



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – RESIDUOS SÓLIDOS

VALORIZACIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS MEDIANTE EL PROCESO DE
SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOETANOL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
RAYNER CARBONELL PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. ALFONSO DURÁN MORENO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
COMITÉ TUTOR:
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM
DR. IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. OCTUBRE DE 2016

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

SECRETARIO: DR. IVÁN MORENO ANDRADE

VOCAL: DRA. GABRIELA MOELLER CHÁVEZ

1^{ER}. SUPLENTE: DR. OSCAR GONZÁLEZ BARCELÓ

2^{DO}. SUPLENTE: DR. ALFONSO DURÁN MORENO

LUGAR O LUGARES DONDE SE REALIZÓ LA TESIS: Facultad de Química,
Conjunto E, Laboratorio 301, UNAM

TUTOR DE TESIS:

DR. ALFONSO DURÁN MORENO

FIRMA

Dedico esta tesis a mi esposa Yadira, una de las personas más especiales que tengo en mi vida y la cual es parte indispensable en cada paso que doy.

Gracias amor por ser tan especial, sin ti y sin tu apoyo incondicional en todo momento, este sueño no sería posible.

AGRADECIMIENTOS

A mi amada familia, quienes estuvieron conmigo en todo momento ofreciéndome su apoyo, comprensión y amor.

A mi asesor, Dr. Alfonso Durán Moreno, quien me ofreció su paciencia y apoyo para este trabajo y quien me dio la oportunidad de empezar otra vez.

A mi amiga, la Mtra. Sandra Carlos Pinedo, quien me enseñó todo lo que su tiempo le permitió para que se haya llevado a cabo este proyecto de investigación.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, por su particular punto de vista y muy interesantes comentarios enfocados a darle forma y sustento a este trabajo.

Al Dr. Iván Moreno Andrade, por el apoyo, comentarios e ideas que me proporcionó para desarrollar de la mejor manera este trabajo.

A todos los profesores de programa de Maestría en Ingeniería Ambiental que de una forma u otra contribuyeron en parte a mi formación.

A CONACYT, quien me otorgó una beca para realizar los estudios de maestría.

Al personal del laboratorio 301 del conjunto E de la Facultad de Química, quienes me brindaron todo el apoyo y abrieron las puertas para llevar a cabo la investigación.

A mis amigos del laboratorio 301, quienes han hecho agradable la aventura de realizar un proyecto de investigación.

A Iván, Álvaro, Dimitriv, Ulises y Emilio que han tenido mucha paciencia y comprensión, nunca podré olvidar tantos buenos momentos.

A Astrid, Roxana, Dafne y Nereida gracias por ser las mejores amigas en todo momento.

A Nydia, Markos y Familia que me apoyaron y me hicieron sentir como si estuviera en mi país natal.

A mi amigo y hermano Creagh por el apoyo incondicional.

A todos Gracias

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	14
1.1	Justificación	17
1.2	Objetivos.....	19
2	MARCO TEÓRICO.....	20
2.1	Material lignocelulósico	20
2.1.1	Celulosa	21
2.1.2	Hemicelulosa.....	21
2.1.3	Lignina.....	22
2.2	Bioetanol como combustible.....	25
2.3	Bioetanol de materiales lignocelulósicos	26
2.3.1	Residuos de poda	27
2.3.2	Residuos de alimentos.....	27
2.3.3	Residuos de maíz (hojas)	28
2.4	Pretratamientos	29
2.4.1	Pretratamiento mecánico	30
2.4.2	Pretratamiento biológico	31
2.4.3	Pretratamiento químico	31
2.4.4	Pretratamiento fisico-químico	33
2.4.5	Comparación de los métodos de pretratamientos	34
2.5	Hidrólisis	37
2.6	Estrategias de fermentación	37
2.6.1	Hidrólisis y fermentación separadas	38
2.6.2	Sacarificación y fermentación simultáneas	38
2.6.3	Sacarificación y cofermentación simultáneas	40
2.6.4	Bioproceso consolidado	40
2.7	Antecedentes.....	42
3	METODOLOGÍA.....	45
3.1	Acondicionamiento y caracterización de la muestra	47
3.2	Pretratamiento de la muestra	47
3.3	Determinación de azúcares reductores totales	48
3.4	Fermentación.....	48

3.5	Diseño de experimentos	49
3.6	Métodos analíticos	52
3.7	Determinaciones y producción de bioetanol.....	53
4	RESULTADOS.....	55
4.1	Acondicionamiento y caracterización de la muestra	55
4.2	Aplicación del pretratamiento.....	59
4.3	Determinación de azúcares	60
4.4	Balance de materia	62
4.5	Determinación de bioetanol.....	65
4.6	Análisis y discusión de los resultados.....	71
5	EVALUACIÓN DE LOS FACTORES PRINCIPALES EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.....	73
5.1	Resultados del diseño de experimento	73
5.2	Análisis de datos para el residuo de poda	74
5.3	Análisis de datos para el residuo de alimentos.....	77
5.4	Análisis de datos para el residuo de maíz	80
6	CONCLUSIONES.....	85
	RECOMENDACIONES	87
7	REFERENCIAS.....	88
8	APÉNDICES.....	93
8.1	Apéndice A.....	93
8.2	Apéndice B.....	96
8.3	Apéndice C.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Generaciones de biocombustibles y las materias primas para su obtención [5].....	15
Figura 2.1 Estructura de la celulosa.	21
Figura 2.2 Estructura de la hemicelulosa.....	22
Figura 2.3 Estructura de la lignina	23
Figura 2.4 Esquema de la estructura lignocelulósica. (Adaptado [18])	24
Figura 2.5 Generación de residuos sólidos por fuente [24].....	28
Figura 2.6 Esquema de la función de pretratamiento en la conversión de biomasa en combustible [17].	30
Figura 3.1 Esquema general de la metodología.....	46
Figura 3.2 Técnica para determinación de azúcares reductores totales (DNS).....	48
Figura 3.3 Esquema general de proceso de sacarificación y fermentación simultánea.	49
Figura 3.4 Instalación del cromatógrafo de gases Agilent technologies modelos 7890a gc system.	53
Figura 4.1 Proceso de trituración y molienda de los residuos.	56
Figura 4.2 Composición de los a) Residuos de poda; b) Residuos de alimentos y c) Residuos de maíz (hojas).....	59
Figura 4.3 Determinación de azúcares reductores totales en los residuos de poda.	60
Figura 4.4 Determinación de azúcares reductores totales en los residuos de alimentos.	61
Figura 4.5 Determinación de azúcares reductores totales en los residuos de maíz.	61
Figura 4.6 Montaje experimental para la producción de bioetanol.	65
Figura 4.7 Producción de bioetanol de los residuos en la 1ra corrida.....	66
Figura 4.8 Producción de bioetanol de los residuos en la 2da corrida.	67
Figura 4.9 Producción de bioetanol de los residuos en la 3ra corrida.....	68
Figura 4.10 Producción de bioetanol de los residuos en la 4a corrida.	69
Figura 5.1 Diagrama de Pareto para los residuos de poda.	75

Figura 5.2 Gráficas de contornos de a) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Gráfica de contorno de Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas.	76
Figura 5.3 Diagrama de Pareto para los residuos de alimentos.....	78
Figura 5.4 Gráficas de contornos de a) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Gráfica de contorno de Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas.	79
Figura 5.5 Gráfica de probabilidad normal para los residuos de alimentos.	80
Figura 5.6 Diagrama de Pareto para los residuos de maíz (hojas).	82
Figura 5.7 Gráficas de contornos de residuo maíz a) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Gráfica de contorno de Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas.	83
Figura 8.1 Curva de calibración para el método DNS. La línea punteada representa el ajuste de los datos.	95
Figura 8.2 Gráfica de cubos de bioetanol para el residuo de poda.	96
Figura 8.3 Gráficas de superficie de residuo poda a) Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento.....	96
Figura 8.4 Gráfica de cubos de bioetanol para el residuo de alimentos. ...	97
Figura 8.5 Gráficas de superficie de residuo alimentos a) Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento.	97
Figura 8.6 Gráfica de cubos de bioetanol para el residuo de alimentos. ...	98
Figura 8.7 Gráficas de superficie de residuo alimentos a) Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento.	98
Figura 8.8 Curva de calibración de porcentaje de bioetanol contra área. .	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Ventajas y desventajas de los diferentes pretratamientos de biomasa lignocelulósica (Adaptado [6]).	35
Tabla 2.2 Pretratamientos y condiciones para su aplicación.	36
Tabla 2.3 Sacarificación y fermentación simultáneas a diferentes residuos.	39
Tabla 2.4 Comparación de las estrategias de fermentación (Adaptado de [3]).	41
Tabla 3.1 Matriz general del diseño de experimentos.	50
Tabla 3.2 Variables y niveles del diseño experimentos.	51
Tabla 3.3 Combinación de los niveles y los factores del diseño.	51
Tabla 3.4 Técnicas analíticas	52
Tabla 3.5 Condiciones del cromatógrafo de gases para determinar bioetanol.	54
Tabla 4.1 Caracterización de los residuos de poda.	57
Tabla 4.2 Caracterización de los residuos de alimentos.	57
Tabla 4.3 Caracterización de los residuos de maíz (hojas).	58
Tabla 4.4 Resultados de los azúcares reductores durante las etapas del proceso y rendimiento de la sacarificación y fermentación simultánea (SFS).	62
Tabla 4.5 Balance de masas de la primera corrida (sin pretratamiento químico y 48 horas).	63
Tabla 4.6 Balance de masas de la segunda corrida (con pretratamiento químico y 48 horas).	63
Tabla 4.7 Balance de masas de la tercera corrida (sin pretratamiento químico y 72 horas).	63
Tabla 4.8 Balance de masas de la cuarta corrida (con pretratamiento químico y 72 horas).	64
Tabla 4.9 Producción de bioetanol de los residuos a 48 horas.	70
Tabla 4.10 Producción de bioetanol de los residuos a 72 horas.	70
Tabla 5.1 Disposición final del diseño de experimentos para el residuo de poda.	74
Tabla 5.2 Análisis de varianza para la producción de bioetanol de los residuos de poda.	75
Tabla 5.3 Disposición final del diseño de experimentos para el residuo de alimentos.	77
Tabla 5.4 Análisis de varianza para la producción de bioetanol de los residuos de alimentos.	78
Tabla 5.5 Disposición final del diseño de experimentos para el residuo de maíz (hojas).	81

Tabla 5.6 Análisis de varianza para la producción de Bioetanol de los residuos de maíz (hojas).....	82
Tabla 8.1 Soluciones patrón para la elaboración de la curva de calibración del método de DNS.	94
Tabla 8.2 Curva de calibración con glucosa anhidra para el método de DNS.	95

ABREVIATURAS

- 1G: etanol de primera generación
- 2G: etanol de segunda generación
- ACV: análisis del ciclo de vida
- AFEX: del inglés, “Ammonia Fibre Explosion”
- AR: azúcares reductores
- FPU: unidades de papel de filtro
- BPC: bioproceso consolidado
- b.s: en base seca
- DNS: técnica analítica de ácido 3,5 dinitrosalicílico
- DQO: demanda química de oxígeno
- ETBE: etil ter-butyl éter
- FND: fibra neutra detergente
- FND: fibra ácida detergente
- g/g: relación gramos/gramos
- HFS: hidrólisis y fermentación por separado
- HPLC: del inglés, “High Liquid Performance Chromatography”
- JICA: Agencia de Cooperación Internacional de Japón
- MML/año: miles de millones de litros al año
- MPC: material pretratado completo
- MTBE: metil ter-butyl éter
- NK: nitrógeno kjeldahl
- OPEP: Organización de los Países Exportadores de Petróleo
- p/p: relación peso/peso
- PVE: productividad volumétrica de etanol
- RSI: residuo sólido insoluble
- RSU: residuos sólidos urbanos
- SCFS: sacarificación y cofermentación simultáneas
- SF: sólidos fijos

- SFS: sacarificación y fermentación simultáneas
- ST: sólidos totales
- SV: sólidos volátiles
- v/v: relación volumen/volumen

RESUMEN

La presente investigación tiene por objetivo producir bioetanol mediante el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas de tres diferentes residuos orgánicos. Se pretende utilizar residuos lignocelulósicos ya que éstos presentan un gran potencial para ser utilizados en la producción de biocombustibles; evaluando el efecto que tendrían en el proceso de producción tres factores principales evaluados a dos niveles, un nivel alto y otro bajo.

En el caso de pretratamiento el nivel bajo fue la utilización de solo un pretratamiento físico, mecánico específicamente y el nivel alto fue la combinación del pretratamiento físico con un pretratamiento químico (ácido diluido) utilizando una solución al 1% de H_2SO_4 . Los otros factores que se evaluaron fueron la concentración de las enzimas y el tiempo de proceso. Para el caso de las enzimas se utilizó un coctel formado por concentraciones altas y bajas de ambas, este proceso fue evaluado a 48 y 72 horas. Para ello se utilizaron residuos de poda, residuos de alimentos y residuos de maíz (hojas), con tamaños de partícula entre 0.2 y 3,0 mm. Después de los pretratamientos, se realizó la adición de las enzimas celulolíticas comerciales (*CELUZYME* y *CELUZIME XB*).

El proceso de los pretratamientos se divide en dos etapas: el primero fue el mecánico el cual se realizó con un molino manual marca Imperial y una licuadora industrial marca Tapiza modelo 2T2PL. El segundo pretratamiento fue el químico y fue llevado a cabo en un matraz Erlenmeyer, se le añadieron de 50 mL de ácido sulfúrico diluido al 1% y se colocaron a la temperatura de 210 °C durante un tiempo de 4 minutos.

Para los mejores resultados obtenidos con residuos de poda, se estima una producción de 188.5 mL de etanol/kg en base seca (b.s) de residuo, esto se produjo utilizando todos los factores analizados en nivel alto, los cuales presentaron un aumento del 19.7 %, dicho aumento se presentó tras realizar la corrida con las mismas condiciones, sólo se aumentó el tiempo de 48 a 72 horas de proceso.

Con los residuos de alimentos, se obtuvo una mayor producción de etanol/kg en base seca de residuo, se alcanzaron niveles de 282.8 mL debido a la extracción del mayor porcentaje de los azúcares teóricamente disponibles en el material, utilizando un pretratamiento con 1.0 % v/v de H_2SO_4 seguido de una hidrólisis enzimática, dichos valores se obtuvieron

utilizando los factores analizados en nivel alto, lo que presentó un aumento de 23.7 % comparado con la corrida que se realizó en las mismas condiciones pero a diferentes tiempos de proceso.

Por último, los residuos de maíz (hojas) reportaron la mayor producción cuando todos los factores fueron analizados en nivel alto y la mayor producción obtenida fue de 257.8 mL de etanol por /kg en base seca. El aumento en la producción con respecto a corridas anteriores se debe principalmente a la utilización de la combinación de los pretratamientos mecánico y químico con el cual se logró un aumento de 30.7 % en producción.

Finalmente, se recomienda seguir esta investigación con el propósito de analizar qué sucede con la cinética del proceso, centrandó la atención principalmente en la parte de sacarificación donde sucede la liberación de azúcares debido al pretratamiento anteriormente realizado y acción de las enzimas.

1 INTRODUCCIÓN

Debido a la alta demanda mundial de energía, el agotamiento de las reservas de combustibles fósiles y la preocupación mundial por el cambio climático, ha surgido un gran interés por encontrar una manera de producir energía a partir de fuentes renovables [1].

Si a lo anterior se suma el aumento acelerado de la generación de residuos sólidos orgánicos (cuyo adecuado manejo y disposición es un desafío a nivel internacional) se hace necesario encontrar vías para disminuir su impacto ambiental, lograr valorizarlos y así ayudar a mejorar su gestión.

Debido al creciente desarrollo industrial y poblacional al que se enfrenta el mundo, se requiere de nuevas fuentes de combustibles, ya que cada vez existe una mayor demanda de energía y tarda mucho tiempo en producirse. Sabemos que la mayor parte proviene de los combustibles fósiles los cuales terminarán por agotarse en algún momento. Actualmente, la generación de combustibles alternativos se presenta como una fuente de investigación muy importante, siendo los biocombustibles una de las fuentes más prometedoras para su producción [2], [3].

Los biocombustibles son aquellos obtenidos a partir de biomasa mediante su procesamiento químico, térmico o biotecnológico, entre ellos se pueden mencionar: el biodiesel, bioetanol, biogás y biohidrógeno. Éstos se utilizan principalmente como fuente de energía de vehículos de motor y para la

producción de electricidad, los biocombustibles se adquieren de materias primas de origen agrícola, ganadero y desechos orgánicos los cuales pueden ser substitutos de forma parcial o total de los combustibles de origen fósil, en algunos casos, sin necesidad de modificar los motores o el diseño de los vehículos [4]. En la figura 1.1 se muestran las diferentes generaciones de biocombustibles que existen, así como sus principales materias primas para su producción.

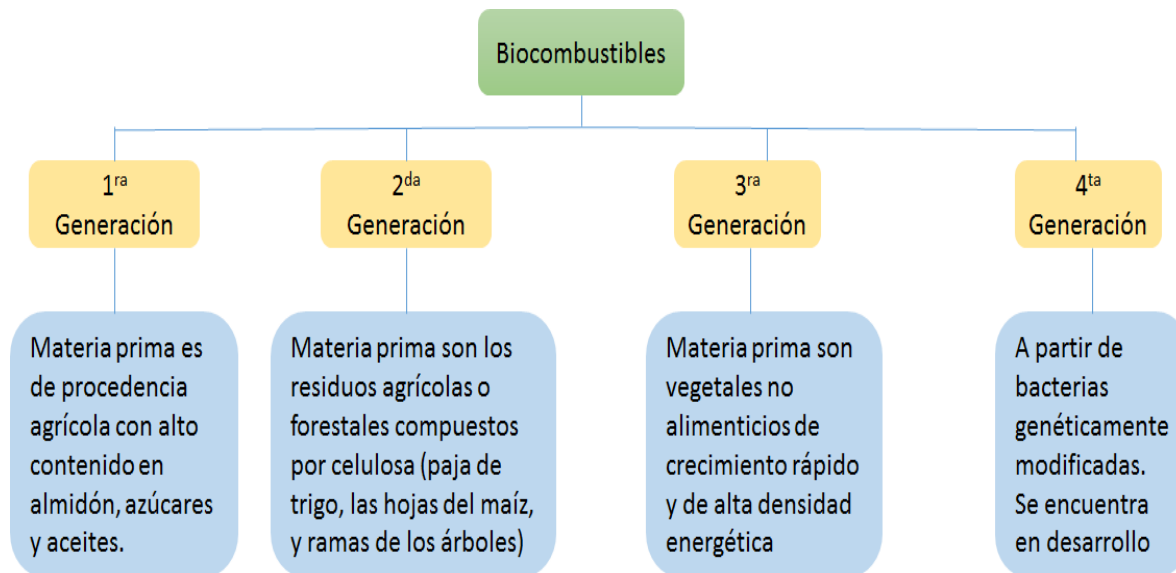


Figura 1.1 Generaciones de biocombustibles y las materias primas para su obtención [5].

