100	100

Se ha establecido que los extractivos con agua contienen material orgánico, azúcares y materiales nitrogenados, minerales, etc., mientras que los extractivos de etanol consisten en clorofila, pigmentos naturales, etc.

Se ha utilizado el almidón contenido en la semilla de aguacate para la obtención de dextrina, reportando un rendimiento de extracción de almidón del 23.15% (Maryam *et al.*, 2016). Por otro lado, diversos autores han tomado la siguiente composición de la semilla de aguacate en base húmeda: humedad alrededor del 50%; cenizas 1.24–1.34%, proteínas 2.38–2.45%, azúcares totales 2.21–3.50%, almidón 27.54–29.80%, fibra cruda 3.65–4.14% y 7.76–9.25% de materiales indeterminados (Lacerda *et al.*, 2013; Chel *et al.*, 2016).

De los datos reportados se espera que la semilla de aguacate proporcione una cantidad considerable de almidón para obtener bioetanol. Cabe mencionar que existe diferencia entre los resultados reportados en la literatura en cuanto al contenido de almidón, por lo tanto, será necesario analizar la semilla de aguacate para estimar su contenido.

## 2.5. Proceso de producción de bioetanol

En la Figura 2.10 se puede ver, de forma esquemática, el proceso completo de obtención del alcohol, a partir de las principales materias primas que se utilizan para su producción (García y García, 2006).

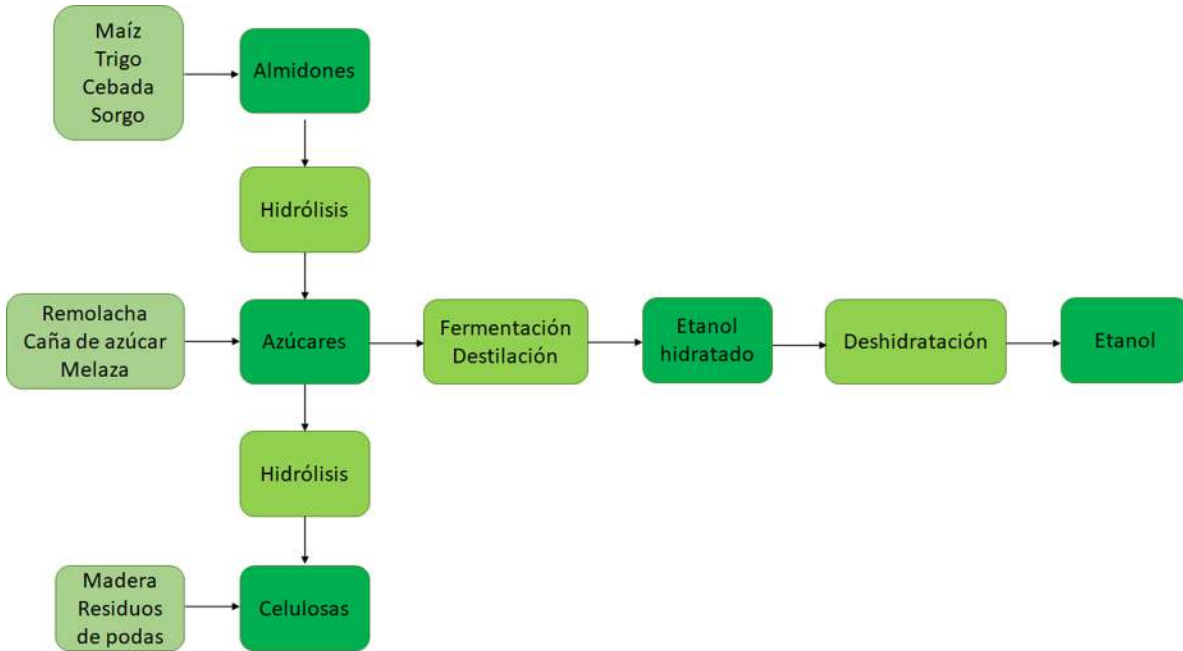


Figura 2.10. Proceso de obtención del bioetanol.

### 2.5.1. Pretratamientos

El primer paso del proceso consiste en la eliminación de los materiales sólidos insolubles, ligninas (Figura 2.11). Estos polímeros cumplen la función de proteger el interior de la célula de la acción de las diversas enzimas de los microorganismos que puedan intentar atacarla, y justamente por esa razón deben eliminarse, pues para la etapa siguiente resulta necesaria la acción de ciertas enzimas para comenzar a romper las largas cadenas de las moléculas de celulosa (Romanelli y Pasquale, 2017).

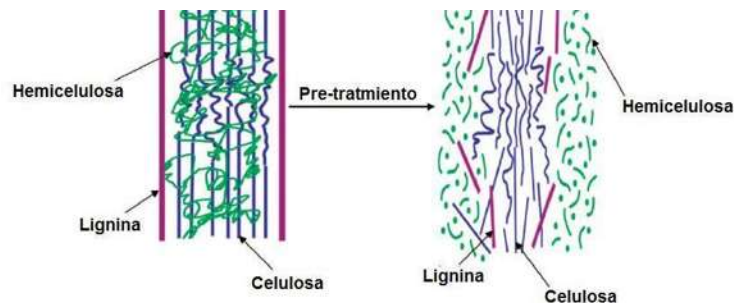


Figura 2.11. Pretratamiento del material lignocelulósico.

---

Los objetivos principales del proceso de pretratamiento para comenzar la producción de biocombustibles son:

- Como método de reducción del tamaño del material físico.
- Provisión de la exposición de los componentes (hemicelulosa, celulosa, almidón) antes de la hidrólisis para obtener una reducción mejorada de azúcares.
- Provisión de un mejor acceso de hidrólisis para que las enzimas hidrolicen los carbohidratos en azúcares fermentables en el método de hidrólisis enzimática posterior.
- Reducción del grado de cristalinidad de la matriz de celulosa.

Con frecuencia se enfatiza que el proceso de pretratamiento es muy recomendable dado que proporciona un rendimiento posterior directo de los azúcares fermentables; previene la degradación prematura de los azúcares producidos, previene la formación de inhibidores antes de la hidrólisis y la fermentación; reduce el costo de procesamiento; y disminuye la demanda de energía convencional en general.

En los residuos agrícolas almidonados típicos, la reducción del tamaño físico como resultado del pretratamiento es suficiente. Este enfoque generalmente se realiza mediante cualquier pretratamiento mecánico simple puesto que el material con almidón proporciona un acceso directo más fácil a la hidrólisis (enzimáticamente a través de amilasas). Con el tamaño reducido de almidón, se puede optar por un método de hidrólisis fácil (por ejemplo, calentar el almidón con agua) como método para hidrolizar el almidón, aunque el rendimiento de etanol puede variar de acuerdo con el método y el procedimiento de las otras etapas en la producción general (Aditya *et al.*, 2016).

En los materiales lignocelulósicos, el pretratamiento comúnmente funciona como deformación de los componentes rígidos, que se estructuran de lignina, celulosa y hemicelulosa; y dando como resultado la degradación del grado de cristalinidad, que se requiere como condición adecuada antes de la hidrólisis. El pretratamiento de reducción física (mecánicamente) también es adecuado para el material lignocelulósico. Sin embargo, con un método adicional, por pretratamiento químico, por ejemplo, proporcionaría una condición más suave para la hidrólisis como la siguiente etapa. La combinación también produciría un mejor rendimiento de azúcares reductores al final de la hidrólisis. Las amplias opciones del método de pretratamiento para el material lignocelulósico son sacar la forma amorfa de las celulosas, de modo que las enzimas en la etapa de hidrólisis puedan



---

consumirlas eficientemente y dar como resultado más monómeros de azúcar al final del proceso. Se requiere más esfuerzo para lograr azúcares complejos (carbohidratos) en los materiales lignocelulósicos para ser convertidos en los monómeros de azúcar. Los métodos de pretratamiento pueden ser biológicos, químicos, físicos o fisicoquímicos (Aditiya *et al.*, 2016).

#### 2.5.1.1. Pretratamiento biológico

Los microorganismos empleados en este método poseen específicamente la capacidad de degradar los componentes lignocelulósicos de la materia prima en forma amorfa. Los microorganismos típicos utilizados como liberadores de la compleja estructura lignocelulósica son la podredumbre parda, la podredumbre blanda y la podredumbre blanca. El tipo de podredumbre parda puede degradar la celulosa, mientras que tanto la podredumbre blanda como la blanca pueden degradar tanto la celulosa como la lignina. De todos estos tipos de hongos, el hongo de podredumbre blanca se conoce como el agente de pretratamiento biológico más favorable. La capacidad de los hongos para degradar la estructura lignocelulósica reside en el sistema hidrolítico y el sistema ligninolítico, que son responsables de producir hidrolasas para la liberación de polisacáridos y de romper la estructura de la lignina, respectivamente. Sin embargo, el tratamiento previo de la materia prima lignocelulósica por este método da como resultado una tasa de producción más lenta. Por lo tanto, este enfoque es desfavorable para la industria a gran escala (Aditiya *et al.*, 2016).

#### 2.5.1.2. Pretratamiento químico

Aunque no existe el mejor método absoluto para la etapa de pretratamiento, se cree que el pretratamiento químico (pretratamiento con ácido diluido) es el más adecuado para la aplicación a escala comercial. Como ventajas del pretratamiento químico, las sustancias químicas son más fáciles de obtener, son más baratas y no se ven afectadas por el desarrollo tecnológico (a diferencia de las enzimas, las enzimas diseñadas cuestan más que las enzimas tradicionales), menos problemas de almacenamiento. Las sustancias son principalmente duraderas con el almacenamiento adecuado. Las sustancias químicas degradan las paredes del material lignocelulósico y la compleja cadena de carbohidratos en el almidón a través de una reacción química directa que requiere menos energía (en forma de calor), aunque lleva más tiempo y produce un rendimiento de azúcar comparativamente menor (para el pretratamiento alcalino).

Hay varios ácidos comunes usados en el pretratamiento ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y ácido sulfúrico como los más populares para usarse en material lignocelulósico; también varios ácidos orgánicos como el ácido peracético, el ácido maleico, el ácido láctico y el ácido acético. En general, el pretratamiento ácido puede realizarse mediante dos métodos: pretratamiento con ácido concentrado y pretratamiento con ácido diluido. En el pretratamiento con ácido concentrado, solo se requiere un tiempo más corto y una temperatura moderada para producir los monómeros de azúcar. Este método también puede producir monosacáridos degradando los enlaces glucosídicos del polisacárido. En la práctica, el ácido concentrado tiene inconvenientes debido a que forma inhibidores, corroe fácilmente el equipo de producción e inclina la tendencia a la degradación del monómero de azúcar (Aditya *et al.*, 2016).

En el tratamiento alcalino, la biomasa se trata con álcalis como hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio a temperaturas y presiones normales. La principal ventaja del proceso es la eliminación eficiente de lignina de la biomasa. Muchos informes han demostrado que el proceso elimina los grupos acetil y ácido urónico presentes en la hemicelulosa y, por lo tanto, mejora la accesibilidad de la enzima que degrada la hemicelulosa. En el proceso de tratamiento alcalino, los enlaces de éster que unen los residuos de xilano y hemicelulosas también se hidrolizan (Chaturvedi y Verma, 2013).

#### 2.5.1.3. Pretratamiento físico

El pretratamiento mecánico es destinado a degradar la cristalinidad de la biomasa, mejorando así el resto del proceso de producción de bioetanol. Convencionalmente la reducción del tamaño físico se puede realizar mediante la molienda. El desafío para el pretratamiento mecánico es su gran consumo de energía. Se ha informado que la reducción física con enfoque por pretratamiento mecánico utiliza un tercio del total consumo de energía de toda la producción de bioetanol.

La extrusión es un método más avanzado de conminución mecánica. El pretratamiento con biomasa por extrusión amplía el acceso a la enzima para atacar los carbohidratos mejor expuestos. Implica el cizallamiento y la mezcla de la materia prima para pasar a través del extrusor a temperatura alta, causando la deformación de la biomasa física e incluso químicamente.

La irradiación de microondas practica la aplicación de campos electromagnéticos para provocar el calentamiento interno de un objeto. En la producción de bioetanol, este enfoque

es ejecutable con el propósito de la interrupción estructural de la biomasa pretratada. En el material lignocelulósico, el microondas ataca los enlaces polares haciendo vibrar la estructura hasta que el material se calienta internamente. Como resultado, se fractura la estructura lignocelulósica compleja, ampliando el área practicable para el posterior ataque enzimático (Aditiya *et al.*, 2016).

#### 2.5.1.4. Pretratamiento fisicoquímico

El pretratamiento con explosión de vapor aplica una combinación de cambio repentino hidrotérmico y de presión para tratar la biomasa. Inicialmente, la biomasa se expone a temperatura y presión altas 150–250 °C y 1–4 MPa durante unos segundos o minutos, luego el proceso finaliza después de que se produce la despresurización de la biomasa, el vapor explota las fibras de la biomasa. (Kennes *et al.*, 2015).

La explosión de la fibra con amoníaco (AFEX) tiene un principio bastante similar con la explosión de vapor, sólo con el amoníaco como agente de explosión. El proceso AFEX depende del lanzamiento inmediato de alta presión y alta temperatura ( $90 \pm 30$  °C) sobre la biomasa, lo que obliga al amoníaco a reventar la estructura de la biomasa y deja algunos rastros de amoníaco en la biomasa que es ventajosa como fuente de nitrógeno de los microorganismos Este método es fuerte en la biomasa fibrosa, por ejemplo, el bagazo de caña de azúcar y en los sustratos ricos en lignina, como los residuos forestales (Kennes *et al.*, 2015; Aditiya *et al.*, 2016).

En el pretratamiento de oxidación húmeda, la biomasa se somete a altas presión y temperatura, aproximadamente 500–2000 kPa y 170–200 °C respectivamente, durante alrededor de 10-15 min. Este enfoque degrada el material lignocelulósico con menos inhibidores, elimina la lignina y reduce la celulosa cristalina, por lo tanto, proporciona una mejor condición para que los procesos posteriores (hidrólisis enzimática y fermentación) (Aditiya *et al.*, 2016).

#### 2.5.2. Hidrólisis

El proceso de hidrólisis separa la cadena larga de carbohidratos (hemicelulosa, celulosa o almidón) con la adición de moléculas de agua y generalmente es catalizado por enzimas o ácidos. Esta etapa es crítica en la producción de bioetanol puesto que la calidad del hidrolizado afectará el subsiguiente proceso de fermentación, que se interconecta con la calidad del etanol como producto final. Se requiere hidrólisis para convertir los carbohidratos

(almidón, celulosa y hemicelulosa) en azúcares fermentables, debido a que la levadura no puede utilizar polímeros de carbohidratos como sustrato. La hidrólisis enzimática es conocida por su desafío económico debido al alto costo de las enzimas y considerada poco práctica para fines comerciales. Sin embargo, en comparación con la hidrólisis ácida, las enzimas funcionan en un ambiente templado, por lo tanto, se necesitará menos costo de mantenimiento del equipo. Un problema importante es la capacidad del ácido para degradar gradualmente los monómeros de azúcar una vez que se forman en un ambiente ácido con alta temperatura (Aditiya *et al.*, 2016; Zabed *et al.*, 2017).

### 2.5.2.1. Hidrólisis enzimática

El material Lignocelulósico, que se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, es degradable enzimáticamente con respecto a los componentes principales. La celulosa se establece mediante cadenas de glucosa que están conectadas por enlaces  $\beta$ -1,4. En la naturaleza, la celulosa tiene cierto grado de cristalinidad que se forma por el enlace de hidrógeno a lo largo del proceso de hidrólisis, dado que se produce una tasa de hidrólisis más lenta y una menor adsorción enzimática cuando la cristalinidad es alta. En lugar del área cristalina rígida, la zona amorfa en la celulosa es más fácil de degradar. Sin embargo, para reducir la cristalinidad de la biomasa, el método de pretratamiento mecánico se adapta al propósito. La celulasa es la enzima específica para degradar el compuesto de celulosa. Según la actividad enzimática de las celulasas, la clasificación se ramifica según la tarea específica: endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa. Las enzimas amilolíticas, o llamadas amilasas, son los grupos de enzimas específicamente para degradar los enlaces de glucosa en el almidón (Aditiya *et al.*, 2016).

### 2.5.2.2. Hidrólisis química

La hidrólisis química implica la exposición de materiales lignocelulósicos a un producto químico durante un período de tiempo a una temperatura específica, y da como resultado, monómeros de azúcar a partir de polímeros de celulosa y hemicelulosa. En la hidrólisis química, el pretratamiento y la hidrólisis pueden llevarse a cabo en un solo paso. Existen dos tipos básicos de procesos de hidrólisis ácida: ácido diluido y ácido concentrado.

El proceso de ácido diluido implica una solución de aproximadamente 1% de concentración de  $H_2SO_4$  en un reactor de flujo continuo a alta temperatura (aproximadamente  $215^\circ C$ ). La hidrólisis ácida diluida ocurre en dos etapas para aprovechar las diferencias entre la

hemicelulosa y la celulosa. La primera etapa se realiza a baja temperatura para maximizar el rendimiento de la hemicelulosa, y la segunda etapa de temperatura más alta se optimiza para la hidrólisis de la porción de celulosa de la materia prima.

En la hidrólisis ácida concentrada implica un pretratamiento ácido (diluido o concentrado) para liberar los azúcares hemicelulósicos, mientras que la etapa posterior requiere que la biomasa se seque seguida de la adición de ácido sulfúrico concentrado (70-90%). Este proceso proporciona una conversión completa y rápida de celulosa en glucosa y hemicelulosas en azúcares de cinco carbonos con poca degradación. Los factores críticos necesarios para hacer que este proceso sea económicamente viable son optimizar la recuperación de azúcar y recuperar de manera rentable el ácido para reciclar (Balat, 2011).

### 2.5.3. Fermentación

La fermentación es un proceso metabólico de microorganismos que convierte los azúcares solubles en alcohol. Algunas bacterias y levaduras pueden metabolizar monosacáridos (por ejemplo, glucosa y fructosa) y disacáridos (por ejemplo, maltosa y sacarosa) en ausencia de oxígeno, lo que resulta en la producción de etanol y dióxido de carbono. El hidrolizado, en este proceso, se introduce en un medio de fermentación específico junto con un microorganismo (levadura o bacteria), de acuerdo con la idoneidad para digerir los compuestos de azúcar respectivos. Un tipo de bacteria fermentadora de glucosa, por ejemplo, *Zymomonas mobilis* prefiere el hidrolizado rico en glucosa como su alimento y dejando el compuesto de etanol como producto. Es bastante difícil esperar que el hidrolizado sea completamente uniforme en términos del monómero de azúcar, serían fracciones de diferentes monómeros y varios otros oligosacáridos con probables inhibidores o sustancias no digeribles. Teóricamente, cada kilogramo de glucosa y xilosa puede producir 0.49 kg de dióxido de carbono con 0.51 kg de etanol (Aditiya *et al.*, 2016; Zabed *et al.*, 2017).

La fermentación en particular requiere las condiciones de soporte para que los microorganismos se mantengan, es decir, el intervalo de temperatura y pH. Como organismos mesofílicos, la mayoría de los agentes de fermentación se sienten cómodos en 30-38 °C. Para las bacterias del tipo de microbios de fermentación, el pH de 6.5 a 7.5 es típicamente esencial para mantener el crecimiento de la bacteria. Mientras tanto, los hongos son capaces de resistir un ambiente más ácido de pH 3.5-5.0.

Hay un número de bacterias descubiertas adecuadas como microorganismos de fermentación. La bacteria de fermentación más conocida, *Zymomonas mobilis* convierte glucosa, sacarosa

---

y fructosa en etanol. *S. cerevisiae* es una levadura que consume azúcares hexosas de forma natural (por ejemplo, glucosa, fructosa). *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* y *Pachysolen tannophilus* se reconocen en su capacidad para convertir azúcares pentosas (por ejemplo, xilosa) (Aditiya *et al.*, 2016).

## 2.6. Metodologías para la producción de bioetanol

### 2.6.1. Hidrólisis y fermentación separadas (SHF)

Este es un proceso de dos etapas en el que la hidrólisis se realiza por separado de la etapa de fermentación, es decir, la biomasa pretratada se degrada primero en unidades monoméricas a través de enzimas o ácidos, seguido de la fermentación de estos azúcares en etanol. La principal ventaja de este proceso es que tanto la hidrólisis como la fermentación funcionan en sus respectivas condiciones óptimas, sin embargo, la acumulación de azúcares que inhiben la actividad enzimática sigue siendo un inconveniente importante que finalmente afecta el rendimiento de etanol (Balat, 2011; Rastogi y Shrivastava, 2017).

### 2.6.2. Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)

Este enfoque combina la sacarificación de biomasa con la fermentación simultánea de azúcares liberados en un solo reactor. La característica clave de este proceso es que tan pronto como los azúcares se forman a partir de la biomasa, se convierten rápidamente en etanol, disminuyendo así la acumulación de azúcares inhibitorios en el medio. La facilidad de operación, el bajo requerimiento de equipo que el proceso SHF y la presencia de etanol en el caldo que hace que el medio sea menos vulnerable a la contaminación, son algunos de los beneficios de este proceso. El principal inconveniente de este proceso es la dificultad en la optimización de los parámetros del proceso teniendo en cuenta tanto las enzimas como los microorganismos al mismo tiempo (Rastogi y Shrivastava, 2017).