A nivel mundial uno de los principales biocombustibles es el bioetanol, ya sea que se use en estado puro o mezclado con gasolina para su uso en el transporte. En países como Brasil y los Estados Unidos de América (EEUU) existe evidencia de su producción que en 2007 alcanzó 19,000 y 24,600 MML/año a partir de caña de azúcar y maíz, respectivamente. Sin embargo, el uso de dichas materias primas compromete y encarece la producción de alimentos para el consumo [4].

La producción de etanol a partir de estos cultivos se denomina etanol de primera generación (1G) debido a aquellas materias primas que lo constituyen son parte del sustento humano y animal, y su disponibilidad es limitada, tanto por el exceso de demanda de los países industrializados hacia la producción de etanol como por la controversia debido a la competencia generada con la alimentación. Se pretende desarrollar una vía

para la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos [6], [7].

El incremento del uso de biomasa con fines energéticos, ya sea para la producción de calor, electricidad o como materia prima de los biocombustibles, se ha enfocado a cumplir con los objetivos establecidos en el protocolo de Kyoto y así tratar de encontrar políticas ambientales en diferentes países y así disminuir y evitar (cuanto sea posible) la gran dependencia que existe del suministro de combustibles fósiles. El bioetanol que se obtiene de esta forma se denomina etanol de segunda generación (2G), y se estima que la producción mundial a partir de biomasa lignocelulósica podría aumentar hasta 16 veces con respecto a la actual [8].

Estudios realizados a nivel mundial sobre el Análisis de Ciclo de Vida (ACV) de este proceso, muestran reducciones de hasta un 60% en emisiones de gases de efecto invernadero para los biocombustibles producidos a partir de biomasa lignocelulósica con respecto a los combustibles fósiles [9].

En México, la producción de bioetanol a partir de los insumos mencionados anteriormente (caña de azúcar y maíz) compromete la producción alimentaria del país debido al importante consumo del maíz por la población. Por otro lado, el uso de los azúcares de la caña de azúcar como materia prima no permitiría producir el bioetanol necesario para sustituir el volumen de gasolina que se consume. Una solución tecnológica a lo anteriormente planteado es la producción de bioetanol en México a partir de residuos lignocelulósicos [4].

Es por ello que la producción de biocombustibles de segunda generación (residuos sólidos orgánicos lignocelulósicos) es una alternativa viable para el tratamiento de los residuos sólidos orgánicos urbanos. Los cuales están compuestos por este material lignocelulósico, el cual proviene en su mayoría de residuos generados por el hombre y constituye aproximadamente el 50% de la biomasa del mundo [10], con dicha acción se podrían disminuir los volúmenes de RSU destinados a los rellenos sanitarios, y se obtendría un combustible limpio para su uso cotidiano.

Para lograr la factibilidad económica de la producción de bioetanol de segunda generación (producido a partir de residuos lignocelulósicos) se tendría que pensar en la optimización de métodos, en la disminución de costos de las diversas etapas que comprende el proceso de producción.

El proceso de producción de bioetanol de segunda generación (residuos lignocelulósicos) consiste de forma general en cuatro pasos principales: 1) pre-tratamiento del residuo para aumentar el área de la superficie de contacto del sustrato y romper el complejo lignocelulósico 2) hidrólisis enzimática o sacarificación como también se le conoce, que es la etapa donde los polímeros de celulosa son transformados en glucosa por las enzimas 3) fermentación etapa en la que la glucosa es convertida a bioetanol por el microorganismo utilizado 4) fase de destilación la cual es la menos determinante en cuanto a costos durante en proceso.

Como ya se mencionó anteriormente, es indispensable realizar una investigación con el objetivo de producir bioetanol mediante el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (proceso que engloba tanto el proceso de hidrólisis como el de fermentación en un mismo reactor disminuyendo los costos de proceso) a partir de residuos lignocelulósicos, en particular de tres tipos de residuos: residuo de poda, residuos de alimentos y residuos (hojas) provenientes de la venta de maíz, y con ello disminuir los volúmenes de residuos orgánicos que se envían a rellenos sanitarios en México y así obtener un combustible a partir de ellos, evaluando los efectos de algunas variables sobre el proceso y así otorgarle un valor agregado a estos residuos.

1.1 Justificación

El bioetanol ha sido considerado como una alternativa para contribuir a la sustitución para combustibles fósiles, para fungir como único combustible en los coches con motores o como aditivo en el combustible se puede mezclar hasta un 30%. En la actualidad, el bioetanol es el biocombustible más dominante y su producción mundial mostró una tendencia al alza en los últimos 25 años [11]. Además de ser uno de los biocombustibles renovables más importantes en términos de volumen y valor de mercado, ya que se produce a partir de materiales a base de azúcar y de almidón, tales como la caña de azúcar y maíz. Sin embargo, la producción de bioetanol derivado de materiales lignocelulósicos se está probando en plantas piloto con el objetivo de lograr su valorización.

Para que el proceso de producción de etanol a partir de lignocelulosa sea eficiente se necesita una hidrólisis completa de los azúcares (no disueltos), tanto de los azúcares celulósicos como hemicelulósicos, además de una fermentación eficiente de estos a etanol. Por otra parte, el proceso debe

realizarse con la más baja demanda energética posible. Para cumplir con estos objetivos son necesarias altas concentraciones de sólidos iniciales en el proceso de fermentación con el fin de obtener altas concentraciones finales de etanol.

En el primer paso en el proceso de producción de bioetanol a partir de lignocelulosa, llamado pretratamiento, comúnmente se realiza la filtración del material pretratado del cual se obtienen dos fracciones; una fracción sólida denominada residuo sólido insoluble (RSI), rica en celulosa y lignina, y una fracción líquida o prehidrolizada como también se le conoce, rica en azúcares hemicelulósicos (principalmente xilosa), además de los productos inhibidores (ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural).

Según lo encontrado en otras investigaciones, lo más común es eliminar los compuestos tóxicos que han quedado fijados, por lo que el RSI antes de ser empleado como sustrato en las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación, se somete a un proceso de lavado. Esto trae como consecuencia una pérdida inevitable de los azúcares solubles que se encuentran en dicha fracción, lo que produce un aumento de la cantidad de agua necesaria en el proceso y de los efluentes producidos. Además, también debe considerarse el incremento de costo que supone añadir una etapa adicional al proceso.

Para evitar las pérdidas de azúcares potencialmente fermentables, la disminución de los volúmenes de agua empleados y sobre todo para reducir los costos de proceso, lo más conveniente sería, utilizar el material pretratado completo (MPC) en las posteriores etapas de hidrólisis y fermentación y no únicamente la fracción de RSI. Lo antes mencionado es uno de los objetivos que se pretende lograr en esta investigación.

La utilización del MPC en lugar de utilizar sólo el RSI como comúnmente se realiza, implica además de mayores concentraciones de tóxicos, viscosidades más altas. Esto supone dificultades en la agitación del medio, una distribución no uniforme de los microorganismos y enzimas, así como una dificultad añadida en el control del pH y la temperatura.

El éxito del desarrollo comercial del etanol lignocelulósico requiere además una simplificación del proceso que se puede alcanzar con una mayor integración de todas las etapas (p ej. integración de la hidrólisis y fermentación en un proceso simultáneo). Misma que tendrá ventajas en

términos de mayores rendimientos, velocidades de producción, concentraciones de etanol y costos del proceso.

Por todos los aspectos anteriormente planteados es necesario realizar una investigación sobre la producción de bioetanol a partir de diferentes tipos de fracción orgánica de los residuos sólidos orgánicos. Para la realización de esta investigación se han planteado los siguientes objetivos.

1.2 Objetivos

General

Producir bioetanol mediante el proceso de sacarificación y fermentación simultánea utilizando tres diferentes residuos sólidos orgánicos para su valorización.

Específicos

- Evaluar la producción de bioetanol de los diferentes residuos orgánicos mediante una variación en los tiempos del proceso, para encontrar las mejores condiciones de operación en la producción de bioetanol.
- Modificar el complejo lignocelulósico de los residuos mediante pretratamientos para aumentar su disponibilidad a las enzimas.
- Evaluar la sacarificación con diferentes concentraciones de dos enzimas comerciales (CELUZYME y CELUZYME XB) en la etapa de hidrólisis.

Alcances

- Determinar mediante técnicas analíticas a escala laboratorio las características químicas de los residuos de poda, alimentos y maíz, así como sus distintos niveles de material lignocelulósico y encontrar las condiciones de operación que aumenten la producción de bioetanol.
- Realizar un pretratamiento mecánico (molienda) y además combinarlo con un pretratamiento químico (ácido diluido) para aumentar la disponibilidad de los azúcares a la acción de las enzimas y de esta manera aumentar los rendimientos del proceso en cuanto a producción.

2 MARCO TEÓRICO

En el presente capítulo se abordan los principales factores identificados en la producción de bioetanol, los tipos de residuos con material lignocelulósicos, así como los pretratamientos de forma general, y los que se utilizaron en este trabajo. También se describe la teoría principal sobre la fermentación alcohólica en particular el proceso de fermentación y sacarificación simultáneas como la estrategia a ser implementada.

2.1 Material lignocelulósico

Si se analizan los aspectos medioambientales y económicos tales como: la necesidad de utilizar fuentes de energía que permitan disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero, además el ahorro que representa utilizar los residuos para la producción de combustibles, entonces se evidencia la importancia de la biomasa lignocelulósica como materia prima para la producción de bioetanol. La lignocelulosa es el biopolímero más abundante en la tierra. Se estima que la producción anual de la biomasa lignocelulósica se encuentra entre 10-50 mil millones de toneladas y se considera que comprende cerca del 50% de la biomasa total existente en el mundo [12].

Los materiales lignocelulósicos están conformados principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos polímeros se asocian uno con el otro formando una matriz compleja, la cual varía su composición según el tipo, especie e incluso fuente de la biomasa. Las materias primas lignocelulósicas que se utilizan para la producción de bioetanol requieren

en muchos casos un pretratamiento agresivo para producir un sustrato fácilmente asimilable por las enzimas comerciales que hidrolizan estos compuestos con el objetivo de liberar los azúcares para la fermentación [13].

2.1.1 Celulosa

La celulosa es el principal constituyente de la pared celular vegetal la cual constituye un soporte estructural. La celulosa es un polímero de β -D-glucopiranososa vinculados a través de enlaces glucosídicos (ver figura 2.1). La unidad de repetición de la cadena de celulosa es el disacárido celobiosa y estas cadenas se agrupan para formar microfibrillas, que se juntan para formar fibras de celulosa [13].

Las microfibrillas de celulosa son en su mayoría independientes, la estructura de este compuesto depende de enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals. El enlace de hidrógeno dentro de una microfibrilla de celulosa determina rectitud de la cadena, pero los enlaces de hidrógeno pueden introducir orden (cristalino) o trastorno (amorfo) en la estructura de la celulosa [13].

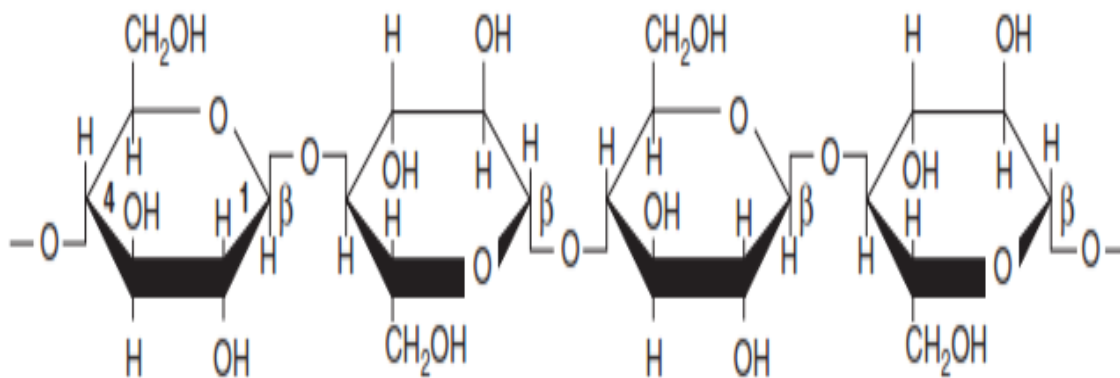


Figura 2.1 Estructura de la celulosa.

2.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa constituye el segundo polímero más abundante de la tierra que forma las paredes celulares de las plantas, y es en parte la que sostiene la estructura lignocelulósica. Se define como un heteropolímero formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa), desoxihexosas (L-ramnosa, L-fucosa) y ácidos urónicos (D-

glucurónico, D-galacturónico, 4-O-metilglucurónico). La cadena principal de este heteropolímero, puede estar constituida por una sola unidad (homopolímero) o varias unidades (heteropolímero) como por ejemplo: xilanos, galactanos, glucanos, glucomananos y galactoglucomanano, entre otros, los cuales pueden presentar una gran variedad de ramificaciones.

La hemicelulosa es un carbohidrato de estructura compleja que está compuesto por polímeros como pentosas (como xilosa y arabinosa), hexosas (como manosa, glucosa y galactosa), y azúcares. La hemicelulosa se encuentra fundamentalmente en las maderas duras y plantas agrícolas, como hierbas y paja. Ésta tiene un peso molecular inferior a la celulosa, y está ramificada con cadenas laterales cortas que constan de diferentes azúcares, los cuales representan polímeros fácilmente hidrolizables (ver figura 2.2). La hemicelulosa es la conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, es la que le da la rigidez al complejo lignocelulósico [14].

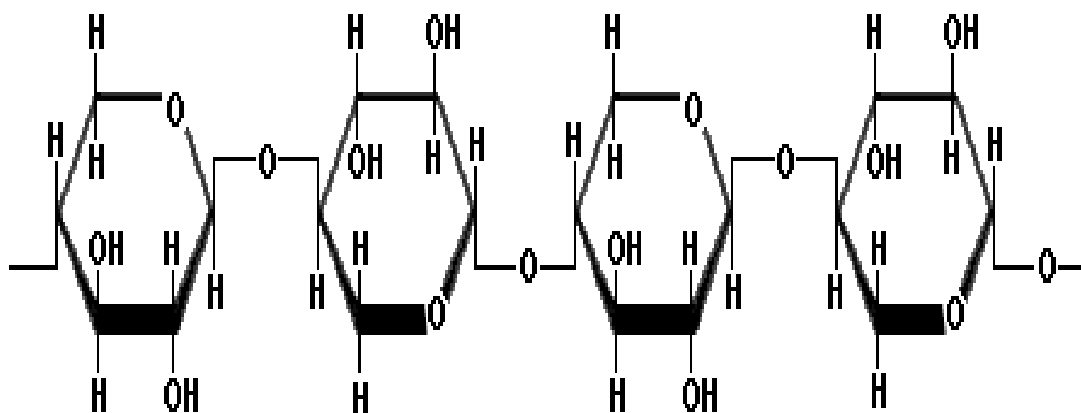


Figura 2.2 Estructura de la hemicelulosa

2.1.3 Lignina

La lignina es el tercer polímero más abundante en la naturaleza, está presente en las paredes celulares de las plantas y está constituida por una superficie rígida, impermeable, es resistente al ataque microbiano y al estrés oxidativo. La lignina es una red amorfa heteropolímero de unidades fenil propano (p-coumaril, coniferilico y alcohol sinapílico) se mantienen unidas por diferentes vínculos. La lignina está generalmente aceptada como el "pegamento" que une los diferentes componentes de la biomasa lignocelulósica, por lo que, es insoluble en agua. Debido a su estrecha asociación con microfibrillas de celulosa, lignina ha sido identificado como

un importante elemento disuasorio para hidrólisis enzimática y microbiana de biomasa lignocelulósica. En diversos estudios se ha mostrado que la digestibilidad de la biomasa se mejora con disminución de la presencia de lignina [13].

La lignina es una estructura molecular compleja, que contiene polímeros de monómeros fenólicos, está presente en la pared celular de origen vegetal, proporcionando soporte estructural, impermeabilidad, y la resistencia al ataque microbiano (ver figura 2.3). En las plantas como es caso de las hierbas presentan los contenidos más bajos de lignina, mientras que las maderas blandas tienen los más altos contenidos de lignina [15].

La biomasa en general contiene diferentes cantidades de lignina, la cual debe ser eliminada a través de pretratamiento, esto para mejorar la digestibilidad de la biomasa. La lignina se funde durante el pretratamiento y se une tras el enfriamiento de tal manera que sus propiedades son alteradas; por tal motivo puede precipitar posteriormente. La deslignificación (extracción de la lignina por productos químicos) causa hinchazón de la biomasa, la alteración de la estructura de la lignina, el aumento de área de superficie interna, y el aumento de la accesibilidad de las enzimas celulolíticas a fibras de celulosa [13].

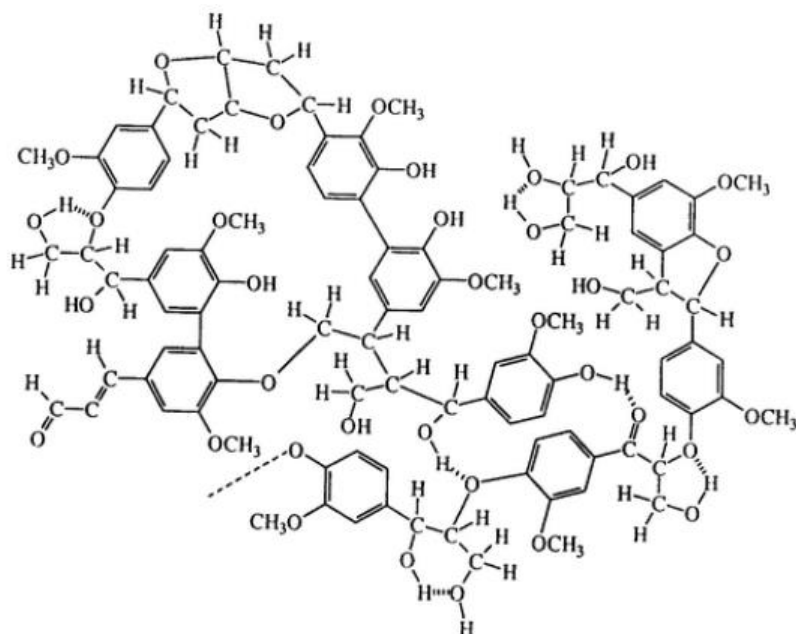


Figura 2.3 Estructura de la lignina

Aunque no todos los tratamientos previos resultan en la deslignificación sustancial, la estructura de la lignina se puede alterar sin la extracción,

debido a cambios en las propiedades químicas de la lignina. La biomasa pretratada se hace más digerible que la biomasa cruda, aunque puede tener aproximadamente el mismo contenido de lignina como biomasa no tratada previamente [13].