### 2.6.3. Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (SSCF)

Esta integración está orientada a la asimilación microbiana de todos los azúcares liberados anteriormente durante el pretratamiento y los procesos hidrolíticos de la biomasa lignocelulósica. La fermentación de hexosas y pentosas tiene lugar en el mismo fermentador, después de la etapa de hidrólisis. Usar cultivos mixtos de levaduras que puedan asimilar tanto

---

hexosas como pentosas es una opción, pero el único problema es una mayor conversión de hexosas a etanol debido a que los microorganismos que utilizan hexosa crecen más rápido que los microorganismos que utilizan pentosa. Otra variante es utilizar un solo microorganismo que pueda asimilar de manera óptima tanto hexosas como pentosas para permitir una alta conversión y rendimiento de etanol. Ventajas como bajo costo, menor tiempo de operación, menor riesgo de contaminación y menos efectos inhibitorios durante la hidrólisis enzimática han atraído una investigación cada vez mayor en esta tecnología (Kennes *et al.*, 2015; Rastogi y Shrivastava, 2017).

#### 2.6.4. Bioprosesamiento consolidado (CBP)

La conversión microbiana directa (DMC) o el bioprosesamiento consolidado (CBP) integra todas las reacciones necesarias para la transformación de biomasa en etanol. Esta estrategia difiere de otras, puesto que sólo una única comunidad microbiana lleva a cabo tanto la producción de enzimas como la fermentación, es decir, la producción de enzimas, la hidrólisis enzimática y la fermentación se llevan a cabo en un solo paso. Este proceso tiene varias ventajas, dado que no se requiere de capital para la producción de enzimas, el sustrato completo se utiliza para la liberación de azúcares. Además, los procesos enzimáticos y de fermentación son totalmente compatibles (Rastogi y Shrivastava, 2017). La tecnología CBP, una vez optimizada, reduce los costos operativos, debido a que consiste en combinar la producción de enzimas, la hidrólisis de polisacáridos y la fermentación en un solo sistema (Kennes *et al.*, 2015).

#### 2.7. Factores que afectan la conversión de biomasa en etanol

Se ha informado que varios factores afectan la eficiencia de la hidrólisis y la fermentación de la biomasa, que están relacionados principalmente con el sustrato, la enzima, el microorganismo y los parámetros del proceso. Los factores principales incluyen temperatura, pH, tiempo de incubación, carga sólida inicial y carga microbiana, y la acumulación de subproductos solubles en el caldo de fermentación.

##### 2.7.1. Temperatura

La temperatura es un factor importante cuidadosamente regulado durante la hidrólisis y la fermentación, debido a que tiene un impacto vital en la eficiencia de conversión general y los

rendimientos del producto. Durante la hidrólisis convencional del almidón, se ha informado que la temperatura óptima para la licuefacción es de 85-105° C, mientras que una sacarificación separada generalmente se realiza a 50-60° C. La hidrólisis de celulosa a menudo se realiza a una temperatura comprendida entre 45° C y 50° C (Zabed *et al.*, 2017).

La efectividad de la fermentación de etanol se basa principalmente en el crecimiento adecuado de células de levadura en el caldo que a menudo se ve afectado por la temperatura. En general, se cree que la temperatura ideal para la fermentación oscila entre 20° C y 35° C. Del mismo modo, las células de levadura se ven significativamente afectadas a temperaturas superiores a 40° C. La alta temperatura es un factor de estrés para las células de levadura, durante el cual la levadura produce proteínas de choque térmico e inactiva sus ribosomas celulares en respuesta a la condición de estrés. Por otro lado, temperaturas mucho más bajas durante la fermentación provocan tasas de crecimiento más bajas de las células y dan como resultado una tolerancia más baja al etanol (Zabed *et al.*, 2017).

### 2.7.2. pH

El pH de la solución es un factor importante que tiene efectos significativos en el proceso general, particularmente durante la hidrólisis enzimática del almidón y de la biomasa lignocelulósica, y la fermentación. La actividad de una enzima es óptima hasta un cierto nivel de pH en las suspensiones que varía según el tipo de enzimas y el proceso empleado. El pH óptimo varía de 5 a 8 para la  $\alpha$ -amilasa, 4-5 para la glucoamilasa y 4.5-5 para la celulasa.

El pH es uno de los factores clave para la fermentación de etanol que tiene un efecto directo sobre las células de levadura y los procesos celulares. En particular, la concentración de protones ( $H^+$ ) en los medios de fermentación por encima o por debajo de cierto nivel puede cambiar la carga total en la membrana plasmática, afectando así la permeabilidad de algunos nutrientes esenciales en las células.

El intervalo de pH óptimo en el proceso de fermentación puede variar según el sustrato utilizado y la cepa de microorganismos. Se ha informado que el intervalo de pH óptimo para *S. cerevisiae* para la fermentación de etanol es 4-5, mientras que un intervalo de pH de 5-6, *Z. mobilis* obtiene el mejor rendimiento de etanol (Zabed *et al.*, 2017).



### 2.7.3. Tiempo de incubación

El tiempo de incubación es otro factor que afecta significativamente la hidrólisis enzimática y la fermentación. En general, el tiempo de incubación extremadamente corto o alto afecta los rendimientos de azúcar y etanol. Durante la hidrólisis enzimática, las enzimas generalmente se difunden en la suspensión y obtienen acceso a las moléculas de almidón, que luego producen la conversión de polímeros de carbohidratos en azúcares fermentables.

El proceso de conversión general requiere un tiempo de reacción apropiado, donde un período de incubación corto interrumpe el proceso de hidrólisis y da como resultado la conversión incompleta de carbohidratos. Sin embargo, el rendimiento de azúcar muestra una meseta después de un cierto tiempo de hidrólisis. Esto podría suceder debido a una inhibición del producto final a las enzimas después de un cierto tiempo. Se ha informado que el período ideal de fermentación para la producción de etanol es de 48 a 72 h (Zabed *et al.*, 2017).

### 2.7.4. Concentración inicial del sustrato

La concentración inicial de sustrato (azúcar, almidón, celulosa y hemicelulosa) afecta significativamente el proceso general de conversión química y bioquímica. Se ha informado que la concentración inicial de sustrato tiene efectos directos sobre la tasa de hidrólisis y fermentación, así como el crecimiento de las células de levadura. Durante la hidrólisis enzimática del almidón, la celulosa y la hemicelulosa, las cantidades excesivas de sustratos en la suspensión pueden inhibir el sustrato de las enzimas, lo que puede dar como resultado una conversión incompleta de carbohidratos y disminuir el rendimiento de azúcar. La alta concentración de sustrato crea un problema particular durante la cocción convencional y la licuefacción de materiales con almidón que gelatiniza el almidón y aumenta la viscosidad de la suspensión, dificultando la mezcla y el bombeo de los contenidos. Además, el aumento de la viscosidad crea un problema en la dispersión del almidón y de las enzimas adecuadamente y da como resultado la conversión incompleta del almidón.

La relación real entre la concentración inicial del sustrato y la velocidad de fermentación es bastante más compleja. En general, la tasa de fermentación aumenta con el aumento de la concentración de azúcar hasta cierto nivel. Pero la concentración de azúcar excesivamente alta excede la capacidad de absorción de azúcar de las células que resulta en un estado estable en la fermentación (Zabed *et al.*, 2017).

### 2.7.5. Carga microbiana y acumulación de subproductos

La concentración de inóculo de levadura u otros microorganismos fermentadores no tiene una influencia significativa en la concentración final de etanol, pero afecta significativamente la tasa de consumo de azúcar y la productividad del etanol. El aumento de la concentración celular dentro de cierto intervalo reduce el tiempo de fermentación debido al rápido crecimiento de las células y la conversión inmediata de azúcares alimentados en etanol. Durante la fermentación de etanol, algunos subproductos solubles como el ácido láctico, el ácido acético y el glicerol se producen como resultado de las actividades metabólicas de las levaduras y las bacterias contaminantes. Los ácidos láctico y acético generalmente se producen debido al metabolismo de los carbohidratos por las bacterias contaminantes del ácido láctico. La producción de ácido láctico durante la fermentación no es deseada, puesto que afecta el crecimiento de la levadura y el rendimiento de etanol. El glicerol es otro subproducto producido por las células de levadura o incluso por las bacterias contaminantes durante la fermentación. Aunque la producción de glicerol es parte del metabolismo del azúcar por las levaduras, no es deseable una alta acumulación de glicerol en el caldo de fermentación. Debido a que la producción de glicerol es un proceso intensivo en energía y afecta el rendimiento final de etanol (Zabed *et al.*, 2017).

## Capítulo 3. METODOLOGÍA

### 3.1. Caracterización química de la semilla de aguacate

#### 3.1.1. Preparación de la muestra

La semilla de aguacate tipo Hass fue proporcionada por la empresa SIMPLOT (Morelia, Michoacán, México). Estas semillas se consideraron como residuos después de que la pulpa del aguacate se usara con fines alimenticios. Una vez recolectada la semilla de aguacate, se lavó con agua corriente para eliminar los residuos de pulpa, se dividió en partes pequeñas y se secó en horno a 80 °C por 24 horas. La semilla se molió en un molino de uso general tipo 1RF3 054-4YC31 con una potencia de 0.373 kW para obtener partículas que pasaron por un tamiz de malla 40 (425  $\mu\text{m}$ ) y se retuvieron en tamiz de malla 60 (250  $\mu\text{m}$ ). La muestra se guardó en un recipiente hermético.

#### 3.1.2. Técnicas analíticas

La caracterización química de la semilla de aguacate se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL). Los componentes analizados fueron el contenido de humedad (Sluiter *et al.*, 2008a), extractivos (Sluiter *et al.*, 2008b), carbohidratos estructurales y lignina (Sluiter *et al.*, 2012) y cenizas (Sluiter *et al.*, 2008c). En la Tabla 3.1 se enlistan los nombres de los procedimientos junto con la identificación del reporte técnico asociado.

**Tabla 3.1. Procedimientos empleados en la caracterización de la semilla de aguacate.**

Descripción	Reporte técnico
Determinación de sólidos totales en biomasa y sólidos disueltos totales en muestras de proceso líquido.	NREL/TP-510-42621
Determinación de extractivos en biomasa.	NREL/TP-510-42619
Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa.	NREL/TP-510-42618
Determinación de cenizas en biomasa.	NREL/TP-510-42622

## 3.2. Producción de bioetanol

### 3.2.1. Pretratamiento

A la semilla de aguacate se le eliminaron los residuos de la pulpa del aguacate a través de un lavado con agua corriente, se trituró y se secó a 80 °C por 24 h en horno para llevar a cabo el proceso de molienda como pretratamiento físico (Aditiya *et al.*, 2016). Se realizó la molienda de la semilla en un molino de uso general tipo 1RF3 054-4YC31 con una potencia de 0.373 kW, en el cual se obtuvo un polvo con diferentes tamaños de partícula. Se tamizó el polvo obtenido para recuperar la fracción retenida entre la malla 20 (850  $\mu\text{m}$ ) y la malla 80 (180  $\mu\text{m}$ ). La Figura 3.1 representa esquemáticamente el pretratamiento físico realizado. La muestra fue almacenada en un recipiente hermético a temperatura ambiente.