En la figura 2.4 se muestra la estructura de material lignocelulósico de un cultivo energético, así como la ubicación de cada uno de los compuestos químicos que conforman el complejo. Como se ha mencionado anteriormente es una estructura muy complicada de acceder sin ayuda de los distintos pretratamientos.

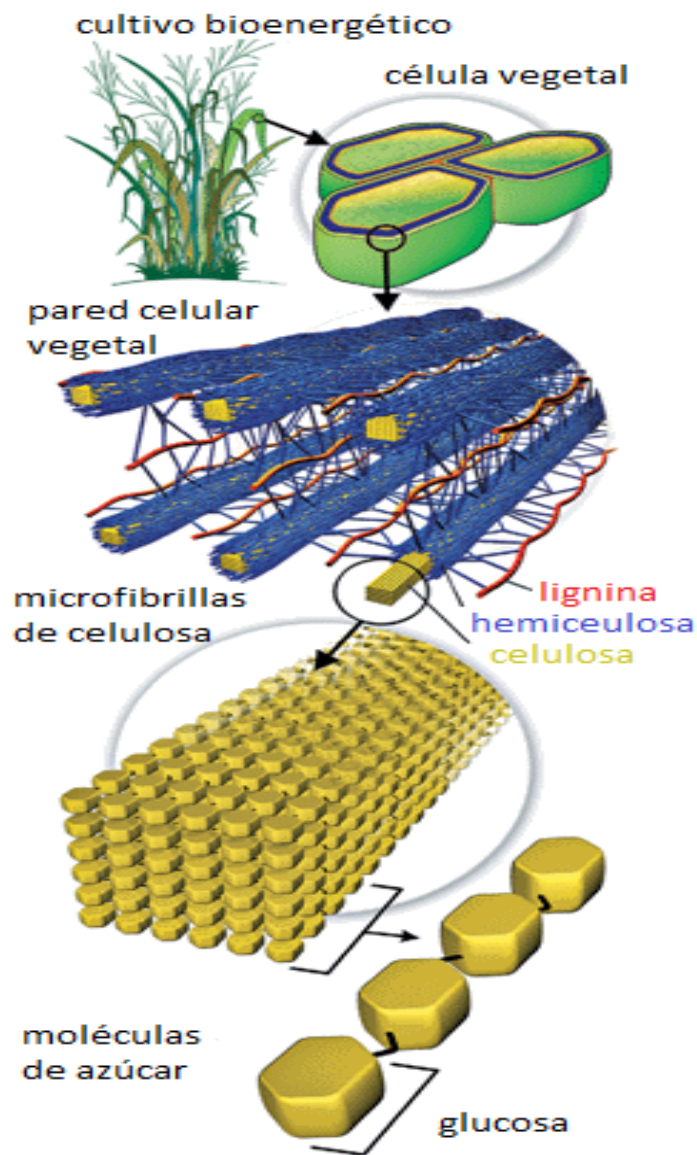


Figura 2.4 Esquema de la estructura lignocelulósica. (Adaptado [16])

2.2 Bioetanol como combustible

El etanol es un compuesto químico que se puede obtener a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales tales como: cereales, remolacha, caña de azúcar o biomasa. Estos azúcares están combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa. Las plantas de dichos productos crecen gracias al proceso de fotosíntesis, en el que la luz del sol, el dióxido de carbono de la atmósfera, el agua y los nutrientes de la tierra forman moléculas orgánicas complejas como el azúcar, los hidratos de carbono y la celulosa, que se concentra en la parte fibrosa la planta [17].

El etanol obtenido a partir de biomasa es un biocombustible que se puede utilizar para el funcionamiento de automóviles, y para la obtención tanto de energía calorífica como eléctrica. El bioetanol para su utilización debe contar con algunas propiedades, una de ellas es el contenido de humedad, la cual debe estar alrededor del 0.7 % (dentro de este porcentaje también deben encontrarse el metanol e hidrocarburos) del volumen total y la pureza del compuesto debe ser aproximada al 99.3 % de volumen [18].

Los inicios de la utilización del etanol como combustible se remontan al uso de vehículos motorizados para el transporte, en los primeros años del siglo XIX, el norteamericano Samuel Morey, fue el primero en utilizar una mezcla de etanol y trementina en motores de combustión interna. Posteriormente el ingeniero alemán Otto, desarrolló el primer motor de combustión interna, el cual utilizaba el etanol como combustible [19].

El norteamericano Henry Ford, fue el primer fabricante de un automóvil con etanol como carburante y algunos años después en el año 1908, implementó el llamado modelo T , el cual podía utilizar para su funcionamiento tanto alcohol como gasolina, o una mezcla de ambos [19].

Después de 1920, la producción de petróleo retrasó el desarrollo de los combustibles vegetales, ya que, contaba con una mejor factibilidad económica y además, generaba más energía por litro de combustible utilizado que el etanol.

Al concluir la Segunda Guerra Mundial, el precio del petróleo tuvo un decaimiento, lo cual provocó un uso muy limitado del bioetanol como combustible automotriz; fue hasta el año 1973 que se desencadenó la crisis en la Organización de Países Árabes Exportadores de Petróleo (OPEP), la

cual trajo como consecuencia la limitación de la producción de crudo, aumentando así los precios del mismo. Al desarrollarse esta crisis en la OPEP puso en evidencia la dependencia en el suministro de petróleo, por lo que surgió de nuevo la idea de utilizar combustibles alternativos al uso de derivados del petróleo.

Se tiene previsto que en el futuro el bioetanol va a ser el combustible dominante para la utilización automotriz. Se espera que la producción total en el año 2017 sea de 1.81 millones de barriles, siendo hasta ahora EEUU y Brasil los mayores productores con 984,000 y 530,000 barriles al día, respectivamente. China y Canadá deben aumentar su producción en los próximos años de 37,000 a 55,000 y de 28,000 a 36,000 barriles diarios, respectivamente [20].

El bioetanol puede emplearse para los vehículos como biocombustible único, utilizando mezclas con gasolina en distintas proporciones o también puede emplearse como un aditivo de la misma en forma de etil ter-butil éter. En la Unión Europea ya se cuenta con una normativa vigente la cual cuenta con las especificaciones para la utilización de este biocombustible en sus diferentes formas, la Norma Europea de Gasolinas EN 228 /Directiva 2003/17/CE, la cual tiene como objetivo cumplir con la calidad de las gasolinas y el gasóleo.

En los últimos años el etil ter-butil éter (ETBE) se está utilizando mucho más que los otros aditivos porque sus emisiones de hidrocarburos son menos tóxicas, debido a que el compuesto químico acetaldehído es mucho menos tóxico que el formaldehído. También es importante recalcar que se puede obtener a partir de recursos renovables en lugar de utilizar el petróleo, como es el caso para obtener el metil ter-butil éter (MTBE). Otra ventaja que tiene el ETBE es que es mucho menos soluble en agua que el MTEB, lo que disminuye considerablemente la posibilidad de contaminar mantos acuíferos y mares. El ETBE, además no requiere modificaciones en los motores actuales [17].

2.3 Bioetanol de materiales lignocelulósicos

La producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos o bioetanol de segunda generación como también se le conoce, puede convertirse en un futuro en la principal competencia de los biocombustibles de primera generación, pues los residuos de segunda generación no compiten con el mercado alimenticio y se encuentran en abundancia, lo que disminuye el

costo de obtención y por ende disminuye el costo final de combustible producido.

Según la investigación realizada por Tomás Pejó, 2010 [3], los materiales lignocelulósicos se encuentran divididos en seis grupos principales: 1) residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, bagazo de maíz, paja de trigo, etc.), 2) maderas duras (álamo), 3) maderas blandas (pino), 4) residuos celulósicos (papel de periódico, residuos de papel de oficina), 5) biomasa herbácea (alpiste, limoncillo); y 6) residuos sólidos urbanos (RSU).

2.3.1 Residuos de poda

Los residuos de poda representan un 6 % de los residuos orgánicos que se generan diariamente en México. Esta cantidad representa un volumen significativo teniendo en cuenta que en el Distrito Federal se generan aproximadamente 12,700 toneladas diarias de residuos sólidos urbanos, la cantidad de residuos de poda diarios estarían alrededor del 10 % de las toneladas diarias generadas.

Los residuos de poda presentan un alto contenido de material lignocelulósico, ya que tienen un contenido de celulosa entre un 40% y un 50% para maderas duras, blandas y pasto, según reporta una investigación realizada por Sun y Cheng, 2002 [7]. Los residuos de poda se pueden usar para obtener bioetanol con una previa conversión a glucosa [7]

2.3.2 Residuos de alimentos

Los residuos de alimentos incluyen los alimentos no consumidos y las sobras de preparación de alimentos de las viviendas o domicilios, establecimientos comerciales tales como restaurantes, fuentes institucionales como comedores escolares, y las fuentes industriales como comedores de fábrica [21].

De la generación de residuos sólidos urbanos en la Ciudad de México, el 48 % del total pertenece a residuos domiciliarios, lo que corresponde aproximadamente a 6,096 toneladas diarias [22].

El principal componente de los residuos domiciliarios son los restos de comida, según datos proporcionados en un estudio realizado por la Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) indicaron que un 38% de los residuos domiciliarios pertenecen a residuos de comida [23], lo que equivale a una cantidad de generación aproximada de 2,316 toneladas diarias.

Dichos residuos, en su gran mayoría van directamente a las estaciones de transferencia sin recibir ningún tratamiento para su aprovechamiento, por lo que cada día que pasa es más difícil encontrar una gestión eficaz para ellos.

Los restos de comida en su gran mayoría están compuestos por materia vegetal (material lignocelulósico). Una gran parte de estos residuos que salen de las estaciones de transferencia se dispone en rellenos sanitarios, desperdiciando así el potencial energético con que cuentan éstos.

La estrategia de producir bioetanol a partir de estos residuos, se presenta como alternativa interesante para disminuir los impactos ambientales que generan estos residuos y encontrar una manera eficiente de gestionarlos, obteniendo un beneficio final de ellos.

En la figura 2.5 se muestra la generación de residuos por fuente en la ciudad de México. Destacando principalmente el porcentaje de residuos domiciliarios; de los cuales aproximadamente un 50 % son residuos de alimentos.

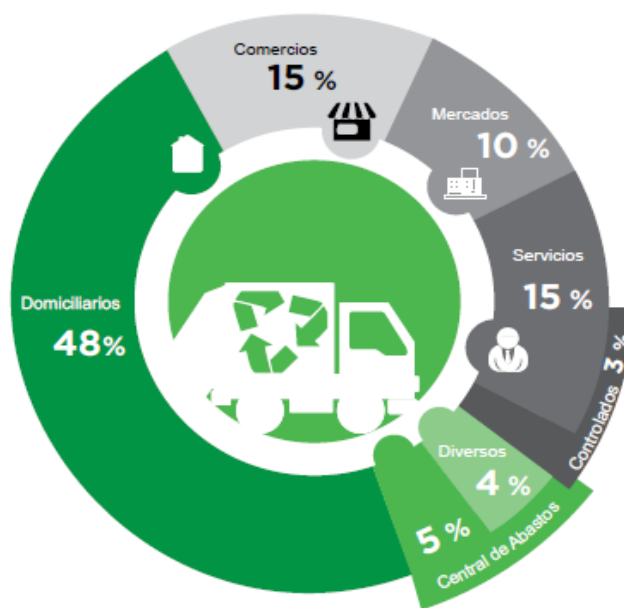


Figura 2.5 Generación de residuos sólidos por fuente [22].

2.3.3 Residuos de maíz (hojas)

El maíz es el principal cultivo en México, aporta el 18% del valor de producción del sector agrícola (88 mil millones de pesos en 2012 y 78 mil

en 2013) y concentra el 33% de la superficie sembrada en el territorio nacional (7.5 millones de hectáreas). El volumen de producción de maíz en 2012 alcanzó 22.1 millones de toneladas y en 2013 aproximadamente se alcanzaron 22.7 millones [24].

México es el sexto mayor productor de maíz a nivel mundial y por cada hectárea se producen 10 toneladas de lo que comúnmente es llamado rastrojo, que simplemente es la hoja de maíz conocida como Totomoxtle, la cual es utilizada para la elaboración de tamales. De este desperdicio se rescata sólo un 1% para uso ornamental o gastronómico [25].

Lo que significa que se produce una cantidad significativa de residuos que no son utilizados y los cuales presentan un bajo de valor de comercialización o en algunos casos ningún valor. Estos podrían ser utilizados para la producción de bioetanol, evitando las quemas no controladas de dicho material, así como su disposición en rellenos sanitarios.

2.4 Pretratamientos

El desarrollo de sistemas energéticos sostenibles (sustentables), utilizando materias primas de biomasa renovables, es una estrategia desarrollada a nivel mundial. La biomasa lignocelulósica contiene polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina, unidos en una estructura compleja.

Los biocombustibles líquidos, tales como bioetanol, se pueden elaborar a partir de este tipo biomasa a través de la fermentación de azúcares derivados de la celulosa y hemicelulosa dentro de los materiales lignocelulósicos, pero la biomasa debe ser sometida a procesos de pretratamiento para liberar los azúcares necesarios para la fermentación [13].

La selección del tipo de pretratamiento a utilizar define de alguna manera los azúcares efectivos que estarán disponibles para la posterior fermentación. Es decir, uno de los principales objetivos que tiene esta etapa es la de aumentar el área de exposición de las fibras de celulosa para una posterior hidrólisis enzimática de los polisacáridos.

La digestibilidad de la celulosa presente en la biomasa lignocelulósica se ve obstaculizada por muchos factores estructurales. En la conversión de la biomasa lignocelulósica en combustible, esta debe ser tratada de modo que la celulosa contenida en las fibras vegetales quede expuesta a ácidos o enzimas que conviertan la celulosa en azúcares fermentables [15].

En la figura 2.6 se muestra la función de los pretratamientos sobre el material lignocelulósico para convertirlo en biocombustibles mediante la fermentación, para que el pretratamiento resulte eficiente debe romper el complejo lignocelulósico, es decir separar la celulosa, la hemicelulosa y la lignina con el objetivo final de que la celulosa quede disponible para las enzimas.

2.4.1 Pretratamiento mecánico

Es un pretratamiento físico consiste en la reducción de tamaño grueso principalmente, por medio de trituración, molienda, utilizado para mejorar la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica. Estos tratamientos aumentan el área disponible de superficie específica, y reducen el grado de polimerización y la cristalinidad de celulosa. La molienda puede reducir el tamaño de partícula de 0.2 a 2 mm, sin embargo, se ha demostrado que una mayor reducción del tamaño de las partículas de biomasa por debajo de 0.40 mm tiene poco efecto sobre las tasas y los rendimientos de la hidrólisis de la biomasa [13][26].

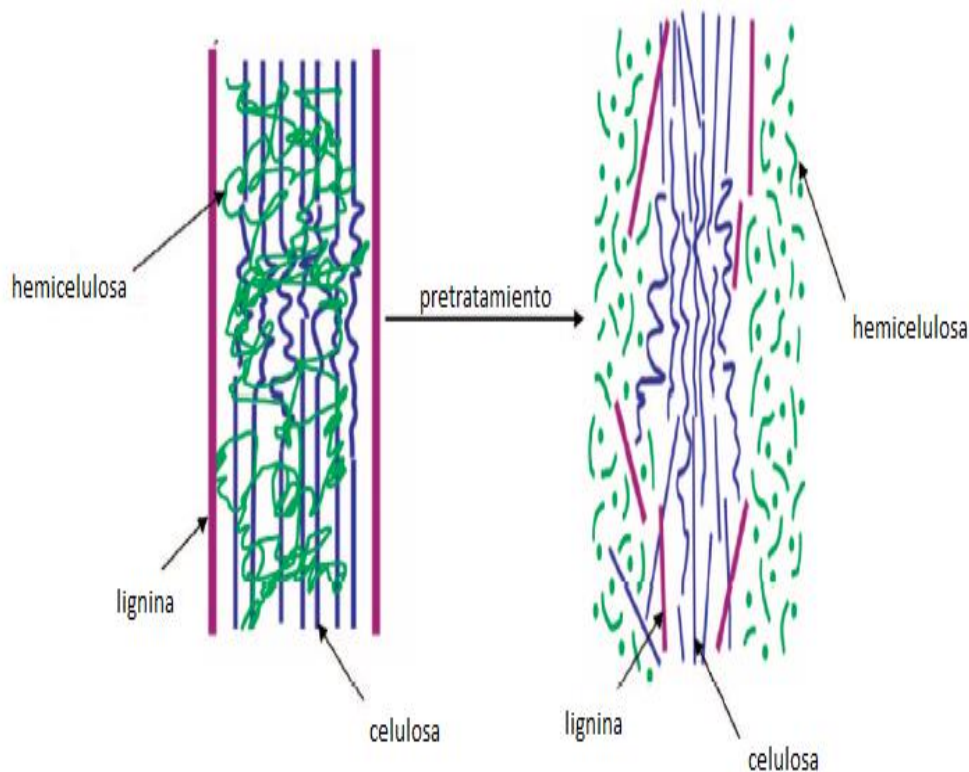


Figura 2.6 Esquema de la función de pretratamiento en la conversión de biomasa en combustible [15].

2.4.2 Pretratamiento biológico

Este tipo de pretratamiento se basa en utilizar microorganismos como es el caso de los hongos marrón, blanco, y de podredumbre blanda los cuales realizan la degradación selectiva de la lignina y de la hemicelulosa, aunque entre los hongos el de podredumbre blanca parece ser el microorganismo más eficaz. El hongo adecuado para el pretratamiento biológico debe tener mayor afinidad por la lignina y degradar más rápido que los componentes de carbohidratos. Los pretratamientos biológicos son seguros, no dañinos para el ambiente y consumen menos energía en comparación con otros métodos de pretratamiento [15].

El pretratamiento de la paja del trigo utilizando hongos de podredumbre blanca, permitió una conversión de 35% de la paja de trigo, en azúcares reductores después de cinco semanas de tratamiento previo con *Pleurotus ostreatus*, en comparación con sólo 12% de conversión de la paja no tratada [15].

2.4.3 Pretratamiento químico

El pretratamiento con productos químicos tales como ácidos, solventes alcalinos, orgánicos, y líquidos iónicos tiene un efecto significativo sobre la estructura de la biomasa lignocelulósica. Aunque la mayoría de los pretratamientos químicos suelen formar cantidades significativas de inhibidores y materiales recalcitrantes de difícil degradación.

2.4.3.1 Pretratamiento con álcalis

El pretratamiento con álcalis tales como: NaOH, KOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, hidracina y amoníaco anhidro causa hinchazón de la biomasa, lo que provoca un aumento en el área de superficie interna de la misma, lo que disminuye el grado de polimerización, y la cristalinidad de celulosa [13].

El pretratamiento alcalino altera la estructura de la lignina y rompe el vínculo entre la lignina y las otras fracciones de carbohidratos en biomasa lignocelulósica. El pretratamiento alcalino es más efectivo con la biomasa de bajo contenido de lignina como residuos agrícolas, pero se vuelve menos eficaz cuando el contenido de lignina de la biomasa aumenta [13].

2.4.3.2 Pretratamiento con ácido

Soluciones de ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, y ácido fosfórico también se han utilizado para hidrolizar la biomasa. Los ácidos concentrados no son

preferidos porque son corrosivos y deben ser recuperados para hacer el pretratamiento económicamente factible.

El pretratamiento con ácido diluido realiza una hidrólisis de la hemicelulosa a sus unidades monoméricas, también hace la celulosa más disponible a las enzimas o los ácidos utilizados en la hidrólisis. Los pretratamientos con ácido pueden requerir el uso de un álcali para neutralizar el hidrolizado.

Los pretratamientos con ácidos se encuentran divididos en dos partes fundamentales, los realizados con altas concentraciones de ácidos (concentrados) y en los que se utilizan bajas concentraciones de estos (diluidos). Los diluidos son hasta ahora los más estudiados, porque además de la disminución de su costo, son menos proclives a formar inhibidores [13].

2.4.3.3 Ozonólisis

El pretratamiento con ozono, el cual es un oxidante potente, permite obtener una alta eficiencia de deslignificación. Esta eliminación de la lignina aumenta su rendimiento después de la hidrólisis enzimática. El pretratamiento es generalmente realizado a temperatura ambiente y presión normal y no tiene formación de compuestos inhibidores que pueda afectar a la posterior hidrólisis y fermentación. La ozonólisis ha sido aplicada en varios residuos agrícolas como la paja de trigo y paja de centeno creciente en ambos casos el rendimiento de la hidrólisis enzimática después del pretratamiento por ozonólisis [6].

2.4.3.4 Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos son sales, que pueden existir como líquidos a temperaturas relativamente bajas; a menudo a temperatura ambiente. Dado que no forman gases tóxicos o explosivos, los líquidos iónicos son llamados "solventes verdes". Los carbohidratos y lignina se pueden disolver simultáneamente en líquidos iónicos porque forman enlaces de hidrógeno entre los iones cloruro y los protones hidroxilo de los azúcares.

Como resultado, la intrincada red de interacciones no covalentes entre los polímeros de la biomasa lignocelulósica se interrumpe eficazmente y se reduce al mínimo la formación de productos de degradación. Sin embargo, la mayoría de los datos que muestran la eficacia de los líquidos iónicos se ha desarrollado utilizando celulosa cristalina pura, y falta evaluar su aplicabilidad a una combinación más compleja de constituyentes de la

biomasa. Este tratamiento ha sido probado en algunos residuos lignocelulósicos como es el caso la paja y de la madera [6].

2.4.4 Pretratamiento físico-químico

Los pretratamientos físicos-químicos utilizados con residuos sólidos son procesos de tratamiento, que comúnmente son realizados en combinación, para separar o transformar sustancias. Por definición, no incluyen procesos biológicos. Algunas de las muchas ventajas de los procesos de tratamiento físico-químicos incluyen el hecho de que requieren poca energía.

Los pretratamientos físicos-químicos de residuos pueden ser usados para tratar tanto los residuos sólidos como los líquidos, así como los residuos orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, tanto los procesos físicos como los químicos son específicos para cada residuo, requiriendo un conocimiento a fondo del residuo que debe ser tratado y un entendimiento de las diversas aplicaciones. Las reacciones químicas deben ser estrictamente supervisadas y comprobadas por un laboratorio calificado. La presencia de sustancias que inhiben el catalizador, cuando éste es usado, puede afectar al éxito del proceso.

El diseño de la instalación y la selección del equipamiento para el tratamiento físico-químico de los residuos son determinados por las propiedades y las características de los residuos a tratar. Se encuentran también influenciados por las regulaciones nacionales y regionales y las normas vigentes.

2.4.4.1 Explosión de vapor

Es un pretratamiento hidrotérmico en el que la biomasa se somete a vapor presurizado durante un período de tiempo que varía de segundos a varios minutos, y de repente sin presión. La autohidrólisis tiene lugar cuando las altas temperaturas promueven la formación de ácido acético a partir de grupos acetilo; el agua también puede actuar como un ácido a altas temperaturas [6].

Los efectos mecánicos son causados porque la presión se reduce de repente y las fibras se separan debido a la descompresión explosiva. Esto aumenta la accesibilidad de las enzimas a las microfibrillas de la celulosa. El aumento de las temperaturas da como resultado la eliminación de hemicelulosa de la fracción sólida y una digestibilidad mejorada de la celulosa [6].

La tecnología de explosión de vapor ha sido probada para la producción de etanol a partir de una amplia gama de materias primas como es el caso de los residuos de olivo [27], residuos herbáceos como rastrojo de maíz [28], y la paja de trigo [29]. Se ha realizado con éxito con las maderas duras y residuos agrícolas o biomasa herbácea pero no es muy eficaz para maderas blandas debido a su bajo contenido de grupos acetilo en la porción hemicelulosa [7].

2.4.4.2 Agua caliente

Este pretratamiento utiliza el agua caliente en lugar de vapor. El objetivo de la agua caliente es solubilizar principalmente la hemicelulosa para hacer que la celulosa más accesible y evitar la formación de inhibidores. Para evitar la formación de inhibidores, el pH debe mantenerse entre 4 y 7 durante el pretratamiento. Manteniendo el pH en ese intervalo minimiza la formación de monosacáridos y la formación autocatalítica de inhibidores de la fermentación. El rendimiento de solubilizado de xilano es generalmente más alto; aunque este resultado disminuye cuando los sólidos aumentan su concentración [14].

2.4.4.3 Explosión de fibra Amoníaco

Es un proceso de pretratamiento fisico-químico donde la biomasa lignocelulósica está expuesta al amoníaco líquido a alta temperatura y presión durante un período de tiempo, y luego la presión se reduce de repente. En un proceso típico, la dosis de amoníaco líquido es de 1-2 kg de amoníaco/kg de biomasa seca, la temperatura es 90 °C, y el tiempo de residencia es 30 min [15].

Este pretratamiento puede mejorar significativamente la tasa de fermentación de diversos cultivos herbáceos y pastos. El proceso no es muy eficaz para la biomasa con un mayor contenido de lignina, tales como periódico y virutas de álamo (25% de lignina). El pretratamiento con amoníaco no produce inhibidores para los procesos biológicos, por lo que un lavado con agua no es necesario. Puede tener un profundo efecto sobre la tasa de hidrólisis de la celulosa [15].

2.4.5 Comparación de los métodos de pretratamientos

Se realizó una tabla con las ventajas y las desventajas que presentan los métodos más usados para el tratamiento de biomasa lignocelulósica. Esta comparación se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Ventajas y desventajas de los diferentes pretratamientos de biomasa lignocelulósica (Adaptado [6]).

Métodos de pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Biológico	Se degrada la lignina y la hemicelulosa Bajo consumo de energía	Baja tasa de hidrólisis
Molienda	Reduce la cristalinidad de celulosa	Alta potencia y consumo de energía
Explosión de vapor	Transformación de lignina y solubilización hemicelulosa Económico Mayor rendimiento de la glucosa y la hemicelulosa	Generación de compuestos tóxicos Degradación de la hemicelulosa parcial
Explosión de CO₂	Aumenta la superficie accesible Económico No implica la generación de compuestos tóxicos	No afecta a la lignina y hemicelulosa Requisitos de muy alta presión
Oxidación húmeda	Eliminación eficiente de la lignina Baja formación de inhibidores Minimiza la demanda de energía (exotérmica)	Alto costo de catalizador de oxígeno y alcalina
Ozonólisis	Reduce el contenido de lignina No implica la generación de compuestos tóxicos	Alto costo de la gran cantidad de ozono necesaria
Ácido concentrado	Alto rendimiento de la glucosa Se lleva a cabo a temperatura ambiente	Alto costo de ácido y necesitan ser recuperados Problemas de corrosión Formación de inhibidores
Ácido diluido	Menos problemas de corrosión que el ácido concentrado Menos formación de inhibidores	Generación de productos de degradación Concentración baja de azúcar en la corriente de salida
Explosión de fibra con Amoniaco	Aumenta la superficie accesible Baja formación de inhibidores	No es eficaz para las materias primas con alto contenido de lignina Alto costo de la gran cantidad de amoniaco

Se realizó una búsqueda sobre algunos de los pretratamientos utilizados en investigaciones para la biomasa lignocelulósica, los resultados obtenidos por varios autores en cuanto a rendimiento en la utilización de los pretratamientos y condiciones de operación para aplicarlos a la biomasa, se resumen en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Pretratamientos y condiciones para su aplicación.

Tipo de residuo	Método	Rendimiento	Temp. (° C)	Tiempo (min)	Compuestos inhibidores	Ref.
Rastrojo de maíz	Flujo agua caliente	alta eliminación de hemicelulosa y lignina	N/R	N/R	si se forman, debe mantenerse un intervalo de pH	[30]
Rastrojo de maíz	Explosión de fibra de amoniaco	98% conversión de glucosa durante hidrólisis	90	5	No	[15]
Pasto	Explosión de fibra de amoniaco	93% conversión de glucosa durante hidrólisis	100	5	No	[31]
Paja de trigo	Líquidos iónicos	54.8% después de haber sido hidrolizado enzimáticamente	130	30	Si	[32]
Paja del trigo	Ácido diluido (0.75 %)	Rendimiento de sacarificación de hasta 74%	121	60	Si	[33]
Olivo	Ácido diluido (1.4 %)	76.5 % de los rendimientos de hidrólisis	210	4	Si	[27]

2.5 Hidrólisis

Para producir los azúcares potencialmente fermentables a partir los polisacáridos de la biomasa lignocelulósica, es necesario someter a la biomasa una etapa de hidrólisis. Los polisacáridos pueden ser hidrolizados ya sea con catalizadores ácidos (hidrólisis ácida) o con catalizadores enzimáticos (hidrólisis enzimática). La hidrólisis ácida se realiza utilizando ácidos concentrados o diluidos [3].

En la utilización de ácidos concentrados, la cantidad usada en la hidrólisis es significativa lo que corresponde a costos elevados, además de la necesaria neutralización del medio antes de la fermentación y los efectos corrosivos asociados al uso de los ácidos, hacen que el proceso no sea rentable económicamente.

Por otra parte la utilización de los ácidos diluidos requiere temperaturas relativamente altas las cuales influyen en la corrosión de los equipos. Es debido a lo anteriormente planteado que los procesos de producción de etanol utilizando hidrólisis enzimática se perfila como la opción más prometedora [3].

Para transformar los residuos a etanol se requiere el desdoblamiento de la celulosa y hemicelulosa (principales componentes de los residuos) hasta azúcares, como la glucosa y la xilosa, para posteriormente ser fermentados hasta etanol.

2.6 Estrategias de fermentación

La producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos, se realiza mediante el proceso de fermentación, el cual consiste en fermentar azúcares liberados durante la hidrólisis enzimática, los cuales son convertidos a etanol y CO₂, principalmente [3].

El balance de la conversión de la glucosa y xilosa a etanol es de 0.51 gramos de etanol por gramo de azúcar. En este proceso es muy difícil obtener conversiones tan altas ya que las levaduras derivan cierta parte de la energía que consumen hacia el metabolismo celular y el crecimiento [3]. Este rendimiento también puede encontrarse en la literatura como 0.49 gramos de etanol por gramo de azúcar.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es el microorganismo más utilizado en el proceso de fermentación alcohólica, pues este microorganismo puede usar todo tipo de hexosas y produce etanol con unos rendimientos cercanos al máximo teórico (0.51 g/g). Se puede emplear en la producción de etanol a partir de lignocelulosa, pues esta muestra gran tolerancia a los productos tóxicos generados durante el pretratamiento.

La limitación principal que tiene *Saccharomyces cerevisiae* es cuando es utilizada en la fermentación de los azúcares que provienen de la hemicelulosa ya que no es capaz de fermentar pentosas, como la xilosa, la cual está presente en los materiales lignocelulósicos. El microorganismo empleado debe ser también capaz de tolerar los posibles tóxicos generados durante el pretratamiento [3].

2.6.1 Hidrólisis y fermentación separadas

La estrategia convencionalmente empleada para el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, es el proceso de hidrólisis y fermentación separadas (HFS), en el que la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de la glucosa se realizan en dos reactores diferentes. En este tipo de proceso la fracción rica en celulosa es primeramente hidrolizada a glucosa. Cuando termina la etapa de hidrólisis y se separan los residuos de lignina, la glucosa resultante es fermentada y convertida a etanol. Si se utiliza un medio líquido con alto contenido de glucosa, se puede realizar recirculación de los microorganismos tras la fermentación [3].

2.6.2 Sacarificación y fermentación simultáneas

El objetivo de la estrategia de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) es liberar la glucosa por medio de acción de las celulasas durante la hidrólisis y que estas sean directamente metabolizadas a bioetanol por las levaduras. Con esta estrategia se obtienen rendimientos de hidrólisis más altos, utilizando menores dosis de enzimas, y se reduce del tiempo total de proceso y son más altas las productividades de bioetanol.

La estrategia de proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) ha sido ampliamente utilizada en la producción de etanol a partir de fuentes amiláceas y residuos lignocelulósicos, presentando ventajas comparativas con los procesos convencionales donde las etapas se desarrollan en forma

independiente; y se ha modificado al integrar la etapa de licuefacción, gracias al uso de enzimas con capacidad de hidrolizar sin necesidad de realizar los procesos de cocción y licuefacción a altas temperaturas [34].

En la tabla 2.3 se muestran las condiciones de operación, las enzimas, los microorganismos, pretratamientos realizados y producción final de bioetanol de algunas investigaciones realizadas utilizando la sacarificación y fermentación simultáneas como estrategia de fermentación las cuales se toman como base para la realización de este trabajo.

Tabla 2.3 Sacarificación y fermentación simultáneas a diferentes residuos.

Proceso	Pret.	Enzimas	Tiempo (h)	Temp. (°C)	pH	Levadura	Sustrato	Bioetanol	Ref.
(SSF)	Ácido diluido (0.75%)	Celulasa, B-glucosidasa, xylanasa y esterasa 565 ± 10 mg/g.	72	35	6.0	<i>S. cerevisiae</i>	Paja de trigo	17.1 g/L	[33]
(SSF)	Mecánico (molino de cuchillas) Térmico (98 °C por una hora)	CelluclastMR 1.5 L 8 µl/g de sólido	96	30	5.0	<i>S. cerevisiae</i> RH 218 20%p/p	Residuos de mango común	0.76 % AR*	[35]
(SSF)	Explosión a vapor	Celluclast 1.5L (50 FPU)	72	50	4,8	<i>K. marxianus</i>	Residuo de la extracción del aceite de oliva	19.7 g/L	[36]
(SSF)	NaOH a la temperatura ambiente durante 24 h	celulasa comercial de Acceller- ASE 1000	72	42	5.0	<i>K. marxianus</i> (1 g / L)	Bagazo de caña	24.6 g / L	[37]

*Azúcares Reductores

2.6.3 Sacarificación y cofermentación simultáneas

Los materiales lignocelulósicos, en el caso particular de las maderas duras y los residuos agrícolas, pueden contener entre 15-30% de pentosas (principalmente xilosa) en su composición. Es por ello que la fermentación de la xilosa es esencial para tener un eficiente y rentable proceso de producción de etanol.

Los procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) se realizan normalmente sobre la fracción del residuo sólido insoluble (RSI), lo que implica la fermentación mayoritariamente de las hexosas. Dependiendo del grado de integración del proceso, también puede implicar la fermentación de pentosas cuando se utiliza el material pretratado completo (MPC) en el proceso de SFS.

La utilización del MPC y el uso de levaduras fermentadoras de pentosas darían lugar al proceso denominado sacarificación y cofermentación simultáneas (SCFS). Este es el proceso en el que las fracciones sólida y líquida se fermentan por separado, con lo cual se podrían optimizar las condiciones para la fermentación de la glucosa o xilosa en cada una de ellas. Sin embargo, al emplear el MPC, ambos azúcares están presentes en el medio y deben ser fermentados simultáneamente.

2.6.4 Bioproceso consolidado

El bioproceso consolidado (BPC) es el proceso que involucra la combinación de las 4 reacciones biológicas que se necesitan para la transformación del material lignocelulósico a etanol. Este proceso se realiza en un único reactor: producción de las enzimas (celulasas y hemicelulasas), hidrólisis del material pretratado a azúcares, fermentación de las hexosas y fermentación de las pentosas. Para la realización del proceso mencionado anteriormente se necesita un único microorganismo, o mezcla de éstos, capaces de hidrolizar y fermentar la biomasa pretratada sin adición de enzimas exógenas [12], [38].

En la tabla 2.4 se muestra una comparación presentando las principales ventajas y desventajas de las estrategias de fermentación utilizadas actualmente para producción de bioetanol, como la hidrólisis y fermentación separadas, la sacarificación y fermentación simultánea, la sacarificación y cofermentación simultáneas y el bioproceso consolidado.

Tabla 2.4 Comparación de las estrategias de fermentación (Adaptado de [3])

	HFS	SFS	SCFS	BPC
CARACTERÍSTICAS	<ul style="list-style-type: none"> -Enzimas hidrolizan las cadenas de celulosa a monómeros de glucosa. -La glucosa resultante es convertida a etanol en el paso posterior de fermentación. 	<ul style="list-style-type: none"> -Enzimas hidrolizan la celulosa y el microorganismo convierte simultáneamente la glucosa resultante a etanol. 	<ul style="list-style-type: none"> -Enzimas hidrolizan la celulosa y simultáneamente el microorganismo convierte la glucosa resultante a etanol. - La xilosa solubilizada en el hidrolizado es también fermentada a etanol. 	<ul style="list-style-type: none"> - Conversión de los azúcares celulósicos y hemicelulósicos a etanol por un único microorganismo o mezcla de éstos.
VENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> - Condiciones óptimas para cada paso. -Posibilidad de reciclaje de las células. 	<ul style="list-style-type: none"> -Amplia disponibilidad de microorganismos eficientes para este tipo de procesos. -Disminución de costes y empleo de menores concentraciones de enzimas. - Se minimiza la inhibición por producto final. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aprovechamiento de la mayoría de azúcares presentes en la materia prima. -Disminución de costes y empleo de menores concentraciones de enzimas. - Se minimiza la inhibición por producto final. 	<ul style="list-style-type: none"> - No se necesita la adición de enzimas para realizar la hidrólisis.
DESVENTAJAS	<ul style="list-style-type: none"> - Proceso en dos pasos con el consiguiente aumento de costes que ello supone. - Inhibición por producto final durante la hidrólisis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las condiciones de proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas para hidrólisis y fermentación. - Imposibilidad de reciclaje de las células. - No hay fermentación de las pentosas. 	<ul style="list-style-type: none"> -Los microorganismos fermentadores de pentosas no están ampliamente desarrollados. - Las condiciones de proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas para hidrólisis y fermentación. - Imposibilidad de reciclaje de las células. 	<ul style="list-style-type: none"> -No existen actualmente microorganismos con todas las características requeridas para un proceso eficiente.