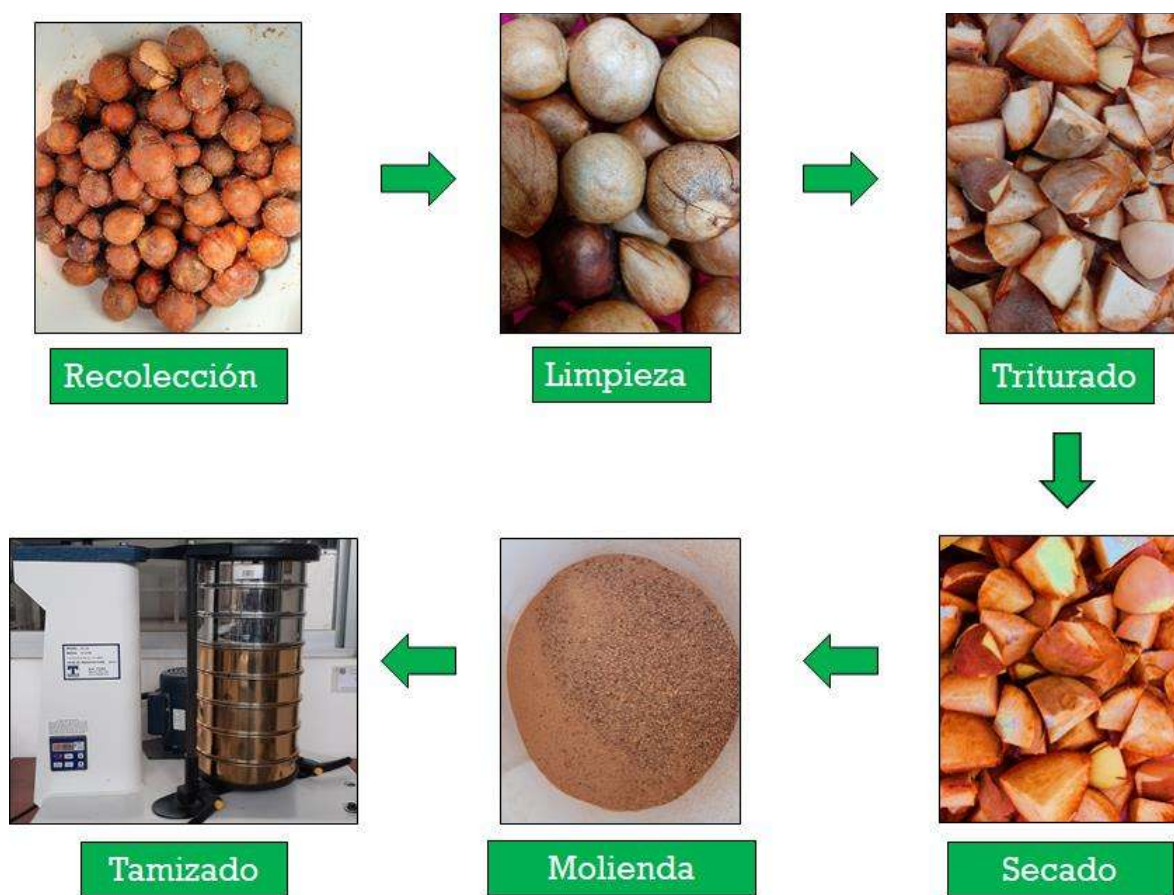


Figura 3.1. Pretratamiento realizado a la semilla de aguacate.

### 3.2.2. Extracción de almidón

100 g de semilla triturada fue mezclada con 300 ml de agua, la mezcla se molió en una licuadora convencional (Oster, 6805-RG0), se filtró a través de una tela y se dejó decantar durante 24 horas. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min con 100 ml de etanol al 95% y nuevamente se desechó el sobrenadante. La pasta resultante se secó en un horno a 60 °C durante 24 h, se llevó a un desecador y se pesó el almidón obtenido (Souza *et al.*, 2018). La Figura 3.2 muestra el proceso de extracción de almidón. La extracción de almidón se realizó por triplicado, empleando por separado semillas de aguacate frescas y secas. El almidón obtenido fue molido en mortero y almacenado en un recipiente hermético a temperatura ambiente.



Figura 3.2. Proceso de extracción de almidón de semilla fresca de aguacate.

### 3.2.3. Hidrólisis

Debido al alto costo de las enzimas para hidrolizar el almidón, se hizo una comparación de la hidrólisis ácida partiendo de semilla molida y almidón extraído, utilizando como control almidón comercial (MAIZENA). El experimento de esta etapa se realizó de la siguiente manera: se preparó una mezcla de 100 g con una carga de almidón del 10.72% p/p y una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 2% p/p. La reacción se llevó a 87 °C durante 12 horas a 100 rpm en matraces de 250 ml sumergidos en un baño de agua utilizando un criotermostato de la marca

JULABO, modelo CORIO CP 200F. En la Figura 3.3 se ilustran los cambios debidos al proceso de hidrólisis ácida.

A nivel planta piloto, se utilizó un tanque cilíndrico de 40 L de acero inoxidable como reactor, el cual cuenta con una chaqueta que permite el calentamiento con vapor, además cuenta con un agitador de paletas de revolución variable y controlador de temperatura. Se trabajó con una mezcla de reacción de 40 kg, utilizando una carga de almidón extraído del 15% p/p y el resto con una solución de  $H_2SO_4$  al 2% p/p, se mantuvo la temperatura a 87 °C y 60 rpm durante 12 horas de reacción.

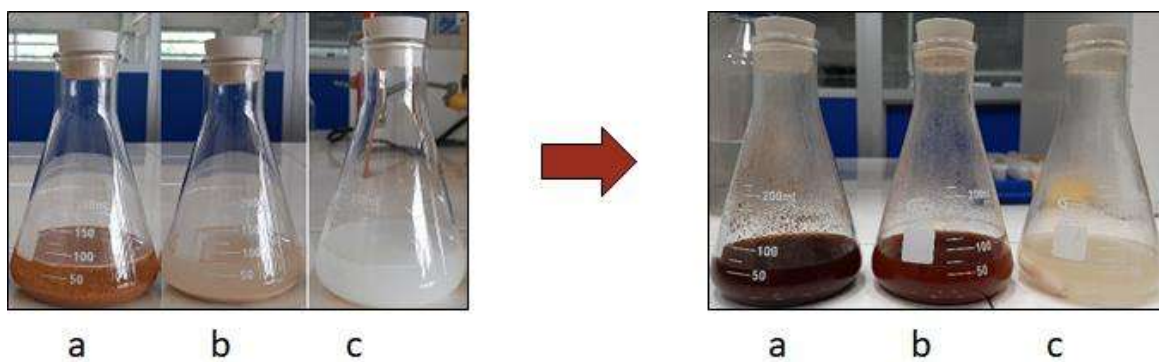


Figura 3.3. Hidrólisis ácida: a) semilla molida, b) almidón extraído y c) almidón comercial.

#### 3.2.3.1. Cuantificación de azúcares reductores

La medición de la concentración de azúcares reductores se realizó mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). El método se llevó a cabo de la siguiente manera: se preparó una curva de calibración de concentraciones conocidas de glucosa en un intervalo de 0 a 2% en masa. Las muestras del hidrolizado fueron preparadas con una dilución 1:100, se tomaron 500  $\mu$ L de cada una de las muestras, se les añadió 500  $\mu$ L de reactivo DNS previamente preparado (Ghose, 1987) se agitaron en vórtex y se llevaron a un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, se dejaron enfriar durante 10 minutos en un baño de agua a temperatura ambiente. Se añadieron 10 mL de agua destilada a cada una de las muestras y se agitaron. Se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Jenway 7305). La Figura 3.4 muestra los cambios de coloración de la aplicación del método.

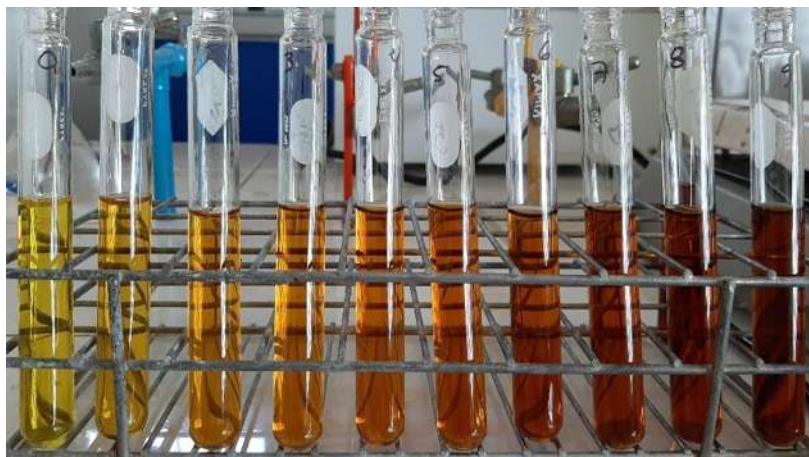


Figura 3.4. Aplicación del método DNS para la identificación de azúcares reductores.

#### 3.2.4. Fermentación

En esta etapa se utilizó como sustrato la parte líquida del hidrolizado del almidón extraído. 95 ml de hidrolizado filtrado a través de una tela fue neutralizado con 5 ml de una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 14.6% v/v a un pH de  $5.0 \pm 0.1$ , utilizando un potenciómetro de la marca Fisher Scientific, modelo AB 15; 0.5 g de levadura liofilizada fue hidratada en 2.5 ml de medio YPD a 35 °C durante 30 min y se inoculó directamente en el sustrato. La fermentación se realizó por duplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml a 30 °C y 50 rpm utilizando una parrilla de agitación magnética y un criotermostato de la marca JULABO, modelo CORIO CP 200F. Se monitoreó el consumo de glucosa y la producción de etanol durante 48 h. Se utilizaron 2 tipos de levadura *S. cerevisiae*; la cepa Fermentum-Vocatus, proporcionada por RIGASA y la cepa DistilaMax® DS, proporcionada por LALLEMAND BIOFUELS & DISTILLED SPIRITS. En la Figura 3.5 se ilustran los cambios ocurridos durante la fermentación.

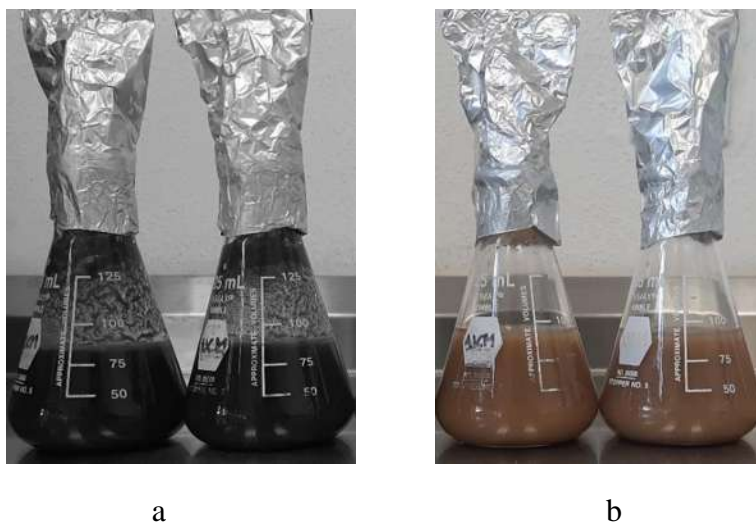


Figura 3.5. Ilustración de la etapa de fermentación: a) condición inicial y b) condición final. A nivel planta piloto la fermentación se realizó en el mismo tanque de hidrólisis. El hidrolizado fue neutralizado con 1.89 L de una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 14.6% v/v a un pH de  $5.0 \pm 0.1$ . En este caso, 200 g de levadura liofilizada de la cepa DistilaMax® DS fue hidratada en 1 L de medio YPD a  $30^\circ\text{C}$  en un recirculador Fisher Scientific modelo Isotemp 3016HD durante 30 min y se inoculó directamente en el sustrato. El seguimiento de la reacción se realizó durante 24 h cuantificando el consumo de glucosa y la producción de etanol.