A pesar de las innumerables ventajas que implicaría la realización de este tipo de proceso, en la actualidad todavía no existen microorganismos con

todas las características requeridas para un eficiente bioproceso consolidado. No obstante, existen grandes expectativas de poder superar las limitaciones de los actuales microorganismos mediante dos estrategias. La primera está orientada a manipular microorganismos que muestran una alta actividad celulolítica con el fin de mejorar su producción de etanol, aumentando los rendimientos o la tolerancia al mismo [38].

2.7 Antecedentes

En un trabajo realizado por (Fernandes *et al.*, 2015) donde se plantea que la elección correcta del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica permite obtener altas conversiones de biomasa a bioetanol celulósico a partir de recursos renovables. En esta investigación se utiliza la *Cynara cardunculus* (cardo) y se somete a los procesos de hidrólisis y fermentación separadas y a la sacarificación y fermentación simultánea, además como pretratamiento utilizó la explosión de vapor el cual permitió la solubilización parcial de la hemicelulosa, luego se realizó la eliminación parcial de la lignina degradada. La fermentación de bioetanol en el modo SFS era más rápido que el proceso que proceso de hidrólisis y fermentación separadas, y el proceso SFS proporcionó los mejores resultados: una concentración de etanol 18,7 g/ L y la eficiencia de la fermentación de 66,6%

En la investigación realizada por (Saha et al.,2005) realizó una comparación de los procesos de sacarificación y fermentación independiente en contra del proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) utilizando como residuo la paja de trigo. Obteniendo los mejores resultados para el caso de SFS, la utilización de la sacarificación y la fermentación simultánea ayudó aumentar el rendimiento de etanol desde 13 ± 2 a 17 ± 0 g/L y contribuyó también disminución del tiempo de fermentación de 136 a 112 h. A pesar de realizar una disminución considerable del tiempo de proceso en estudios posteriores como es el caso de la investigación en curso se aboga por encontrar tiempos de procesos menores a 70 h, con el objetivo de realizar el proceso de producción de bioetanol con el menor gasto posible de energía.

En otra investigación realizada por (Mejías et al.,2002) se utilizó el residuo de la extracción del aceite de oliva con un pretratamiento químico de una solución ácida (0,5 % (p/v) H_2SO_4) combinado con la explosión a vapor. El pretratamiento realizado con ácido sulfúrico, se utilizaron 200 g de material posteriormente se filtraron y lavaron con agua abundante para eliminar el ácido. La fracción de pulpa no se sometió a pretratamiento ya que en experiencias anteriores se había comprobado que no aumentaba el

rendimiento de hidrólisis. Se utilizaron diferentes concentraciones de un complejo celulolítico, Celluclast 1.5L, con una actividad de 50 Unidades de Papel de Filtro (FPU).

Los resultados de los ensayos de SFS con la pulpa en las mismas condiciones se obtuvieron rendimientos promedios calculados de 8,1 g/L. En los ensayos con pulpa, los rendimientos de SFS disminuyeron al aumentar la concentración de sustrato. Esto se debe principalmente a una disminución del rendimiento en la etapa de fermentación y no de hidrólisis ya que los rendimientos de hidrólisis no se ven afectados por el incremento en la concentración de sustrato. Para el caso del hueso pretratado se obtuvieron rendimientos cercanos a los 20 g/L utilizando en este caso la combinación de los dos pretratamientos.

Es importante señalar que muchas de las investigaciones realizadas utilizando residuos lignocelulósicos para la producción de bioetanol se enfocan en encontrar las mejores condiciones de operación para este proceso por separado, sin embargo, sería interesante encontrar un equilibrio entre las principales condiciones de operación para el proceso de SFS, como son: el tipo de pretratamiento, la concentración de enzimas y el tiempo de proceso de manera tal que el proceso lo más eficiente posible.

Además de que en las investigaciones revisadas durante esta investigación para someter los residuos al proceso de SFS de después de ser pretratados, siempre se realiza una etapa intermedia ya sea la deslignificación o los lavados con agua caliente para eliminar residuos tóxicos que se producen durante los pretratamientos elevando considerablemente los costos del proceso, en vez de utilizar el material pretratado completo (MPC) y la utilización de levaduras termotolerantes y tolerantes a los compuestos tóxicos formados durante los pretratamientos, premisas fundamentales en la realización de esta investigación.

Por otra parte, explorar otros residuos que presenten un mayor impacto ambiental que los que se han estudiado hasta ahora los cuales en su gran mayoría provienen de procesos industriales a frutas y vegetales que presentan altos contenidos de azúcares reductores que por ende se deben obtener mayores rendimientos en la producción de bioetanol.

Pero realizar investigaciones a partir de aquellos residuos que no presentan una gran cantidad de azúcares libres para su conversión debería tomarse como una prioridad para el campo de los estudios ambientales

fundamentalmente, los cuales, aunque no presenten una alta eficiencia en cuanto a producción de combustibles si presentan una gran importancia para mejorar cada día la gestión de los residuos orgánicos.

3 METODOLOGÍA

En este trabajo se probó un pretratamiento químico de residuos orgánicos utilizados en el proceso de fermentación. El objetivo del pretratamiento es romper la estructura de la lignocelulosa mediante una pre-hidrólisis, solubilizar la fracción de hemicelulosa de los residuos y hacer que la celulosa sea más accesible a las enzimas durante el proceso de hidrólisis; además eliminar la lignina, para interrumpir la estructura cristalina de la celulosa, y para aumentar la porosidad de los materiales [1][6].

El pretratamiento químico propuesto se realizó con ácido diluido, pues de los dos pretratamientos químicos con ácidos, concentrado y diluido, es el que se muestra más atractivo, ya que ha demostrado solubilizar eficazmente e hidrolizar hemicelulosa en azúcares monoméricos, exponiéndolo de las fibras de celulosa. Entre los métodos de pretratamientos el que se realiza con ácido diluido se ha estudiado ampliamente porque es eficaz y barato [1][6].

Las materias primas que se utilizaron en este trabajo son residuos de poda, residuos de alimentos y residuos de maíz (hojas). Los residuos de alimentos se obtuvieron del comedor de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, los residuos de poda se obtuvieron de la planta de composta de la Universidad Nacional Autónoma de México y los residuos de maíz se obtuvieron de un mercado sobre ruedas situado en Eje 10 (Pedro Enríquez Ureña) de la colonia Pedregal de Santo Domingo, en la Delegación Coyoacán.

La metodología utilizada constó de 5 etapas principales (figura 3.1). Durante cada una de las etapas se realizaron diferentes pruebas analíticas con el objetivo de evaluar el proceso en cuanto a la composición de los residuos y la producción de azúcares fermentables.

1. Acondicionamiento de la muestra: molienda de la muestra y caracterización.
2. Análisis de composición de los residuos: determinación del contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos.
3. Pretratamiento: químico con ácido diluido.
4. Fermentación: proceso de sacarificación y fermentación simultánea (hidrólisis enzimática).
5. Determinación de bioetanol: el bioetanol se separó de los remanentes para su posterior análisis. Se cuantificó la producción de bioetanol con cromatografía de gases.

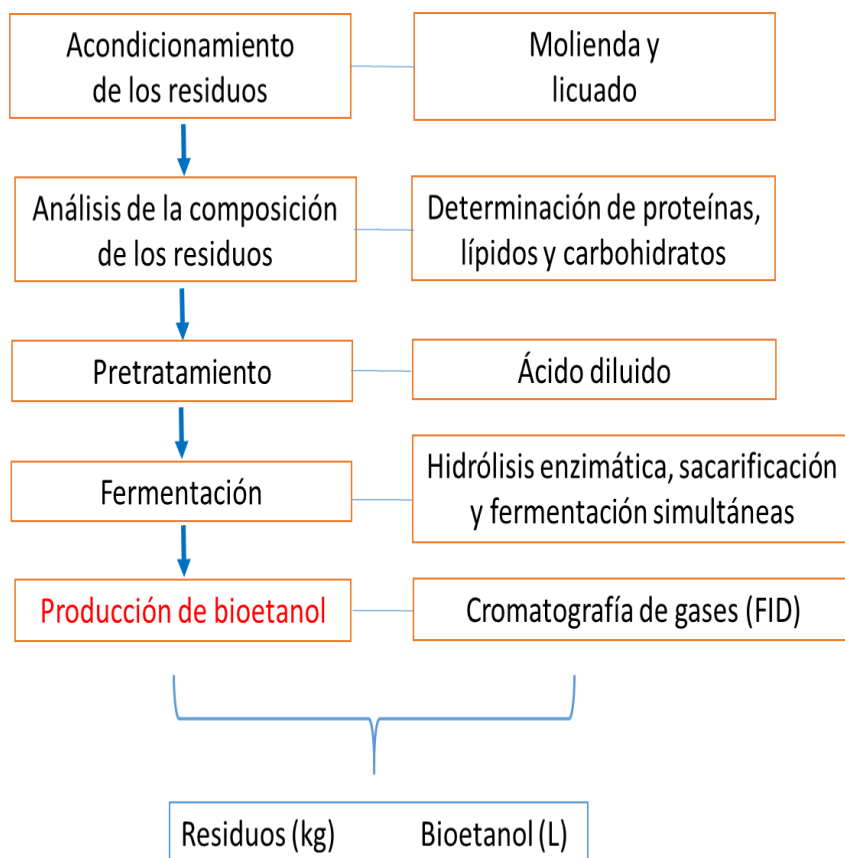


Figura 3.1 Esquema general de la metodología.

3.1 Acondicionamiento y caracterización de la muestra

Para lograr la caracterización de los residuos es necesario reducir el tamaño de las partículas que los conforman, homogenizando la muestra y obteniendo así resultados con mayor significancia.

Para facilitar las determinaciones químicas y bromatológicas de los residuos, una cantidad conocida de muestra se trituró con un molino manual marca Imperial y se licuó en una licuadora industrial marca Tapiza modelo 2T2PL. En la tabla 3.4 se presentan las determinaciones que se efectuaron a los residuos y los métodos usados en cada caso.

La caracterización de los residuos constituyó un paso fundamental durante el desarrollo de esta investigación, pues proporcionó información valiosa sobre la composición y el contenido de nutrientes de la materia orgánica. Se determinaron los siguientes parámetros: sólidos totales (ST) los cuales a su vez están compuestos por sólidos fijos (SF) y sólidos volátiles (SV). También se determinó: humedad, demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno Kjeldahl, fibra neutra detergente (FND) que contiene celulosa, hemicelulosa y lignina, fibra ácida detergente (FAD) que contiene celulosa y lignina (relacionando ambos resultados se puede obtener el contenido de las diferentes fibras).

3.2 Pretratamiento de la muestra

Se seleccionó el ácido diluido para pretratar químicamente a la muestra, con base en publicaciones recientes [33] y [27], en los cuales se utilizaron el ácido diluido para despolimerización de hemicelulosa, para romper la cristalinidad de la celulosa y para hacerla mucho más accesible a las enzimas en la hidrólisis.

El pretratamiento se llevó a cabo con ácido diluido con una concentración de 1 % y a una temperatura de 210°C durante 4 minutos. Este pretratamiento suele ser muy agresivo y ha sido utilizado en residuos con hueso y en maderas duras reportando resultados satisfactorios, aunque es muy proclive a la formación de sustancias inhibitoras como ácido acético, furfural y 5-hidroximetilfurfural.

Por lo que en cuanto se observó algún indicador de inhibición en la producción de azúcares fermentables se procedió a cambiar la temperatura y así evitar la formación de compuestos.

3.3 Determinación de azúcares reductores totales

Para determinar los azúcares reductores totales se utilizó la técnica analítica de ácido 3,5 dinitrosalicílico o DNS como también se le conoce: la cual es una técnica de óxido-reducción en la que el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido mientras que el grupo aldehído del monosacárido es oxidado. La reducción de este reactivo proporciona una coloración amarilla la cual aumenta su intensidad de acuerdo a la concentración de azúcares reductores presentes en el medio, esto se logra mediante la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro [39]. (Véase apéndice A en la página 88).

En la figura 3.2 se muestran las diferentes intensidades de coloración amarilla (correspondientes con la cantidad de azúcares presentes en la muestra) y la posterior determinación de absorbancias en el espectrofotómetro.

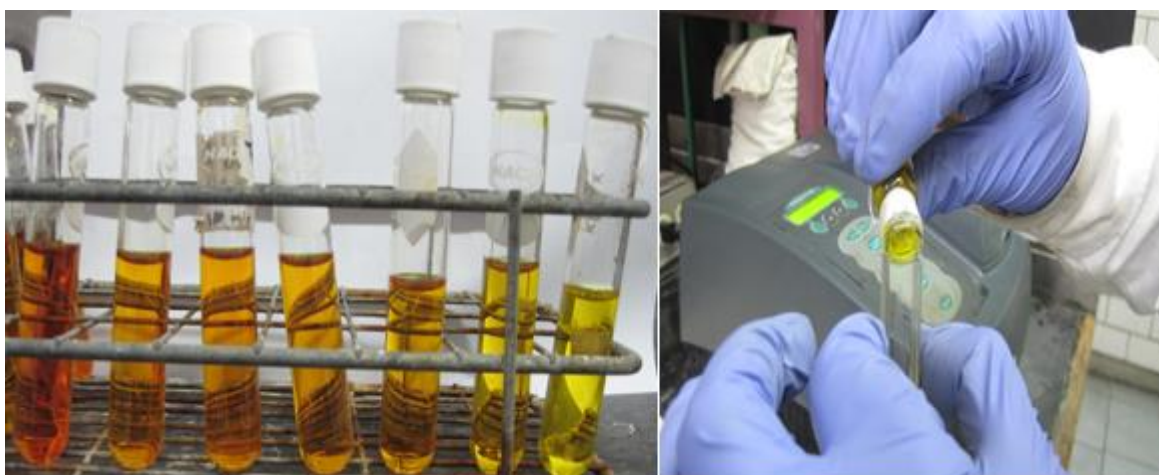


Figura 3.2 Técnica para determinación de azúcares reductores totales (DNS).

3.4 Fermentación

La fermentación que se utilizó en esta investigación corresponde a la estrategia de sacarificación fermentación simultánea (SFS), los objetivos principales de su aplicación fueron disminuir los tiempos en la producción de bioetanol, la cantidad de enzimas a utilizar, el número de etapas el proceso y los costos. El esquema general de la fermentación utilizada se muestra en la figura 3.3.

La estrategia de fermentación se realizó para los tiempos de 48 y 72 horas, una temperatura de 32 ± 1 °C y un pH entre 5 y 6. La hidrólisis enzimática

se realizó utilizando una combinación de las enzimas comerciales CELUZYME (celulasa, hemicelulasa, beta-glucanasa), CELUZYME XB (xylanasa) y CELLUCLAST 1.5 L a diferentes relaciones. Para realizar la fermentación se agregó una levadura industrial del grupo *Saccharomyces cerevisiae* transcurrido el tiempo del proceso, se determinó cuánto bioetanol se obtuvo. En la figura 3.3 se esquematiza la metodología utilizada.

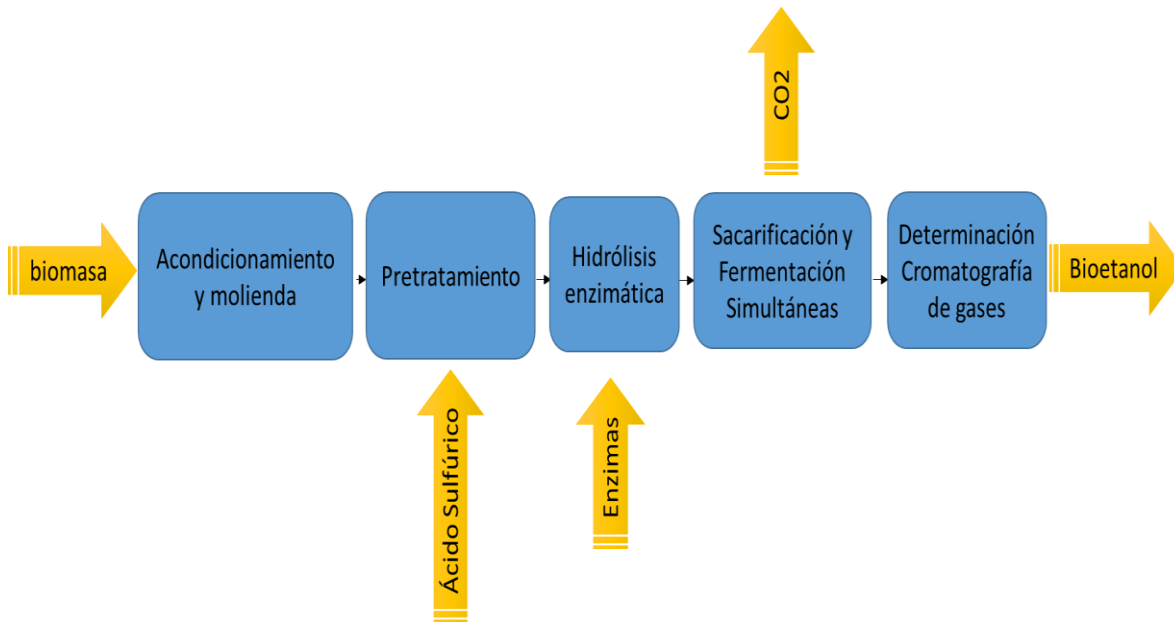


Figura 3.3 Esquema general de proceso de sacarificación y fermentación simultánea.

3.5 Diseño de experimentos

Para el desarrollo de este trabajo se desarrolló un diseño de experimentos factorial 2^k (3 factores con 2 niveles) el cual tiene como objetivo detectar los factores significativos (o interacciones entre factores) realizando un número mínimo de experimentos. Posteriormente, se realizó un experimento con los factores que en esta primera etapa resultaron significativos [40].

El modelo estadístico para este diseño es:

Para $i = 1, \dots, I$, $j = 1, \dots, J$, $k = 1, \dots, K$,

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + U_{ijk} \quad (1)$$

donde:

$\alpha_i, \beta_j, \gamma_k$ = Efectos principales

$(\alpha\beta)_{ij}, (\beta\gamma)_{jk}, (\alpha\gamma)_{ik}$ = Interacciones de segundo orden

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ = Interacciones de tercer orden

Hipótesis:

H0: no hay diferencia estadística entre los factores.

H1: al menos un factor produce la variación.

Se utilizará un nivel de confianza de 95% es decir 0.05 probabilidad para el valor crítico.

El diseño constó de 8 experimentos según las ocho combinaciones de los signos de los factores (factor A, factor B, factor C). El diseño se resume en la siguiente tabla 3.1, donde cada fila es un experimento distinto.

Tabla 3.1 Matriz general del diseño de experimentos.

Matriz de experimentos			
No.	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Se realizaron para cada experimento 3 réplicas los que dio un total de 72 ensayos, los factores y los niveles utilizados en este diseño se muestran en la tabla 3.2. Este diseño se desarrolló en el software Minitab 17 para encontrar las diferencias estadísticas entre los factores y niveles de este diseño de experimentos.

Cada residuo se sometió a una hidrólisis enzimática con cada uno de las combinaciones de enzimas, con o sin pretratamiento y a 48 y 72 horas respectivamente, en la siguiente tabla 3.3 se muestra la matriz formada para este diseño de experimento en particular.

Tabla 3.2 Variables y niveles del diseño experimentos.

Variables	Código	Nivel alto (+)	Nivel bajo (-)
Pretratamiento	A	con	sin
Concentración (CELUZYME : CELUZYME XB)	B	alta	baja
Tiempo	C	72 horas	48 horas

Tabla 3.3 Combinación de los niveles y los factores del diseño.

Plan de experimentación			Respuestas
A	B	C	
No	baja	48 horas	<i>y1</i>
Si	baja	48 horas	<i>y2</i>
No	alta	48 horas	<i>y3</i>
Si	alta	48 horas	<i>y4</i>
No	baja	72 horas	<i>y5</i>
Si	baja	72 horas	<i>y6</i>
No	alta	72 horas	<i>y7</i>
Si	alta	72 horas	<i>y8</i>

3.6 Métodos analíticos

En la tabla 3.4 se muestran las técnicas analíticas para realizar la caracterización de todos los residuos utilizados durante el desarrollo de este trabajo.

Tabla 3.4 Técnicas analíticas

Determinación	Método
Humedad	Gravimetría. Se obtiene por diferencia entre la masa inicial y los sólidos totales determinados (APHA 4500 H-B)
Sólidos totales (ST)	Gravimetría. Sólidos secados a una temperatura de 103 a 105 °C (APHA 2540-B)
Sólidos volátiles y Fijos (SV y SF)	Gravimetría. Sólidos previamente secados a una temperatura de 103 a 105 °C e incinerados a 550 °C (APHA 2540-B)
Demanda química de oxígeno (DQO)	Fotometría. Digestión por reflujo cerrado a 150 °C con reactivos preparados a 600 nanómetros (nm)
Nitrógeno Kjeldahl (NK)	Titulación. Digestión ácida con catalizador de selenio y posterior neutralización y titulación con H ₂ SO ₄ 0.02N por el método de Wieninger.
Fibra neutra detergente	Extracción química con una solución detergente neutra bajo reflujo, seguido de determinación gravimétrica del residuo de fibra (AOAC-aNDF) [41]
Fibra ácida detergente	Extracción química con una solución detergente ácida (AOAC-ADF)[41]
Carbohidratos	Fotometría con fenol y sulfato de hidracina a 490 nm por el método colorímetro de Dubois (Dubois et al., 1956)
Grasas y aceites	Gravimetría. Extracción con éter y posterior evaporación (Método Soxhlet APHA 5520-D)

El contenido de proteína cruda se determinó por el método Kjeldahl, el cual mide el contenido de nitrógeno total en la muestra, convirtiendo este resultado a un valor total de proteína cruda, mediante una multiplicación por el factor empírico 6.25 (este factor de conversión se basa en la suposición de que la proteína promedio, contiene alrededor de 16% de nitrógeno por unidad de peso) [42].

3.7 Determinaciones y producción de bioetanol

La determinación de bioetanol se realizó inyectando las muestras extraídas de cada una de las corridas del proceso en el cromatógrafo de gases marca Agilent technologies modelos 7890a gc system (figura 3.4).

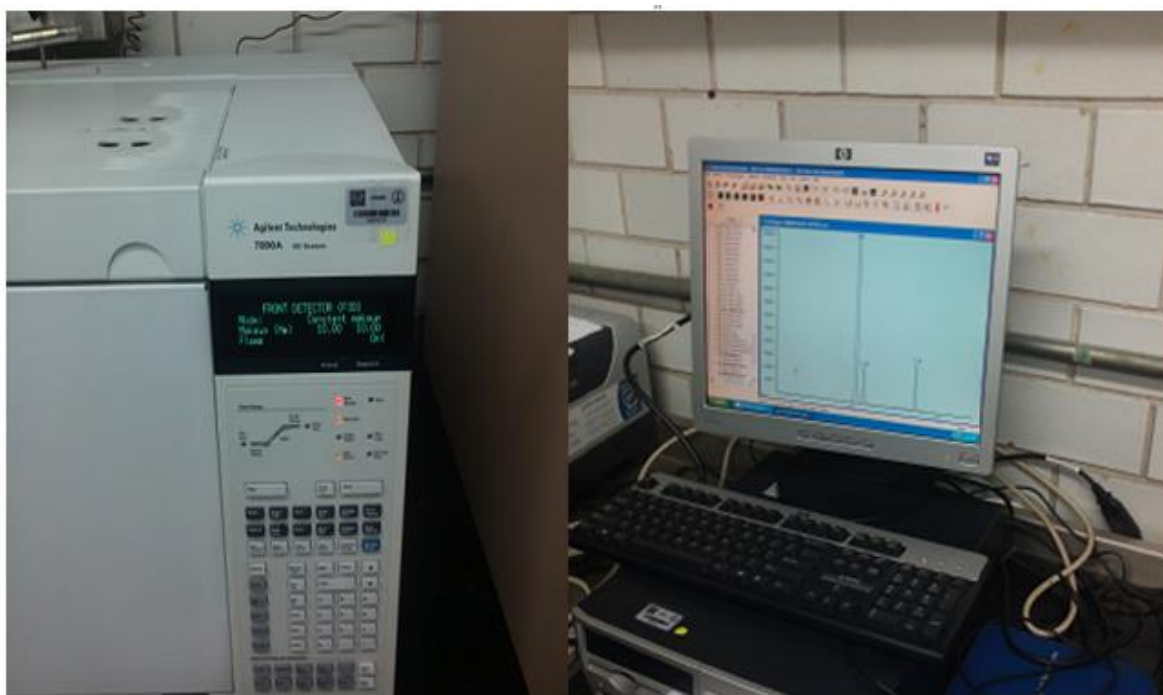


Figura 3.4 Instalación del cromatógrafo de gases Agilent technologies modelos 7890a gc system.

Se establecieron condiciones reportadas en literatura para realizar la determinación de bioetanol, como son la temperatura del horno, la temperatura del inyector, el volumen de inyección entre otras. En la tabla 3.5 se muestran las condiciones con las cuales se determinó la presencia del bioetanol. Durante toda la experimentación y para cada una de las muestras se mantuvieron las mismas condiciones para lograr una trazabilidad en los resultados.

Tabla 3.5 Condiciones del cromatógrafo de gases para determinar bioetanol.

Temperatura del horno	50 °C
Temperatura del detector	210 °C
Temperatura del inyector	200 °C
Volumen de inyección	1.2 µL
Tipo de columna	Agilent190915-433
Rampa	50 °C/3 min

Se realizó una curva de calibración estándar de etanol en porcentajes de 0 a 100 % contra la relación de áreas pico con el objetivo de cuantificar la cantidad de bioetanol que se produce. La curva realizada con porcentajes de 0 a 100 resultó ser demasiado grande, pues las producciones de esta investigación no rebasaban el 1%, por lo que se realizó una curva de 0 a 1 % (como se muestra en el Apéndice C en la página 99) para poder determinar el bioetanol producido.

4 RESULTADOS

En este capítulo se presentan y discuten los resultados obtenidos durante la fase experimental. Se compararon las eficiencias entre los diferentes experimentos, lo cual permitió determinar las condiciones (tamaño de partícula, temperatura, pH, condiciones para el pretratamiento y concentración de enzimas) que favorecen el proceso. Además, se presentan los rendimientos de producción de bioetanol, así como los efectos de cada uno de los factores y niveles planteados en el diseño de experimentos presentado en la metodología.

4.1 Acondicionamiento y caracterización de la muestra

Para cumplir con la primera etapa de la metodología planteada que consistió en el acondicionamiento y preparación de la muestra, se realizó una caracterización física-química para los diferentes residuos (alimentos y poda y hojas de maíz); utilizando 500 g de cada uno de los residuos que provienen de una muestra de 6 kg previamente molidos, empleando un molino de discos, y luego una licuadora industrial para el caso de los residuos de alimentos, ambos instrumentos usados para reducir el tamaño de partícula en un intervalo de 0.2 a 3.0 mm como se muestra en la figura 4.1.

El pretratamiento mecánico se utilizó para mejorar la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos, mediante el rompimiento de las estructuras

complejas, aumentando su superficie de contacto y mejorando su digestibilidad para la hidrólisis enzimática [6], [15].



Figura 4.1 Proceso de trituración y molienda de los residuos.

Para la caracterización de los residuos se utilizaron los métodos estándar anteriormente planteados en el capítulo 3 (tabla 3.4). Los resultados de esta caracterización se muestran en la tabla 4.1 (poda), 4.2 (alimentos) y 4.3 (hojas de maíz) respectivamente.

De la composición de los residuos de poda se puede resaltar que el 53 % corresponde a humedad y el 46 % son sólidos, de los cuales el 91 % son compuestos orgánicos y 9 % restante son inorgánicos, con una relación SV/ST del 91 %. El nitrógeno Kjeldahl representa el 1.7 %ST, mientras que las proteínas ocupan el 10.4%SV para el caso de los residuos de poda.

Tabla 4.1 Caracterización de los residuos de poda.

ST (g/kg)	SV (g/kg)	SV/ST (%)	SF (g/kg)	Humedad (%)	DQO (g/kg)	NK (g/kg)
465.0 ± 8.9	426.1 ± 9.0	91	38.89±0.98	53	275 ± 3.0	7.7 ± 0.1
Material lignocelulósico (%)		Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)		Lignina (%)	
44.1		29.6	11.2		3.3	

Tabla 4.2 Caracterización de los residuos de alimentos.

ST (g/kg)	SV (g/kg)	SV/ST (%)	SF (g/kg)	Humedad (%)	DQO (g/kg)	NK (g/kg)
205.9 ± 4.0	176.45 ± 3.9	85	29.44± 0.9	79	112.2 ± 5.3	2.9 ± 0.1
Material lignocelulósico (%)		Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)		Lignina (%)	
38.1		27.1	6.7		4.2	

La composición de los residuos de alimentos consiste en 79 % de humedad y 21 % de sólidos, de los cuales el 85 % son compuestos orgánicos y 15 % restante son inorgánicos, con una relación SV/ST de 85 %. El nitrógeno Kjeldahl representa el 2.9 %ST. En el caso de los residuos de alimentos las proteínas corresponden a un 17.9 % del total de SV.

En el caso de los residuos de maíz (hojas) en su composición se tiene un 83.3 % de humedad y 16.7 % de sólidos, de los cuales el 94 % son compuestos orgánicos y 6 % que resta son inorgánicos, con una relación SV/ST del 94 %. El nitrógeno Kjeldahl representa el 1.3 %ST. Las proteínas en la caracterización de los residuos de maíz corresponden a un 8.1 % del total de SV.

Tabla 4.3 Caracterización de los residuos de maíz (hojas).

ST (g/kg)	SV (g/kg)	SV/ST (%)	SF (g/kg)	Humedad (%)	DQO (g/kg)	NK (g/kg)
167.0 ± 5.7	157.0 ± 4.7	94.0	10.0± 1.4	83.3	89 ± 4.6	2.2 ± 0.02

Material lignocelulósico (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
63.3	29.4	29.9	4.0

El material lignocelulósico representa 44.1 % (poda), el 38.1 % (alimentos) y el 63.3 % (hojas de maíz) de los SV de cada residuo; el contenido más alto resultó ser el de celulosa con 29.6 %, 27.1 % y 29 %, respectivamente. Esto es algo que resulta conveniente para la producción final de bioetanol, pues mientras mayor contenido de celulosa se tenga, más posibilidades de generar la glucosa que posteriormente se fermentará. La distribución en cuanto a porcentaje de la caracterización de los residuos se presenta en la figura 4.2.

En la figura 4.2 se presentan los parámetros tomados en cuenta en la determinación de la composición de los residuos como son: el valor de humedad, el material seco el cual se representa mediante sólidos totales (ST), que a su vez están compuestos por la suma de los sólidos volátiles (SV) y los sólidos fijos (SF). Además, están representados los porcentajes de carbohidratos, lípidos y proteínas, así como el desglose de la composición de los carbohidratos de ambos residuos en expresados en celulosa, hemicelulosa y otros azúcares.

El contenido de celulosa y hemicelulosa de los residuos son aspectos importantes a tener en cuenta pues si se encuentran altos contenidos de estos compuestos es muy posible que se tengan rendimientos de producción de bioetanol alto. De lo reportado en literatura aproximadamente el 30% por ciento de celulosa se convierte en glucosa posteriormente fermentable por microorganismos productores de bioetanol. Aunque depende de diversos factores como son el tipo de material lignocelulósico, la efectividad del pretratamiento utilizado, la hidrólisis enzimática y el tipo de microorganismo fermentador.

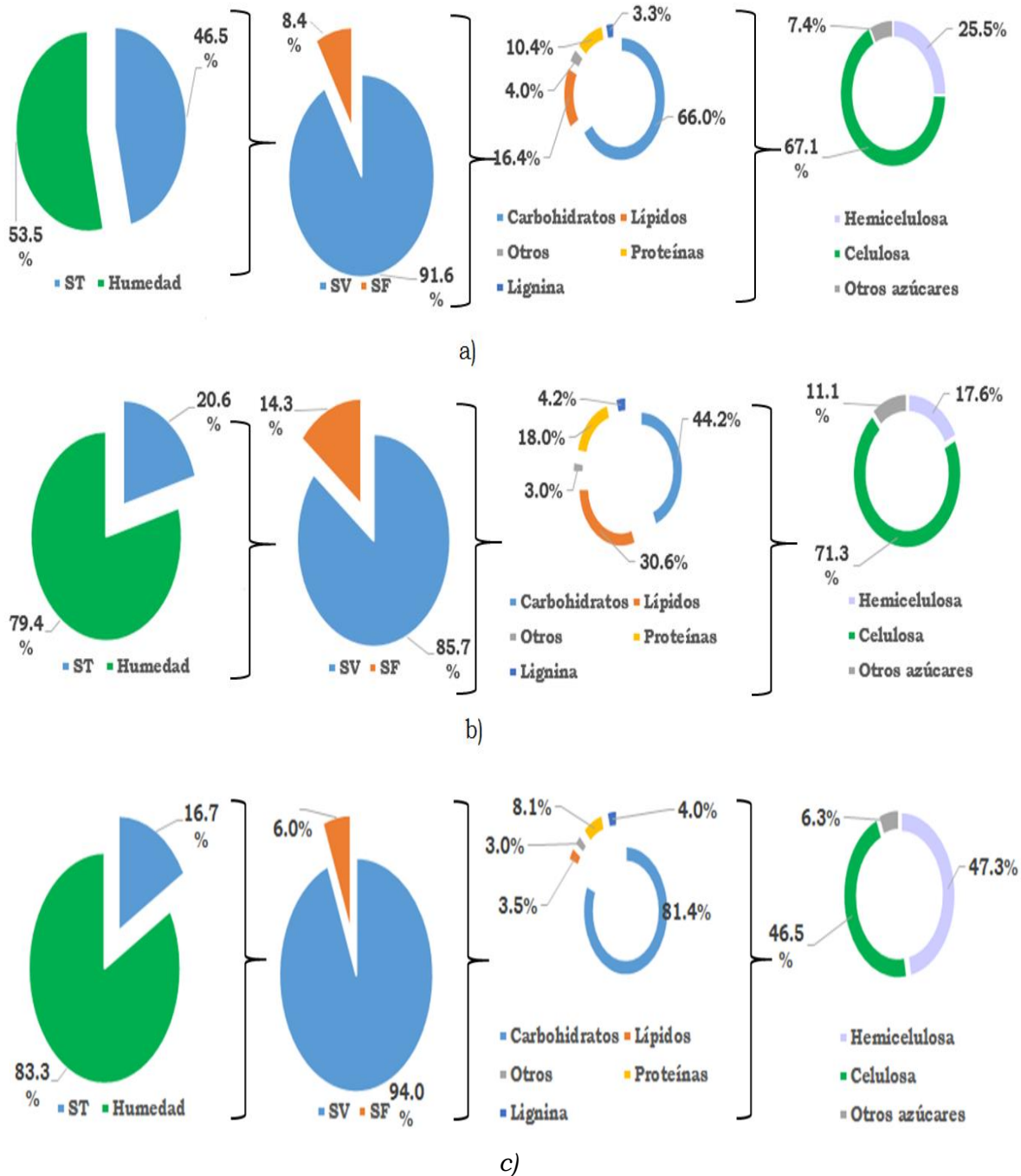


Figura 4.2 Composición de los a) Residuos de poda; b) Residuos de alimentos y c) Residuos de maíz (hojas).

4.2 Aplicación del pretratamiento

En la aplicación del pretratamiento se tomaron 3 gramos de cada una de las muestras de los residuos (previamente secados en la estufa a 105 °C) en matraces erlenmeyer de 250 ml, se le añadieron 50 mL de ácido sulfúrico

diluido al 1% y se colocaron a la temperatura de 210 °C durante un tiempo de 4 minutos.

La adición del ácido disminuyó el pH en cada caso hasta alcanzar intervalos entre 2 y 3, por lo tanto, para comenzar el proceso de sacarificación y fermentación simultánea fue necesario aumentar el pH hasta intervalos de 5 y 6 para no afectar la efectividad de las enzimas y las levaduras. Este aumento de pH se realizó añadiendo carbonato de calcio y midiendo constantemente para encontrar el pH idóneo para el siguiente proceso.

4.3 Determinación de azúcares

Los azúcares reductores se determinaron utilizando la técnica analítica de ácido 3,5 dinitrosalicílico o DNS. Se midieron durante 3 etapas del proceso: 1) después de realizar la molienda y antes de realizar el pretratamiento químico; 2) después del pretratamiento con ácido diluido y 3) después de realizado todo el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS). En las figuras 4.3, 4.4 y 4.5 se muestran la determinación de los azúcares reductores para cada uno de los residuos.