#### 3.2.4.1. Cuantificación del consumo de glucosa y producción de etanol

El análisis de la glucosa consumida y el etanol producido durante la fermentación se hizo por HPLC, mediante un cromatógrafo de la marca Varian modelo ProStar 410 con un detector de infrarrojo modelo 350 y una columna Rezex ROA-Organic Acid+ de  $300 \times 7.80$  mm a  $85^\circ\text{C}$ , se utilizó una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 mN como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/minuto. Cada una de las muestras fue centrifugada y el sobrenadante se preparó con una dilución 1:10, se tomó 1 mL de muestra y se pasó por un filtro de  $0.2 \mu\text{m}$  en viales para el análisis por cromatografía. Se realizó una curva de calibración para identificar los componentes de la fermentación que incluyen glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético y etanol.



### 3.3. Diagrama de Flujo Lógico de la Investigación

Esta investigación se realiza siguiendo una secuencia lógica para alcanzar los objetivos planteados, en la Figura 3.6 se plantea un diagrama de flujo lógico con las principales etapas a seguir en esta investigación. De manera general, se comenzó con la caracterización de la semilla de aguacate donde se le realizaron los análisis químicos de acuerdo con los protocolos establecidos por la NREL. Después, se molió la semilla de aguacate como pretratamiento y se extrajo el almidón. El almidón contenido en la semilla molida y el almidón extraído se hidrolizaron para obtener la mayor cantidad de glucosa. Finalmente, se fermentó la glucosa obtenida en el hidrolizado del almidón extraído para producir el bioetanol.

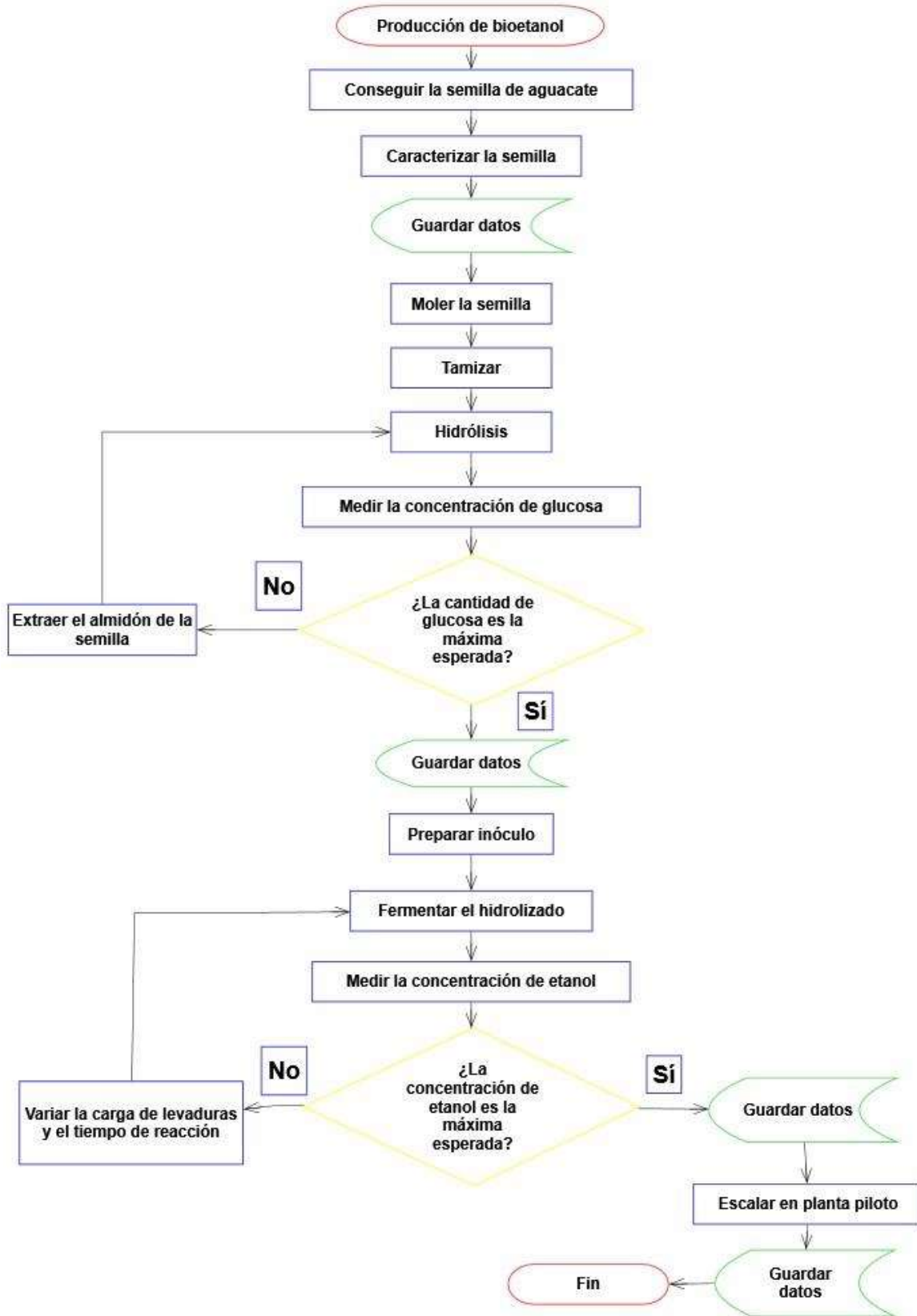


Figura 3.6. Diagrama de flujo de la metodología de esta investigación.

## Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización

Los resultados de la caracterización química de la semilla de aguacate son presentados en la Tabla 4.1., los cuales están en el rango reportado en la revisión bibliográfica realizada por (García *et al.*, 2020). La metodología aplicada en la caracterización química puede afectar los valores de los componentes, tal es el caso de los datos encontrados en (Dávila *et al.*, 2017) donde se utilizó el procedimiento reportado en (Han y Rowell, 1997) para la caracterización química de fibras, se observa que los valores de la celulosa y hemicelulosa difieren con los datos experimentales.

**Tabla 4.1. Caracterización química de la semilla de aguacate (%masa).**

Componente	Experimental	(García <i>et al.</i> , 2020)	(Dávila <i>et al.</i> , 2017)
Humedad	11.69 ± 0.04	-----	7.02 ± 0.18
Extractivos	25.92 ± 1.31	21.0 - 35.9	35.95 ± 1.95
Celulosa	53.62 ± 1.72	6.5 - 40.9	6.48 ± 0.38
Hemicelulosa	4.89 ± 0.14	3.0 - 47.9	47.88 ± 2.14
Lignina	3.23 ± 0.63	1.8 - 15.8	1.79 ± 0.04
Cenizas	0.41 ± 0.02	0.9 - 2.9	0.87 ± 0.06
Total	99.76	-----	100

En los datos experimentales se observa que la semilla de aguacate tipo Hass tiene alrededor del 58% de carbohidratos estructurales como materia prima para la obtención de azúcares, en este caso glucosa, principalmente. La celulosa se cuantificó por el contenido de glucosa en forma de glucanos y la hemicelulosa en forma de xilanos y arabinanos. Después de la etapa de extracción de almidón, se caracterizaron los residuos del material lignocelulósico, en los cuales se aprecia que el almidón contenido en la semilla está cuantificado en la parte de la celulosa (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2. Caracterización química de los residuos de la extracción de almidón (%masa).**

Componente	Residuos de extracción
Humedad	7.46 ± 0.17
Extractivos	19.97 ± 0.91
Celulosa	41.87 ± 0.76
Hemicelulosa	14.04 ± 0.88
Lignina	10.8 ± 1.63
Cenizas	0.36 ± 0.01
Total	94.50

#### 4.2. Extracción de almidón

Se obtuvo un rendimiento de extracción de almidón de  $16.85 \pm 0.34\%$  para semillas secas y  $29.79 \pm 3.18\%$  para semillas frescas. Esta diferencia se atribuye al proceso de secado, el cual se ha reportado que dificulta su separación (Rivera-González *et al.*, 2019). El valor obtenido empleando semillas frescas se encuentra en el rango reportado de 27.54-29.80 % de almidón, en la caracterización química de la semilla de aguacate en (Lacerda *et al.*, 2013).

#### 4.3. Hidrólisis

Se encontró que la concentración de azúcares reductores aumenta con el tiempo de reacción, como se ilustra en la Figura 4.1. La concentración máxima de azúcares reductores fue de  $10.49 \pm 0.97$  %p/p,  $10.29 \pm 0.76$  %p/p y  $10.51 \pm 0.94$  %p/p para semilla molida, almidón extraído y almidón comercial, respectivamente. Esto representa un porcentaje de almidón hidrolizado del 88.12% para la semilla molida, 88.22% para el almidón comercial, mientras que para el almidón extraído se tuvo un porcentaje del 86.38%.

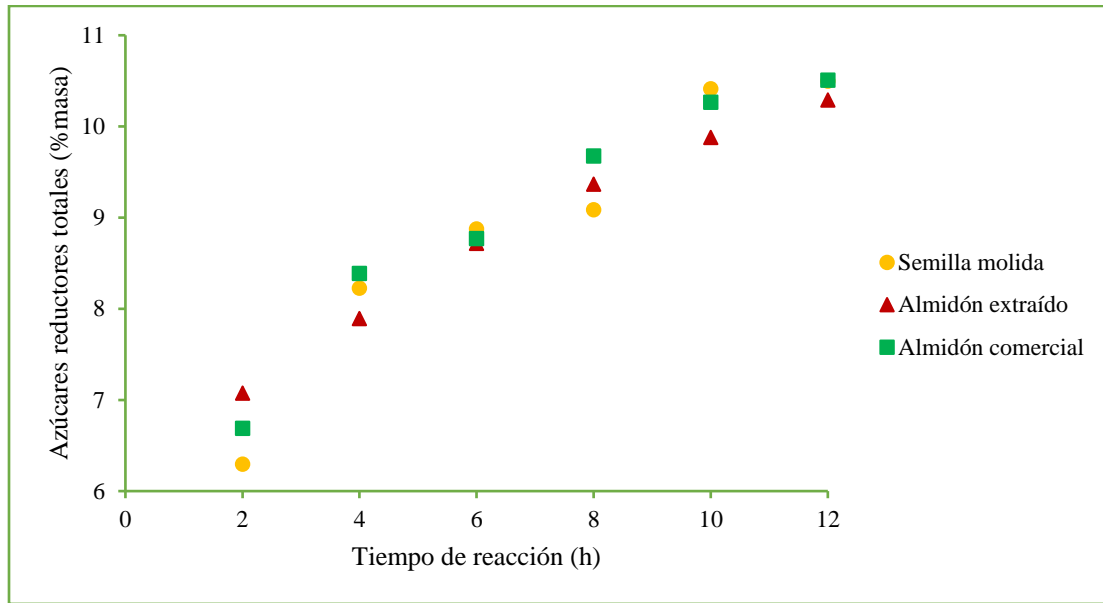


Figura 4.1. Concentración de azúcares reductores en función del tiempo de reacción.