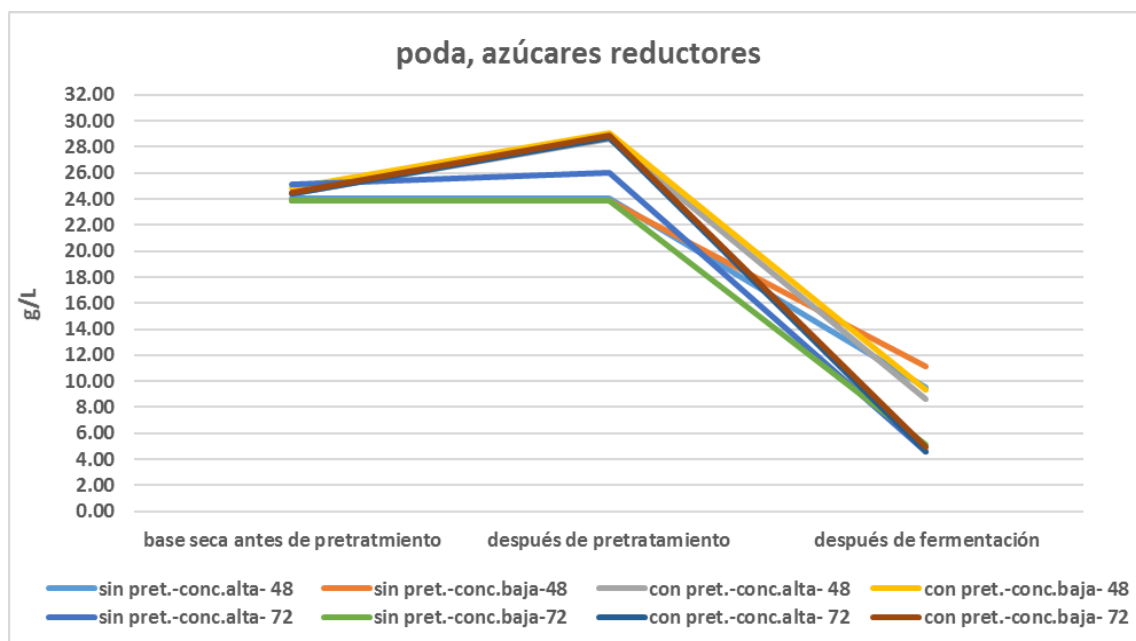


Figura 4.3 Determinación de azúcares reductores totales en los residuos de poda.

En las figuras 4.3, 4.4 y 4.5, las líneas que se mantienen de forma constante durante las 2 primeras etapas representan los experimentos que fueron realizados sin pretratamiento con ácido diluido, en este caso los residuos sólo secaron a 105 °C y luego se metieron al proceso de fermentación. Sin

embargo, los residuos que una vez secados, se les realizó el pretratamiento con ácido diluido presentan un aumento en la concentración de azúcares reductores después de que se realizó éste, lo que se debe a la propia acción del pretratamiento en la liberación de los azúcares reductores.

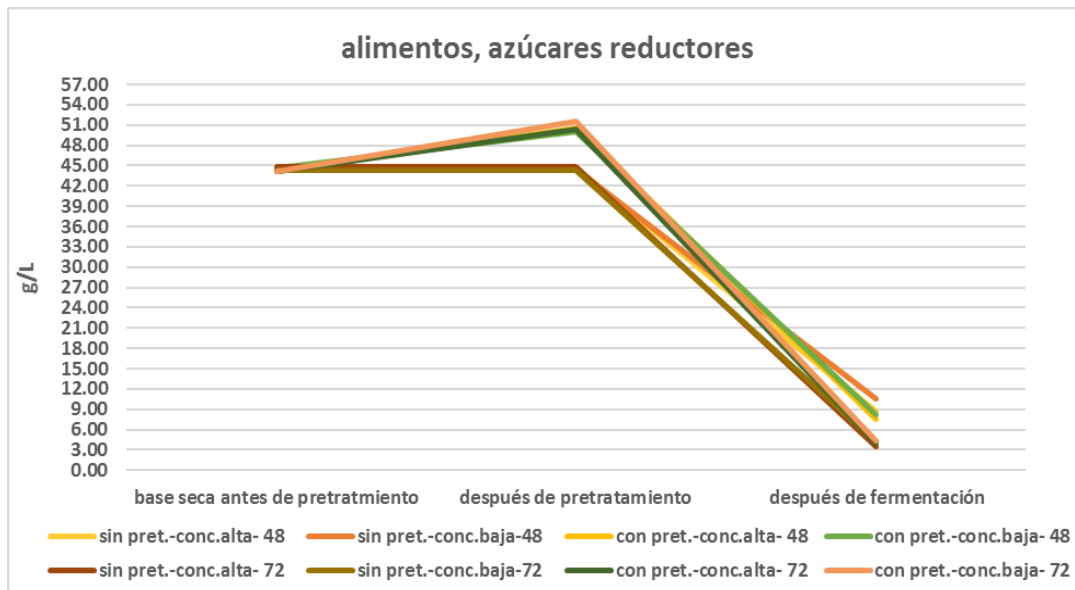


Figura 4.4 Determinación de azúcares reductores totales en los residuos de alimentos.

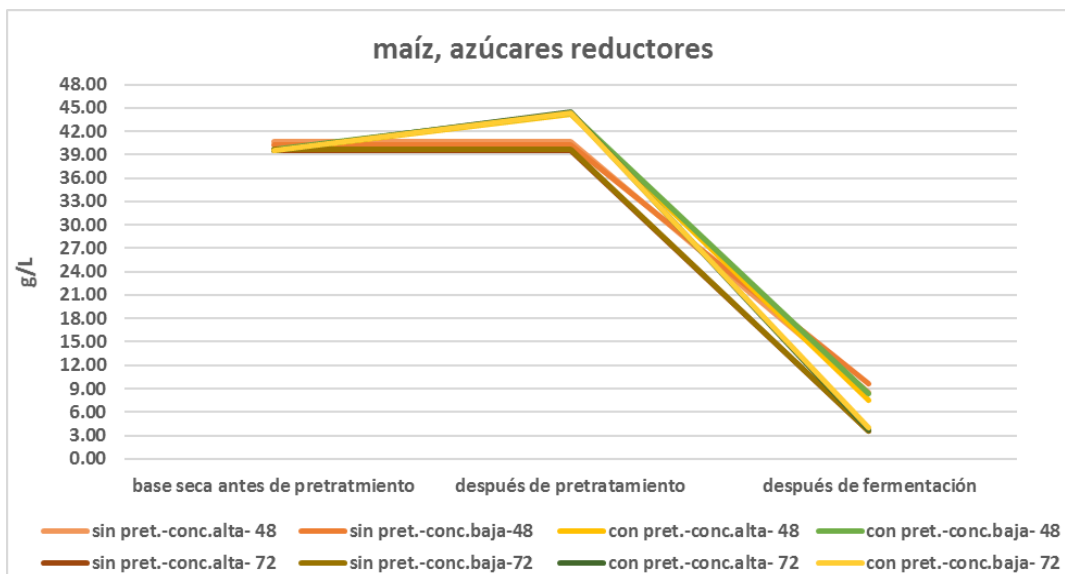


Figura 4.5 Determinación de azúcares reductores totales en los residuos de maíz.

En la tabla 4.4 se muestran los resultados del cálculo de los azúcares reductores en cada una de las etapas del proceso y los rendimientos del proceso de SFS los cuales se calculan dividiendo la concentración de etanol

(g/L) por los azúcares reductores (g/L). Este parámetro engloba el rendimiento de la etapa de hidrólisis y de la etapa de fermentación [36].

Tabla 4.4 Resultados de los azúcares reductores durante las etapas del proceso y rendimiento de la sacarificación y fermentación simultánea (SFS).

Residuos	Muestra	Base seca antes de pretratamiento	Después de pretratamiento	Después de fermentación	Rendimiento SFS
		(g/L)	(g/L)	(g/L)	
Poda	sin pret.-conc.alta- 48	24.04	24.04	9.55	28.15%
	sin pret.-conc.baja-48	23.83	23.83	11.14	22.38%
Alimentos	sin pret.-conc.alta- 48	44.71	44.71	8.76	29.52%
	sin pret.-conc.baja-48	44.43	44.43	10.59	27.68%
Maíz	sin pret.-conc.alta- 48	40.64	40.64	8.50	29.78%
	sin pret.-conc.baja-48	40.31	40.31	9.68	17.12%
Poda	con pret.-conc.alta- 48	24.40	28.63	8.67	28.87%
	con pret.-conc.baja- 48	24.87	29.06	9.30	18.58%
Alimentos	con pret.-conc.alta- 48	44.22	50.60	7.51	23.78%
	con pret.-conc.baja- 48	44.58	50.05	8.28	22.51%
Maíz	con pret.-conc.alta- 48	39.59	44.20	7.48	32.35%
	con pret.-conc.baja- 48	39.61	44.27	8.31	24.17%
Poda	sin pret.-conc.alta- 72	25.13	26.06	4.55	28.27%
	sin pret.-conc.baja-72	23.86	23.86	5.16	19.84%
Alimentos	sin pret.-conc.alta- 72	44.76	44.76	3.57	28.15%
	sin pret.-conc.baja-72	44.37	44.37	4.14	24.79%
Maíz	sin pret.-conc.alta- 72	39.55	39.55	3.55	26.21%
	sin pret.-conc.baja-72	39.68	39.68	3.63	15.88%
Poda	con pret.-conc.alta- 72	24.45	28.68	4.59	34.52%
	con pret.-conc.baja- 72	24.46	28.93	4.90	21.09%
Alimentos	con pret.-conc.alta- 72	44.09	50.33	3.94	29.54%
	con pret.-conc.baja- 72	44.17	51.60	4.32	23.90%
Maíz	con pret.-conc.alta- 72	39.50	44.43	3.76	30.61%
	con pret.-conc.baja- 72	39.55	44.40	4.01	25.68%

4.4 Balance de materia

Con el objetivo de cuantificar las azúcares que se produjeron durante cada una de las etapas del proceso, se realizó un balance de masa tomando en cuenta los azúcares reductores totales determinados mediante la técnica de DNS. Este balance de masas se realizó para las cuatro corridas realizadas en esta investigación. Además, se calculó la relación entre la producción de

bioetanol y el consumo de los azúcares reductores totales. Los resultados del balance de masas se presentan en las tablas 4.5 a 4.8.

Tabla 4.5 Balance de masas de la primera corrida (sin pretratamiento químico y 48 horas).

Muestra	Fermentación				
	entrada	salida	consumo	producción bioetanol	bioetanol/ azúcares
	g	g	g	g	
Poda-conc.alta	1.20	0.48	0.72	0.34	0.46
Poda-conc.baja	1.19	0.56	0.63	0.27	0.42
Aimentos-conc.alta	2.24	0.44	1.80	0.66	0.37
Alimentos-conc.baja	2.22	0.53	1.69	0.61	0.36
Maíz-conc.alta	2.03	0.43	1.61	0.61	0.38
Maíz-conc.baja	2.02	0.48	1.53	0.35	0.23

Tabla 4.6 Balance de masas de la segunda corrida (con pretratamiento químico y 48 horas).

Muestra	Pretratamiento		Fermentación				
	entrada	salida	entrada	salida	consumo	producción bioetanol	bioetanol/ azúcares
	g	g	g	g	g	g	
Poda-conc.alta	1.22	1.43	1.43	0.43	1.00	0.41	0.41
Poda-conc.baja	1.24	1.45	1.45	0.47	0.99	0.27	0.27
Aimentos-conc.alta	2.21	2.53	2.53	0.38	2.15	0.60	0.28
Alimentos-conc.baja	2.23	2.50	2.50	0.41	2.09	0.56	0.27
Maíz-conc.alta	1.98	2.21	2.21	0.37	1.84	0.72	0.39
Maíz-conc.baja	1.98	2.21	2.21	0.42	1.80	0.53	0.30

Tabla 4.7 Balance de masas de la tercera corrida (sin pretratamiento químico y 72 horas).

Muestra	Fermentación				
	entrada	salida	consumo	producción bioetanol	bioetanol/ azúcares
	g	g	g	g	
Poda-conc.alta	1.26	0.23	1.03	0.37	0.36
Poda-conc.baja	1.19	0.26	0.93	0.24	0.26
Aimentos-conc.alta	2.24	0.18	2.06	0.63	0.31
Alimentos-conc.baja	2.22	0.21	2.01	0.55	0.27
Maíz-conc.alta	1.98	0.18	1.80	0.52	0.29
Maíz-conc.baja	1.98	0.18	1.80	0.32	0.18

Las tablas 4.5 y 4.7 no presentan el balance de masas correspondiente la parte del pretratamiento, esto se debe a que los residuos fueron secados en la estufa a 105 °C y luego sometidos al proceso de sacarificación y fermentación simultánea sin aplicársele anteriormente el pretratamiento con ácido diluido.

Tabla 4.8 Balance de masas de la cuarta corrida (con pretratamiento químico y 72 horas).

Muestra	Pretratamiento		Fermentación				
	entrada	salida	entrada	salida	consumo	producción bioetanol	bioetanol/ azúcares
	g	g	g	g	g	g	
Poda-conc.alta	1.22	1.43	1.43	0.23	1.20	0.50	0.41
Poda-conc.baja	1.22	1.45	1.45	0.25	1.20	0.30	0.25
Aimentos-conc.alta	2.20	2.52	2.52	0.20	2.32	0.74	0.32
Alimentos-conc.baja	2.21	2.58	2.58	0.22	2.36	0.62	0.26
Maíz-conc.alta	1.97	2.22	2.22	0.19	2.03	0.68	0.33
Maíz-conc.baja	1.98	2.22	2.22	0.20	2.02	0.57	0.28

Las diferencias que se muestran en cada balance de materias entre el consumo de azúcares reductores y la producción de bioetanol, se debe principalmente a que dentro de los azúcares reductores totales se encuentra cierta cantidad de azúcares que están formados por cinco carbonos los cuales no pueden ser degradados por los microorganismos utilizados en esta investigación.

Es importante señalar también que los microorganismos utilizan parte de la glucosa para realizar su metabolismo y esto genera una pérdida de azúcares durante el proceso de fermentación.

4.5 Determinación de bioetanol

Para la determinación de la producción de bioetanol después de cada corrida del proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) se tomó una muestra en un vial de aproximadamente 3 mL, esta muestra se sometió a una filtración con filtros (HPLC) de cromatografía líquida de alta eficacia marca ACRODISC GHP, hechos con membranas de naylon (NY) de tamaño de poro de 0.2 μm para poder inyectar sin dañar el cromatógrafo de gases. En la figura 4.6 se observa el montaje experimental.



Figura 4.6 Montaje experimental para la producción de bioetanol.

En el cromatógrafo de gases se inyectó un estándar de etanol (HPLC) y a partir de él se creó una curva de calibración para poder determinar la cantidad de bioetanol producida en cada reactor.

Se realizaron un total de 24 experimentos con 3 réplicas cada uno lo que resultó en un total de 72 experimentos. Se realizaron 4 corridas de 18 experimentos.

En la figura 4.7 se muestran los resultados de la producción de bioetanol para la primera corrida que se realizó sin pretratamiento de ácido diluido, durante 48 horas y utilizando una concentración baja de enzimas, que equivale a 40 mg de la CELUZYME y 300 μ L de CELUZYME XB. También se empleó una concentración alta de enzimas que equivale a 80 mg de la CELUZYME y 600 μ L de CELUZYME XB.

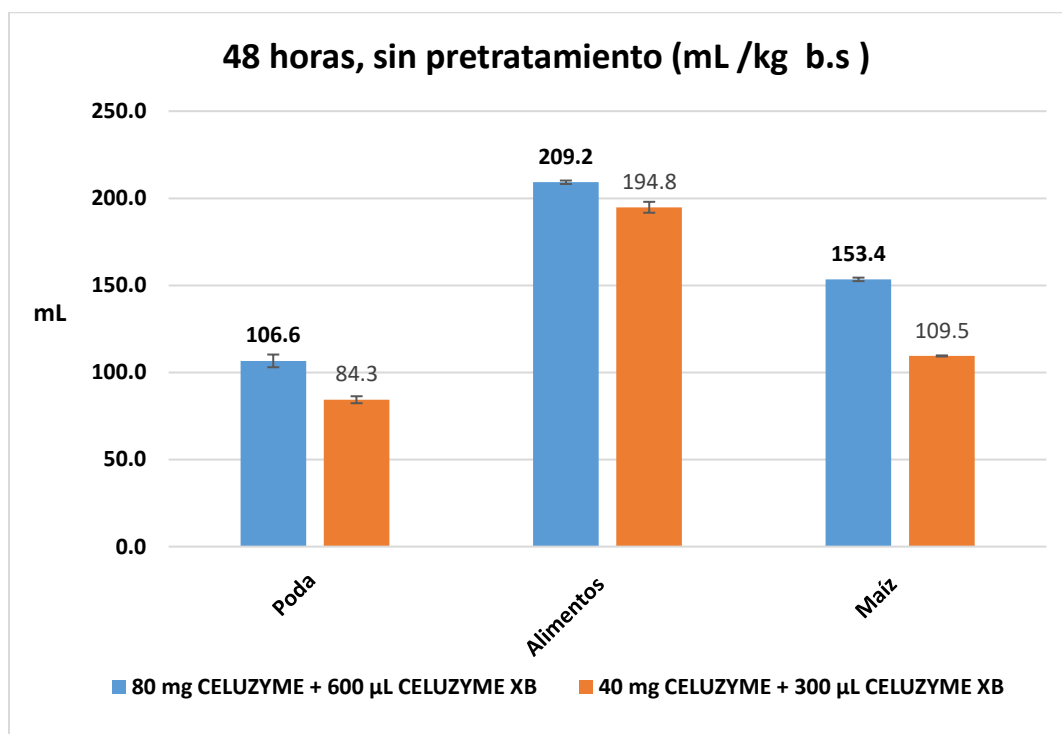


Figura 4.7 Producción de bioetanol de los residuos en la 1ra corrida.

Es importante destacar que los mejores resultados se obtuvieron para los residuos de alimentos utilizando ambas concentraciones de enzimas (altas y bajas) con 209.2 y 194.8 mL, respectivamente, y siendo el residuo de poda el de menor producción con 106.6 mL para la alta concentración de enzimas y solo 84.3 mL para la concentración baja. Sin embargo, para los 3 residuos

se obtuvo mejor producción cuando se utilizó la concentración alta de enzimas utilizadas en esta investigación.

La segunda corrida se realizó con las mismas condiciones de tiempo y de concentración de enzimas, pero a esta corrida se añadió el pretratamiento con ácido diluido para hidrólisis; los resultados de la segunda corrida se muestran en la figura 4.8.