En la Tabla 4.3 se muestran las concentraciones de los diferentes azúcares identificados por cromatografía de cada una de las corridas.

**Tabla 4.3. Identificación de azúcares reductores obtenidos por HPLC.**

	Concentración de azúcares reductores (g/L)		
	Semilla molida	Almidón extraído	Almidón comercial
Glucosa	69.28 ± 2.04	84.32 ± 0.92	95.01 ± 1.53
Xilosa	20.22 ± 1.08	3.51 ± 0.55	0.00
Arabinosa	2.71 ± 0.21	0.64 ± 0.19	0.00
Total	92.21	88.47	95.01

Los resultados indican que la hidrólisis del almidón es 1.74% mejor en la semilla molida y muy similar al almidón comercial, observándose que la etapa de extracción del almidón no es necesaria; es decir, la cantidad total de azúcares reductores es similar en cada uno de los casos; sin embargo, la proporción de glucosa, xilosa y arabinosa es diferente, indicando que en el proceso de hidrólisis, parte de la hemicelulosa contenida en la semilla de aguacate fue hidrolizada a azúcares reductores (xilosa y arabinosa). Si la finalidad es obtener la mayor cantidad de glucosa monomérica para ser fermentada por levaduras a etanol, se tendrá que

elegir como materia prima el almidón extraído, de lo contrario, se puede utilizar el hidrolizado de la semilla molida como sustrato y usar cultivos mixtos de microorganismos que puedan asimilar tanto hexosas como pentosas o utilizar un solo microorganismo que asimile ambos azúcares que permita obtener un alto rendimiento hacia etanol.

Debido a que en este trabajo se utilizó *S. cerevisiae*, como organismo fermentador de la glucosa obtenida en la etapa de hidrólisis, se eligió como sustrato el hidrolizado de almidón extraído, puesto que es la materia prima que genera la mayor proporción de glucosa con respecto a los demás azúcares. Además, se aumentó la carga de almidón extraído a un 15% para aumentar la cantidad de glucosa en el hidrolizado, obteniéndose  $109.79 \pm 1.14$  g/L de glucosa,  $0.99 \pm 0.06$  g/L de xilosa y  $0.38 \pm 0.01$  g/L de arabinosa.

A nivel planta piloto se hizo una sola corrida, utilizando almidón extraído, en la cual se mantuvo la carga de almidón del 15% p/p, una solución de  $H_2SO_4$  del 2% p/p y un tiempo de hidrólisis de 12 h (tiempo en el cual se obtuvo la mayor cantidad de glucosa). En la Figura 4.2 se ilustra el perfil de concentración de glucosa obtenida a lo largo del tiempo de reacción.

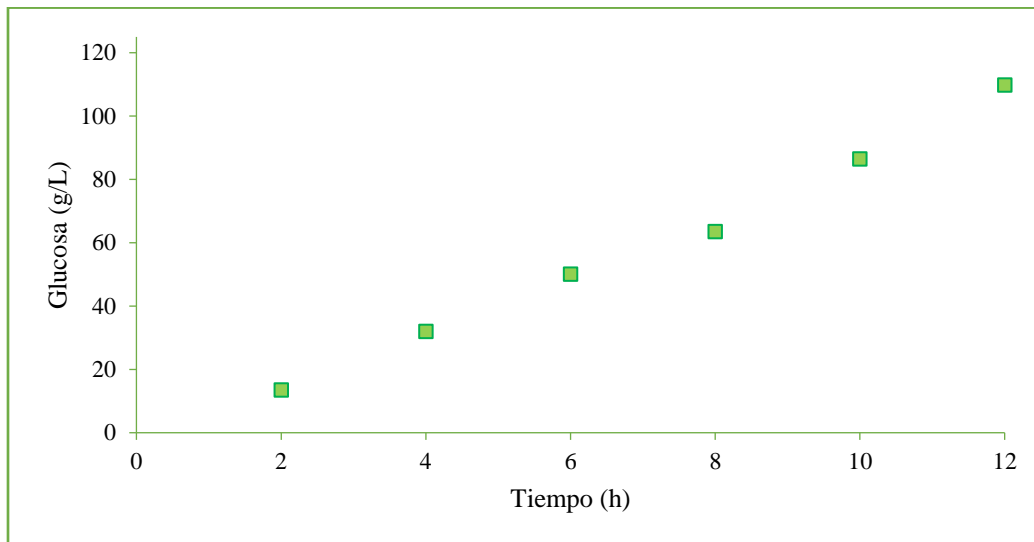


Figura 4.2. Concentración de glucosa en función del tiempo de reacción en planta piloto.

La concentración de azúcares al final de la reacción fue de 109.86 g/L de glucosa, 1.87 g/L de xilosa y 0.30 g/L de arabinosa. El valor de la glucosa coincide con los datos obtenidos a nivel matraz, es un valor esperado debido a que se mantuvieron constantes las variables involucradas: la carga de almidón, la concentración del ácido, la temperatura, el tiempo de reacción y sólo se disminuyó la velocidad de agitación, debido al tipo de agitador con el que

cuenta la planta piloto no era necesario trabajar a más de 60 rpm porque se generaba vórtice en el tanque de reacción.

A continuación, se comparan las condiciones propuestas de reacción con los valores reportados en estudios similares. En un estudio previo se ha informado que la hidrólisis ácida del almidón contenido en el banano (plátano) se lleva a cabo con  $H_2SO_4$ , una temperatura de  $100^\circ C$  y 10 horas de reacción donde se tiene la mayor liberación de azúcares (Velásquez *et al.*, 2010); en contraste, el proceso enzimático reportado para la producción de bioetanol a partir del almidón de maíz establece que utilizan dos niveles de temperaturas y dos tipos de enzimas, primero se utiliza  $\alpha$ -amilasa a  $90^\circ C$  en el proceso de licuefacción y después a  $60^\circ C$  con glucoamilasa donde se lleva a cabo la sacarificación (McAloon *et al.*, 2000 ; Bušić *et al.*, 2018). Las condiciones propuestas tienen similitud en magnitud con las variables de operación de ambos procesos. En la Tabla 4.4 se resumen los valores comparativos de los distintos procesos.

**Tabla 4.4. Comparación de las condiciones en la hidrólisis de almidón.**

Variable	Experimental	(Velásquez <i>et al.</i> , 2010)	(McAloon <i>et al.</i> , 2000 ; Bušić <i>et al.</i> , 2018)
Tipo de hidrólisis	Ácida $H_2SO_4$ al 2% m/m	Ácida $H_2SO_4$	Enzimática ( $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa)
Temperatura ( $^\circ C$ )	87	100	90 (licuefacción) y 60 (sacarificación)
Tiempo de reacción (h)	12	10	8

#### 4.5. Fermentación

Los promedios de cada una de las fermentaciones, utilizando como sustrato el hidrolizado de almidón extraído, son mostradas en las Figuras 4.3 y 4.4, en donde se observan las curvas del consumo de glucosa y la producción de etanol a nivel matraz.

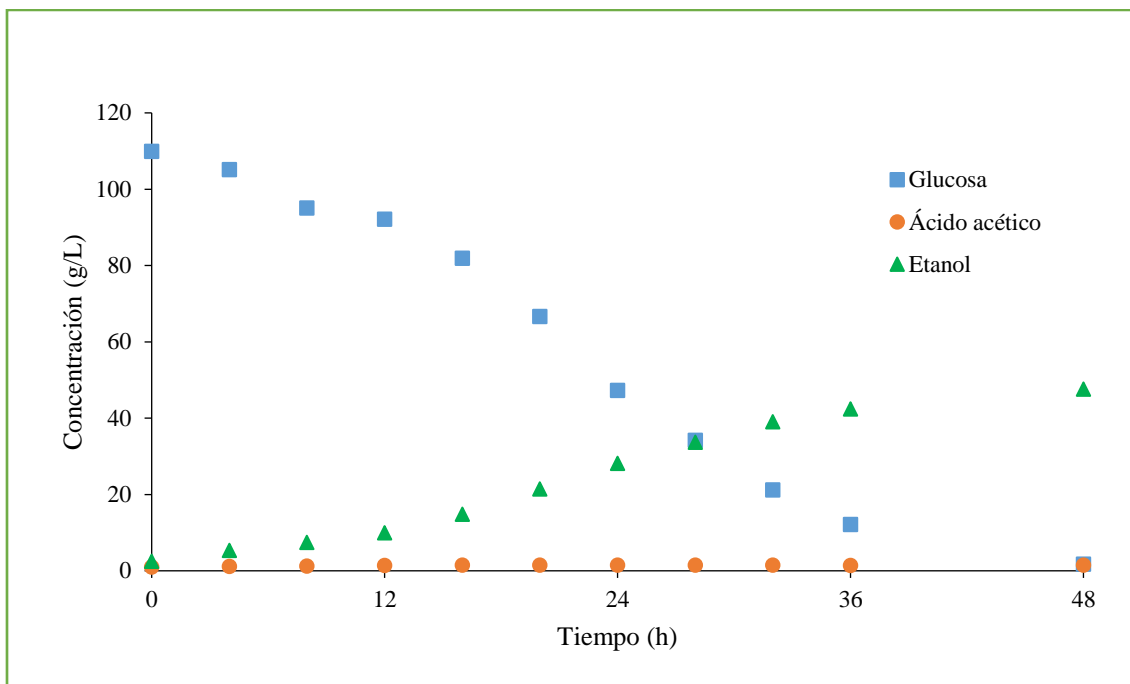


Figura 4.3. Perfil de consumo de glucosa y producción de etanol utilizando la cepa *Fermentum-Vocatus*.

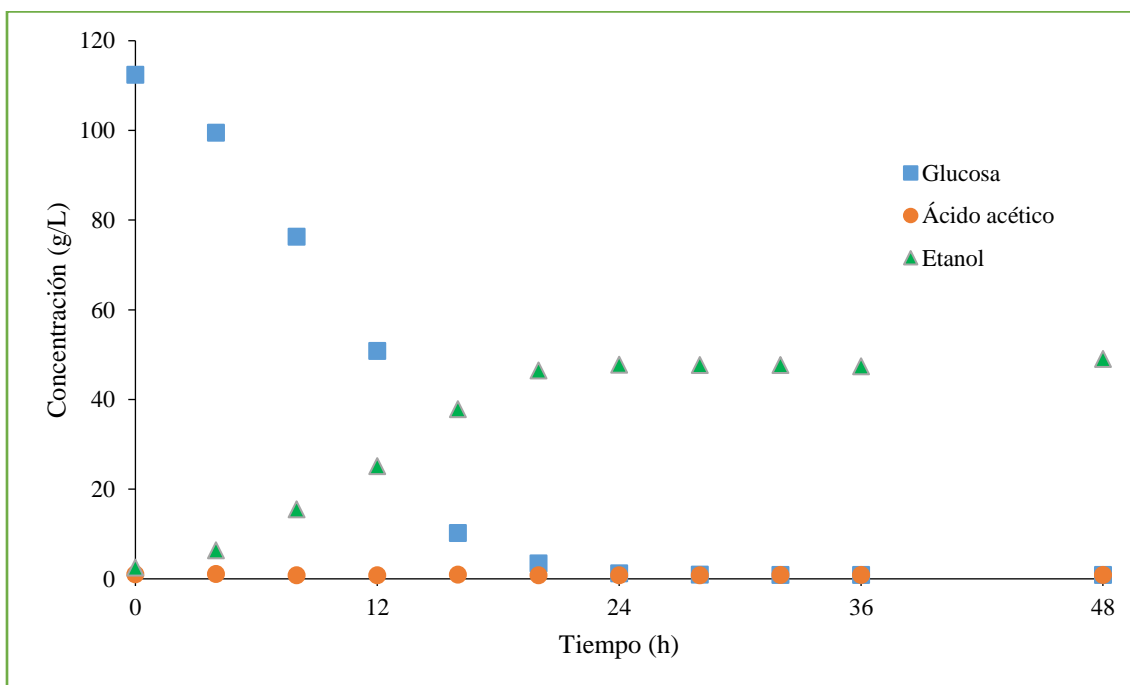


Figura 4.4. Perfil de consumo de glucosa y de producción de etanol utilizando la cepa *DistilaMax® DS*.



En la tabla 4.5 se muestra una comparación de los valores iniciales y finales de cada uno de los componentes identificados por HPLC en las fermentaciones.

**Tabla 4.5. Cuantificación de los componentes en la etapa de fermentación por HPLC.**

Componente	Concentración (g/L)			
	Cepa Fermentum-Vocatus		Cepa DistilaMax® DS	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Glucosa	109.95 ± 1.34	1.79 ± 0.73	112.44 ± 3.10	0.88 ± 0.05
Xilosa	1.05 ± 0.08	1.99 ± 0.02	0.98 ± 0.06	2.13 ± 0.23
Arabinosa	0.38 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.53 ± 0.11
Ácido acético	1.00 ± 0.03	1.51 ± 0.01	1.00 ± 0.05	0.88 ± 0.04
Etanol	2.50 ± 0.04	47.61 ± 1.79	2.52 ± 0.07	49.05 ± 2.13

Se identificaron pequeñas cantidades de otros componentes que provienen de la hidrólisis ácida de la parte hemicelulósica que se arrastran en la extracción de almidón; en este caso la xilosa, la arabinosa y el ácido acético no intervienen en la reacción. Además, es importante mencionar que el hidrolizado sólo se ajustó al pH requerido por las levaduras y no se añadieron componentes adicionales como sales o elementos traza que promovieran la fermentación.

Al inicio de la fermentación se identificó una pequeña cantidad de etanol en ambas corridas que proviene de la cantidad inicial inoculada y al error sistemático asociado en la cuantificación de los componentes. La fermentación fue seguida durante 48 h, tiempo en el cual se observó el agotamiento de la glucosa en la corrida donde se empleó la cepa Fermentum-Vocatus. En este tiempo el rendimiento de glucosa hacia etanol fue de  $84.75 \pm 2.21\%$ , mientras que el rendimiento en donde se utilizó la cepa DestilaMax® DS fue de  $85.37 \pm 2.66\%$ . Es evidente que en la Figura 4.4, la glucosa se termina en un tiempo de 24 h, es por ello que en este tiempo se hizo la comparación de los parámetros cinéticos, éstos se muestran en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6. Comparación de los parámetros cinéticos entre las dos cepas.**

Parámetro	Fermentum-Vocatus	DistilaMax®
$Y_{p/s}$ (g <sub>etanol</sub> /g <sub>glucosa</sub> )	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.02
Q (g <sub>etanol</sub> /Lh)	1.07 ± 0.09	1.89 ± 0.06

Ambas levaduras obtienen el mismo rendimiento de sustrato en producto, es decir, la cantidad consumida de glucosa en 24 h es proporcional al etanol producido en ambos casos. El valor teórico del rendimiento es de 0.51, indicando que no toda la glucosa se transformó en etanol. Para el caso de la productividad volumétrica, la levadura DistilaMax® DS es aproximadamente el doble del valor de la levadura Fermentum-Vocatus, esto indica que la velocidad de producción de etanol utilizando levadura DistilaMax® DS requiere de 24 h para obtener la mayor concentración de etanol, mientras que la levadura Fermentum-Vocatus requiere de 48 h; esta afirmación se puede apreciar en las curvas de producción de etanol (Figuras 4.3 y 4.4). La diferencia encontrada en ambas levaduras se atribuye a que el tiempo de anaquel de la levadura Fermentum-Vocatus había expirado, provocando que la actividad de esta cepa disminuyera, por esta razón se seleccionó la cepa DistilaMax® DS para ser utilizada en la fermentación a escala piloto.

A continuación se comparan las condiciones de fermentación con los valores reportados en un estudio previo, donde se ha informado que la fermentación de 112.44 g/L de glucosa proveniente de la hidrólisis ácida de desechos de fruta, se lleva a cabo con una concentración de *S. cerevisiae* de 6 g/L durante 96 h, tiempo en el cual se obtiene una concentración de etanol de 41.41 g/L (Sugandi *et al.*, 2019), se puede apreciar que en dicho estudio se utilizaron condiciones muy similares a las propuestas experimentalmente, sin embargo, el tiempo de fermentación es 4 veces mayor, esto se atribuye a que la cepa de *S. cerevisiae* es diferente y que se preparó un inóculo en medio mineral para iniciar la fermentación.

En la planta piloto, la fermentación se realizó en el mismo tanque de hidrólisis, donde se utilizó una carga del 15% p/p de almidón extraído. La curva de consumo de glucosa y la producción de etanol se ilustra en la Figura 4.5.

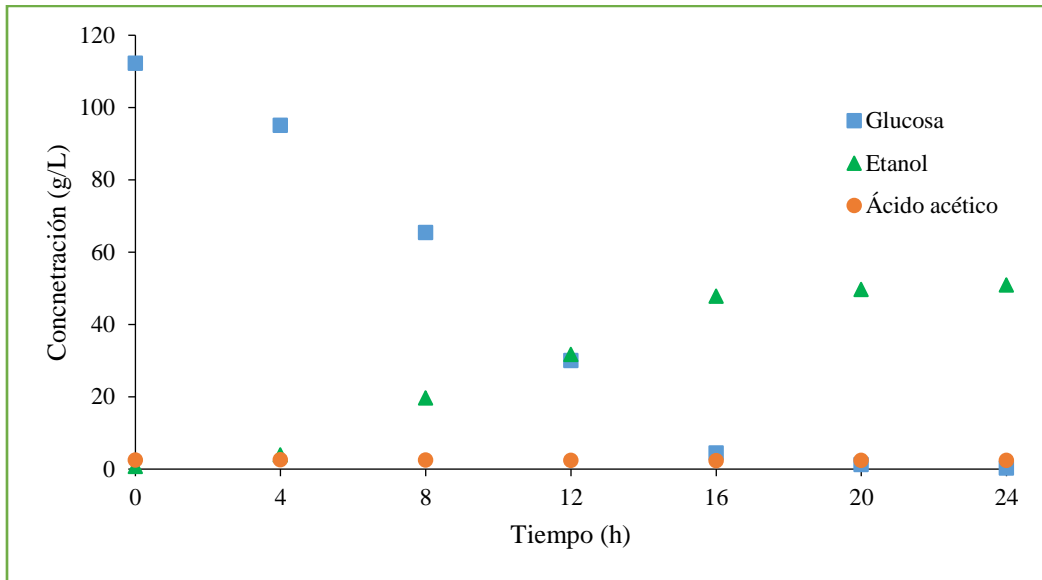


Figura 4.5. Curvas de consumo de glucosa y producción de etanol utilizando la cepa DistilaMax® DS en planta piloto.

El tiempo de la corrida duró 24 h, tal como se predijo a nivel matraz. Los componentes identificados mediante HPLC en la fermentación a escala piloto se muestran en la Tabla 4.7.

**Tabla 4.7. Cuantificación de los componentes por HPLC de la fermentación en planta piloto.**

Componente	Concentración (g/L)	
	Inicial	Final
Glucosa	112.34	0.35
Xilosa	1.54	2.09
Arabinosa	0.30	0.38
Ácido acético	2.53	2.45
Etanol	0.74	50.94

El rendimiento de glucosa hacia etanol fue de 88.73%, el cual es un valor esperado que coincide con el rendimiento obtenido a nivel matraz. En este caso se mantuvieron constantes los parámetros involucrados en la fermentación: la temperatura, la agitación, la concentración de células inoculadas y el tiempo de reacción. Se obtuvo un rendimiento de sustrato a producto de 0.45 g de etanol/g de glucosa y una productividad volumétrica de etanol de 2.09

g/Lh, estos parámetros cinéticos son muy similares a los obtenidos en las fermentaciones realizadas en matraz con la misma levadura.

En la Figura 4.6 se ilustra la metodología propuesta para la producción de bioetanol a partir de la semilla de aguacate, en donde se incluyen las etapas principales y los valores de las condiciones de operación.

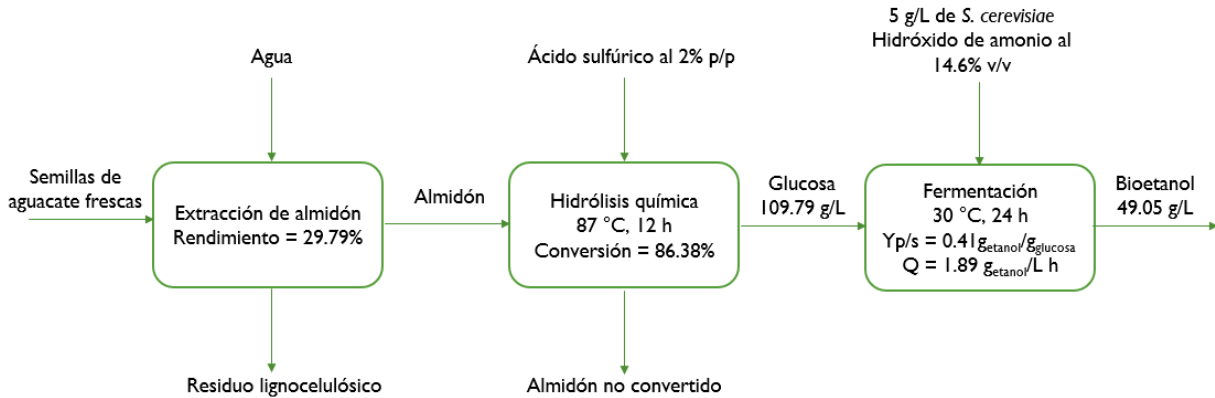


Figura 4.6. Diagrama de bloques del proceso de producción de bioetanol a las condiciones de operación propuestas.

#### 4.6. Evaluación de costos en la producción de bioetanol

Se planteó un análisis económico preliminar de los costos de producción de bioetanol a partir de la semilla de aguacate utilizando como referente las condiciones reportadas para el sorgo dulce, el cual es una materia prima que contiene almidón y presenta un rendimiento de 100 L de etanol por cada tonelada de sorgo dulce (SENER, 2014). En el caso de la semilla de aguacate, utilizando los rendimientos experimentales, se obtienen 158 L de etanol por cada tonelada de semillas de aguacate frescas. La Tabla 4.8 presenta la información de los costos de producción.

Tabla 4.8. Costo de producción por litro de etanol a partir de la semilla de aguacate.

Concepto	pesos/litro
Semilla de aguacate	6.33
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 98%	0.87
NH <sub>4</sub> OH al 30%	1.60
Levadura	20.41
Otros insumos	0.24
Mano de obra	0.46
Costos de producción	0.30
Gastos de operación	0.02
Amortizaciones	0.39
Otros gastos	0.18
<b>Total</b>	<b>30.80</b>

El costo de producción estimado es aproximadamente 4.5 veces mayor comparado al costo de producción de etanol a partir del sorgo dulce (6.57 pesos/L) y aproximadamente el triple para el sorgo grano (10.88 pesos/L) (SENER, 2014), lo cual hace evidente que no sea un costo de producción competitivo. Se aprecia que la levadura es el factor que tiene mayor impacto en el costo de producción, es por ello que se debe de reducir la concentración de levaduras en la etapa de fermentación para disminuir el costo y obtener un producto que sea económicamente viable.

## CONCLUSIONES

La búsqueda de fuentes potenciales de biomasa con alto contenido de carbohidratos es esencial para la producción de bioetanol. La propuesta de utilizar la semilla de aguacate, representa una fuente potencial para la producción de bioetanol, contribuyendo al aprovechamiento de los residuos generados por el consumo de este fruto y además se valoriza la semilla al obtener un compuesto con valor agregado.

La caracterización química de la semilla de aguacate confirmó la presencia de almidón para la producción de bioetanol de primera generación, además la semilla de aguacate cuenta con una parte de celulosa y hemicelulosa que pueden ser aprovechadas para la obtención de pentosas y hexosas, las cuales pueden ser asimiladas por microorganismos y aumentar la producción hacia etanol.

Al evaluar la hidrólisis química del almidón, se obtuvo una mayor cantidad de glucosa liberada en el hidrolizado de almidón extraído; por esta razón, la ruta de proceso requirió de la etapa de extracción en lugar de realizar el pretratamiento físico a la semilla. En ambos hidrolizados se tiene la ventaja de que no hubo formación de furfural y HMF, compuestos inhibidores en la fermentación de azúcares.

En la fermentación se obtuvo un rendimiento de glucosa hacia etanol a nivel matraz de  $0.41 \pm 0.02 \text{ g}_{\text{glucosa}}/\text{g}_{\text{etanol}}$  y una productividad volumétrica de  $1.89 \pm 0.06 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{Lh}$ , estos valores son muy similares a los obtenidos a nivel planta piloto, en donde se obtuvo un rendimiento de  $0.45 \text{ g}_{\text{glucosa}}/\text{g}_{\text{etanol}}$  y una productividad de  $2.09 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{Lh}$ , utilizando *S. cerevisiae* cepa DistilaMax® DS, levadura seleccionada por presentar mejor actividad en la fermentación; además no fue necesario adicionar sales o elementos traza al hidrolizado para promover la fermentación.

Se logró reproducir los valores de los rendimientos obtenidos en las etapas de hidrólisis y de fermentación en matraz a escala piloto bajo las condiciones de reacción establecidas y con ello establecer una metodología que logra convertir el almidón contenido en las semillas de aguacate en bioetanol, creando un panorama de lo que se puede lograr a mayor escala.

## REFERENCIAS

- Aditiya H., Mahlia T., Chong W., Nur H., Sebayang A. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol (66), 631-653.
- Álvarez C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional, vol (359), 63-89. <http://www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/359/04carlosalvarez.pdf>
- Ausubel, F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D., Seidman J. G., Smith J. A. y Struhl K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 1937 – 1944.
- Balat M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, vol (52), 858-875
- Bušić A., Marđetko N., Kundas S., Morzak G., Belskaya H., Šantek M., Komes D., Novak S. y Šantek B. (2018). Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technology & Biotechnology*, vol (56), 289-309.
- Chaturvedi V., y Verma P. (2013). An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and added value products, vol (3), 415-431.
- Chel L., Barbosa E., Martínez A., González E. y Betancur D. (2016). Some physicochemical and rheological properties of starch isolated from avocado sedes. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol (86), 302-308.
- Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. (2019). Recuperado de [https://siiba.conadesuca.gob.mx/Archivos\\_Externos/6to\\_informe\\_estadístico.pdf](https://siiba.conadesuca.gob.mx/Archivos_Externos/6to_informe_estadístico.pdf). Accesado el 24 de enero de 2021
- Dávila J., Rosenberg M., Castro E. y Cardona C. (2017). A model biorefinery for avocado (*Persea americana* mill.) processing. *Bioresource Technology*, vol (243), 17-29
- Diario Oficial de la Federación. (2016). Recuperado de [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5450011&fecha=29/08/2016](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5450011&fecha=29/08/2016). Accesado el 20 de diciembre de 2019.
- Diario Oficial de la Federación. (2017). Recuperado de [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5488031&fecha=26/06/2017](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5488031&fecha=26/06/2017). Accesado el 20 de diciembre de 2019.
- García J. y García A. (2006). Biocarburantes líquidos: biodiésel y bioetanol. [http://www.madrimasd.org/uploads/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/vt4\\_biocarburantes\\_liquidos\\_biodiesel\\_y\\_bioetanol.pdf](http://www.madrimasd.org/uploads/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/vt4_biocarburantes_liquidos_biodiesel_y_bioetanol.pdf). Accesado el 28 de octubre de 2019.

- García M., Contreras M. y Castro E. (2020). Avocado-Derived Biomass as a Source of Bioenergy and Bioproducts. *Applied Sciences*, vol (10), 1-29.
- Ghose T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, vol (59), 257-268.
- Han, J.S., Rowell, J.S., 1997. Chapter 5. Chemical composition of fibers. En: P.R.M. Rowell (ed.), *Paper and Composites from Agro-Based Resources*, 1997, p. 83-134.
- Jambo S., Abdulla R., Mohd S., Marbawi H., Gansau J. y Ravindra P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol (65), 756-769.
- Kennes D., Abubackar H., Diaz M., Veiga M. y Kennes C. (2015). Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. *Chemical Technology and Biotechnology*, vol (91), 304-317.
- Lacerda L., Denck T., Bauab T., Da Silva M., Mottin I., Carvalho E. y Schnitzler E. (2013). Thermal, structural and rheological properties of starch from avocado seeds (*Persea americana*, Miller) modified with standard sodium hypochlorite solutions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol (115), 1893–1899.
- McAloon A., Taylor F., Yee W., Ibsen K y Wooley R. (2000). Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks. National Renewable Energy Laboratory.
- Maryam, Anwar Kasim y Santosa. (2016). Utilization Starch of Avocado Seed (*Persea Americana* Mill.) as a Raw Material for Dextrin. *Journal of Food Science and Engineering*.
- Peres R. y Sant' Ana A. (2017). Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol (73), 423-434.
- Pratywi C., Marantika S., Dwijananti P. y Masturi. (2018). Characterization of starch degradation during simple heating for bioethanol production from the avocado seed. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol (432), 1-5.
- Rastogi M. y Shrivastava S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol (80), 330-340.
- Renewable Fuels Association. (2021). Recuperado de <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>. Accesado el 13 de enero de 2021.
- Rivera G., Amaya C. y De la Rosa J. (2019). Physicochemical characterisation and in vitro Starch digestion of Avocado Seed Flour (*Persea americana* V. Hass) and its starch and fibrous fractions. *International Journal of Food Science and Technology*, vol (54), 2447-2457.



- Robak K. y Balcerek M. (2018). Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. *Food Technology & Biotechnology*, vol (56), 174-187.
- Romanelli G., Ruiz D., y Pasquale G. (2017). Química de la biomasa y los biocombustibles. <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/view/676/647/2252-1>. Accesado el 28 de octubre de 2019.
- Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Planeación agrícola nacional 2017-2030. Recuperado de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257067/Potencial-Aguacate.pdf>. Accesado el 21 de diciembre de 2019.
- Secretaría de Energía. (2014). Análisis y propuesta para la introducción de etanol anhidro en las gasolinas que comercializa PEMEX. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/86229/Bibliograf\\_a\\_9.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/86229/Bibliograf_a_9.pdf). Accesado el 08 de julio de 2021.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Accesado el 13 de enero de 2021.
- Sluiter A., Hames B., Hyman D., Payne C., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. y Wolfe J. (2008a). National Renewable Energy Laboratory. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples.
- Sluiter A., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. (2008b). National Renewable Energy Laboratory. Determination of Extractives in Biomass.
- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. y Crocker D. (2012). National Renewable Energy Laboratory. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass.
- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J. y Templeton D. (2008c). National Renewable Energy Laboratory. Determination of Ash in Biomass.
- Souza D., Dos Santos I., De Melo L., Pereira J., Pereira W., Palmeira J. y Feitosa R. (2018). Isolation and characterization of starch from pitomba endocarp. *Food Research International*, vol (124), 181-187.
- Subsecretaría de fomentos a los agronegocios. Monografía de cultivos (2011). Recuperado de [https://www.academia.edu/33976446/Monograf%C3%ADa\\_del\\_aguacate](https://www.academia.edu/33976446/Monograf%C3%ADa_del_aguacate). Accesado el 23 de diciembre de 2019.
- Sugandi J., Ahmad A. y Zul S. (2019). Effect of Time Fermentation and *Saccharomyces Cerevisiae* Concentration for Bioethanol Production from Empty Fruit Bunch. *Journal of Physics: Conference Series*, vol (1351), 1-5.
- Velásquez H., Ruiz A. y Oliveira S. (2010). Análisis energético y exergético del proceso de obtención de etanol a partir de la fruta del banano. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, vol (51), 87-96.

Yurkanis P. (2007). Fundamentos de química orgánica. México. Prentice Hall. 407-433.

Zabed H., Sahu J., Suely A., Boyce A. y Faruq G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol (71), 475-501.