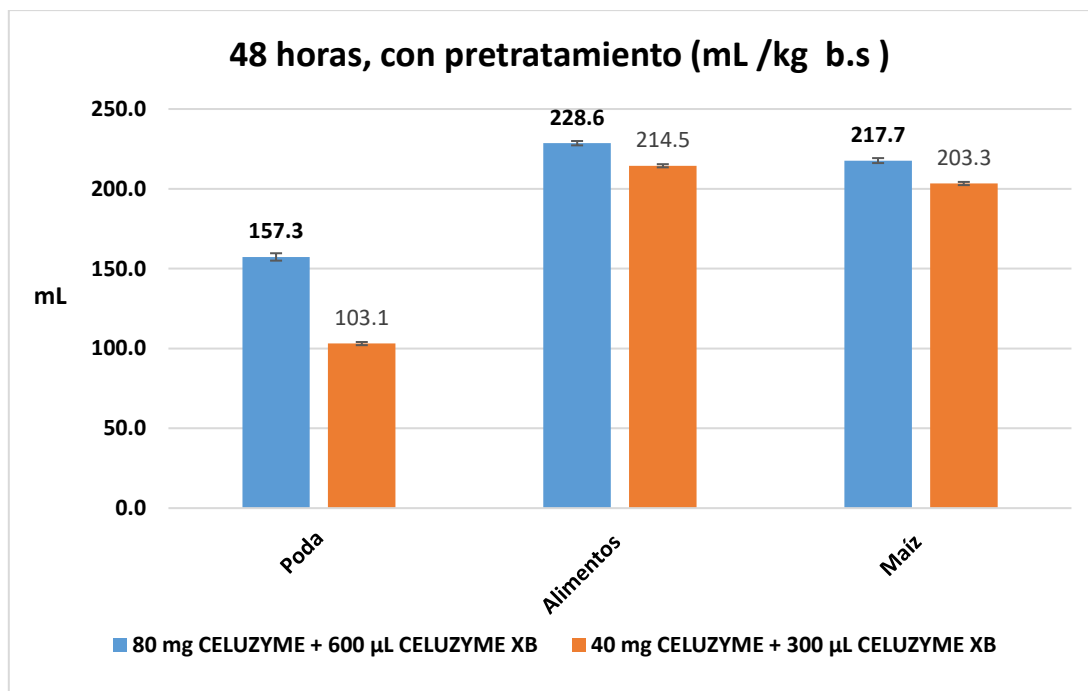


Figura 4.8 Producción de bioetanol de los residuos en la 2da corrida.

Durante esta corrida aumentó significativamente la producción de bioetanol para todos los residuos utilizados en esta investigación, lo que se debe a la utilización del pretratamiento químico combinado con el mecánico, ya que este fue el único parámetro que se cambió con respecto a la corrida anterior, en este caso reportándose las mejores producciones para el residuo de alimentos con 228.6 y 214.5 mL de bioetanol por kg de base seca de residuo. A pesar de que en todos los residuos aumentó la producción en comparación con la corrida que se realizó sin pretratamiento.

Para realizar las últimas dos corridas se aumentó el tiempo de proceso a 72 horas con el objetivo de comparar las producciones de bioetanol con las corridas anteriores. En la figura 4.9 se muestra la producción

correspondiente a la tercera corrida la cual se realizó sin pretratamiento químico y utilizando ambas concentraciones de enzimas.

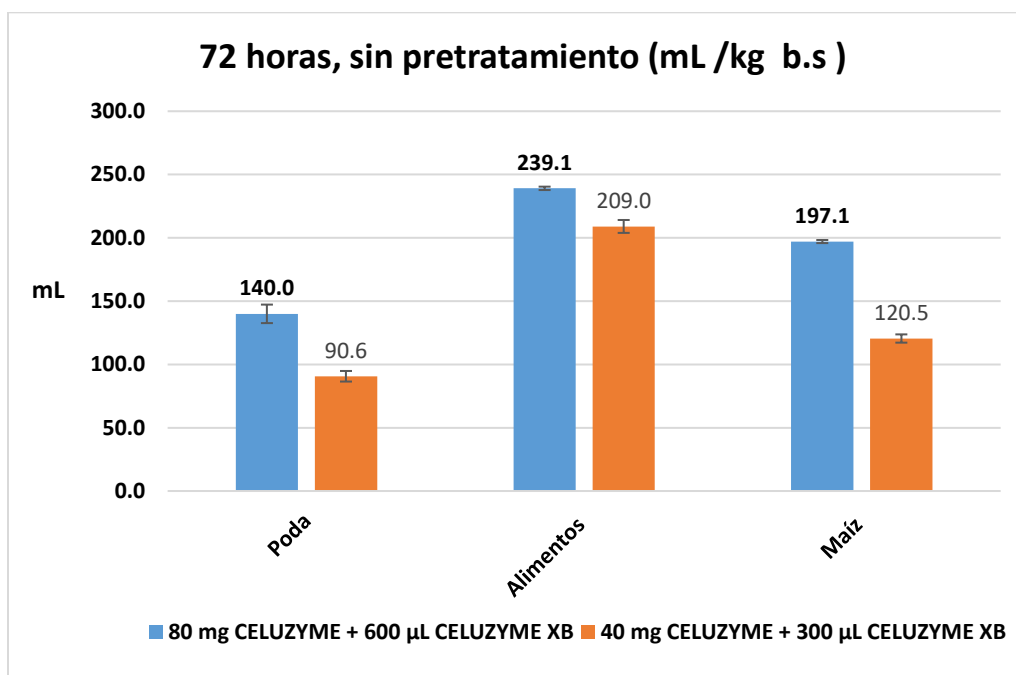


Figura 4.9 Producción de bioetanol de los residuos en la 3ra corrida.

Al aumentar el tiempo de proceso también aumentó la producción de bioetanol en comparación con la primera corrida que se realizó también sin pretratamiento químico con las mismas concentraciones de enzimas (alta y baja) pero a 48 horas. En todos los residuos utilizados en la tercera corrida la producción de bioetanol aumentó significativamente, cuando se variaron los factores (pretratamiento y concentración de enzimas) a su nivel alto.

Las concentraciones de enzimas se variaron de (40 mg de CELUZYME y 300 µl de CELUZYME XB) a (80 mg de CELUZYME y 600 µl de CELUZYME XB) y las producciones mayores se obtuvieron para el caso de los residuos de alimentos que aumentó de 209.0 a 239.1 mL por kg de residuos en base seca. En el caso de los residuos de maíz también aumentó la producción de bioetanol de 120.5 mL a 197.1 mL. Aunque los residuos de poda nuevamente aportaron la menor producción de esta corrida también aumentaron de 90.6 a 140.0 mL.

Para la realización de la última corrida se volvió a utilizar la combinación de los pretratamientos químico y mecánico, y se mantuvo el tiempo de proceso

en 72 horas, además se usaron ambas concentraciones de enzimas en la hidrólisis; los resultados se presentan en la figura 4.10.

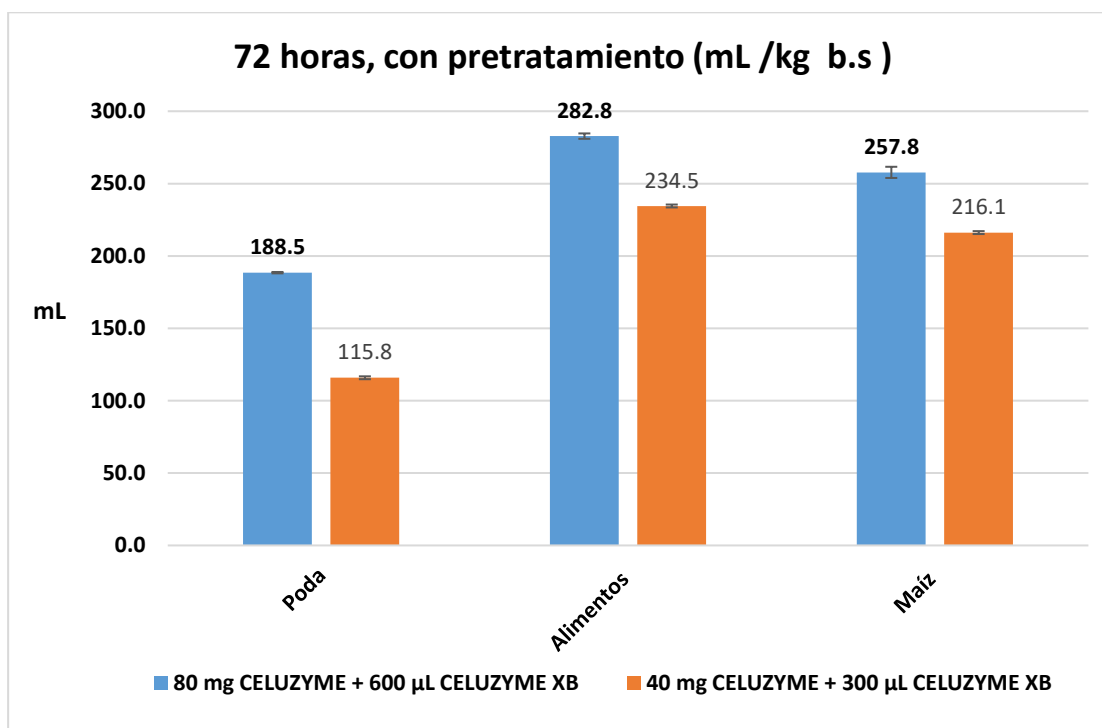


Figura 4.10 Producción de bioetanol de los residuos en la 4a corrida.

La cuarta corrida fue la mejor en cuanto a producción bioetanol, esto se debe a la utilización de pretratamiento químico combinado con el mecánico, además del aumento de tiempo de proceso. La mejor producción de bioetanol proveniente de la poda fue de 188.5 y 115.8 mL, para ambas concentraciones (alta y baja) de las enzimas CELUZYME y CELUZYME XB respectivamente. Mientras que la mejor producción para el caso de los residuos de alimentos fue de 282.8 y 234.5 mL. Por ultimo en el caso de los residuos de maíz (hojas) su mayor producción fue 257.8 y 216.1 mL por kg en base seca de residuo.

En las siguientes tablas 4.9 y 4.10 se muestran las producciones de bioetanol reportados en gramos de bioetanol por litro de reactor útil, los cuales si se comparan con los reportados en literatura se puede concluir que se obtuvieron valores muy cercanos de los promedios, obteniendo los mejores rendimientos entre 8.5 y 11.2 g/L, principalmente en los residuos de alimentos y maíz (hojas). También se calculó con la ecuación (2) la

productividad volumétrica de etanol (PVE). Este cálculo aportó un valor aproximado de cuánto bioetanol se produjo por unidad de tiempo [10].

$$PVE \left(\frac{g}{L \cdot h} \right) = \text{producción de etanol} \left(\frac{g}{L} \right) \div \text{tiempo de proceso}(h) \quad (2)$$

Tabla 4.9 Producción de bioetanol de los residuos a 48 horas.

Producción de etanol(g/L), productividad volumétrica(g/L*h)				
Muestra	Sin pret. (g/L)	PVE (g/L*h)	Con pret. (g/L)	PVE (g/L*h)
Poda (baja conc.)	5.3	0.111	5.4	0.113
Poda (alta conc.)	6.7	0.140	8.3	0.172
Alimentos (baja conc.)	12.3	0.256	11.3	0.235
Alimentos (alta conc.)	13.2	0.275	12.0	0.251
Maíz (baja conc.)	6.9	0.144	10.7	0.223
Maíz (alta conc.)	12.1	0.252	7.4	0.298

Tabla 4.10 Producción de bioetanol de los residuos a 72 horas.

Producción de etanol(g/L), productividad volumétrica(g/L*h)				
Muestra	Sin pret. (g/L)	PVE (g/L*h)	Con pret. (g/L)	PVE (g/L*h)
Poda (baja conc.)	4.8	0.099	6.1	0.127
Poda (alta conc.)	7.4	0.153	9.9	0.207
Alimentos (baja conc.)	11.0	0.229	12.3	0.257
Alimentos (alta conc.)	12.6	0.262	14.9	0.310
Maíz (baja conc.)	6.3	0.132	11.4	0.237
Maíz (alta conc.)	10.4	0.216	13.6	0.282

Los residuos de poda fueron los que presentaron una menor producción de bioetanol, esto puede ser debido a que su material lignocelulósico es más complejo que el de los otros dos residuos (alimentos y maíz (hojas)) lo que pudo dificultar la efectividad del pretratamiento y de la acción de las enzimas en los casos en que no se realizó pretratamiento químico.

4.6 Análisis y discusión de los resultados

Si comparamos los rendimientos de este trabajo con otros reportados en literatura, para otros residuos y otros pretratamientos se puede observar que en esta investigación la producción de bioetanol en g/L se acercan a los valores promedios reportados. Además, es importante tener en cuenta que esta investigación los residuos utilizados no presentan gran cantidad de azúcares disponibles para la fermentación, como si es el caso de los procesos donde se utilizan frutas y vegetales.

Por ejemplo la investigación de (Lin *et al.*, 2013)[37] que realizó producción de etanol a partir de bagazo de caña con sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) usando una levadura termotolerantes *Kluveromyces marxianus* y la enzima celulasa comercial de Acceller-ASE 1000 se investigó. bagazo de caña pretratada con NaOH a la temperatura ambiente durante 24 h dio como resultado resultado una concentración final de etanol de 24,6 g /L.

La investigación realizada por (Fernandes *et al.*, 2015)[10] donde se utiliza la *Cynara cardunculus* (cardo) y se somete al pretratamiento de la explosión de vapor La fermentación de bioetanol en el modo SFS proporcionó los resultados: una concentración de etanol 18,7 g/ L.

Un trabajo realizado por (Saha *et al.*,2005) [33] donde realizó una comparación de los procesos de sacarificación y fermentación independiente en contra del proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) utilizando como residuo la paja de trigo. Obteniendo resultados para el caso de SFS, la utilización de la sacarificación y la fermentación simultánea desde 13 ± 2 a 17 ± 0 g/L y contribuyó también disminución del tiempo de fermentación de 136 a 112 h.

En otra investigación realizada por (Mejías *et al.*, 2009) [35] se utilizó el residuo de la extracción del aceite de oliva con un pretratamiento químico de una solución ácida combinado con la explosión a vapor. Se obtuvieron rendimientos promedios calculados de 8,1 g/L, en los ensayos con pulpa, y para el caso del hueso pretratado de 20 g/L.

En esta investigación los rendimientos estuvieron en el intervalo de 7 a 15 g/L en dependencia del tipo de residuo a analizar, si realizamos una comparación de rendimientos con las otras investigaciones reportadas en este trabajo, podemos decir que estamos en un intervalo promedio, lo que se puede considerar como muy satisfactorio, ya que en la mayoría de los reportes de la literatura utilizan al menos 24 horas más de tiempo en realizar su pretratamiento, levaduras termotolerantes las cuales permiten una mayor producción a poder aumentar la temperatura durante el proceso, además de utilizar residuos convencionales para la producción de bioetanol como por ejemplo caña de azúcar y paja de trigo.

5 EVALUACIÓN DE LOS FACTORES PRINCIPALES EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.

En este capítulo se abordan los efectos provocados por los factores analizados en esta investigación mediante la solución y el análisis de un diseño factorial de 2^3 desarrollado en el software Minitab versión 17 con el objetivo de determinar cómo afectan cada uno de los factores, así como las interacciones entre ellos a la producción final de bioetanol para cada uno de los residuos orgánicos utilizados.

La disposición final del diseño de experimentos con los factores, sus niveles y la variable de respuesta para cada uno de los residuos por separados.

5.1 Resultados del diseño de experimento

La definición del diseño de experimentos propuesto para esta investigación, sus principales características y las ecuaciones que lo conforman se muestran en epígrafe 3.4 de esta investigación.

Es importante señalar que el diseño factorial fue aplicado para cada uno de los residuos orgánicos utilizados por separado de manera tal que se pudiera determinar qué factor o la combinación de qué interacciones de factores fue más determinante durante el proceso de producción de bioetanol, cada uno de estos diseños individuales contó con 24 corridas para un total de 72 al final.

5.2 Análisis de datos para el residuo de poda

En la tabla 5.1 se muestra de qué manera quedaron los datos del residuo de poda para aplicación del diseño de experimentos con el software. Es importante señalar que este residuo fue el que produjo la menor cantidad de bioetanol. Durante la aplicación del diseño de experimentos la variable de respuesta a tomar en cuenta fue la producción de bioetanol en mL por kilogramo de residuo en base seca.

Tabla 5.1 Disposición final del diseño de experimentos para el residuo de poda.

Poda	Factores						Bioetanol (mL / kg b.s)		
Corrida	A (Pret.)		B (Conc. de enzimas)		C (Tiempo)		Réplicas		
							1	2	3
1	-1	sin	-1	baja	-1	48	82.9	86.6	83.5
2	1	con	-1	baja	-1	48	103.5	102.8	102.9
3	-1	sin	1	alta	-1	48	110.7	103.8	105.4
4	1	con	1	alta	-1	48	159.5	154.9	157.5
5	-1	sin	-1	baja	1	72	88.2	88.2	95.5
6	1	con	-1	baja	1	72	113.5	117.2	116.8
7	-1	sin	1	alta	1	72	148.4	135.9	135.5
8	1	con	1	alta	1	72	188.9	188.0	188.5

Después de introducir los datos anteriores en el software Minitab 17 se realizó un análisis del diseño de experimentos propuesto para el caso de los residuos de poda. La significación estadística de la ecuación del diseño correspondiente se comprobó mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA, Tabla 5.2).

Cabe señalar que los valores que resultaron menores que ($\alpha=0.05$) en la columna Valor-P tienen un aporte significativo en la variable respuesta en este caso sólo la combinación de los factores (pretratamiento y tiempo) y la combinación de los 3 factores (pretratamiento, concentración de enzimas y tiempo) no resultaron significativos en la obtención de la variable respuesta con valor-P de 0.468 y 0.149, respectivamente.

Tabla 5.2 Análisis de varianza para la producción de bioetanol de los residuos de poda.

Fuente	Grados Libertad	Suma Cuadrados Ajust.	Media Cuadrada Ajust.	Valor-F	Valor-P
Pretratamiento	1	7683.7	7683.7	627.4	0.000
Conc. Enzimas	1	14772.8	14772.8	1206.31	0.000
Tiempo	1	2615.1	2615.1	213.54	0.000
Pretratamiento*Conc. Enzimas	1	1145.7	1145.7	93.55	0.000
Pretratamiento*Tiempo	1	6.8	6.8	0.55	0.468
Conc. Enzimas*Tiempo	1	771.6	771.6	63.00	0.000
Pretratamiento*Conc. Enzimas*Tiempo	1	28.1	28.1	2.30	0.149
Error	16	195.9	12.2		
Total	23	27219.7			

El diagrama de Pareto (figura 5.1) que se obtuvo con el software muestra qué factores y qué combinaciones de ellos producen los mayores errores o variaciones en la producción de bioetanol final.

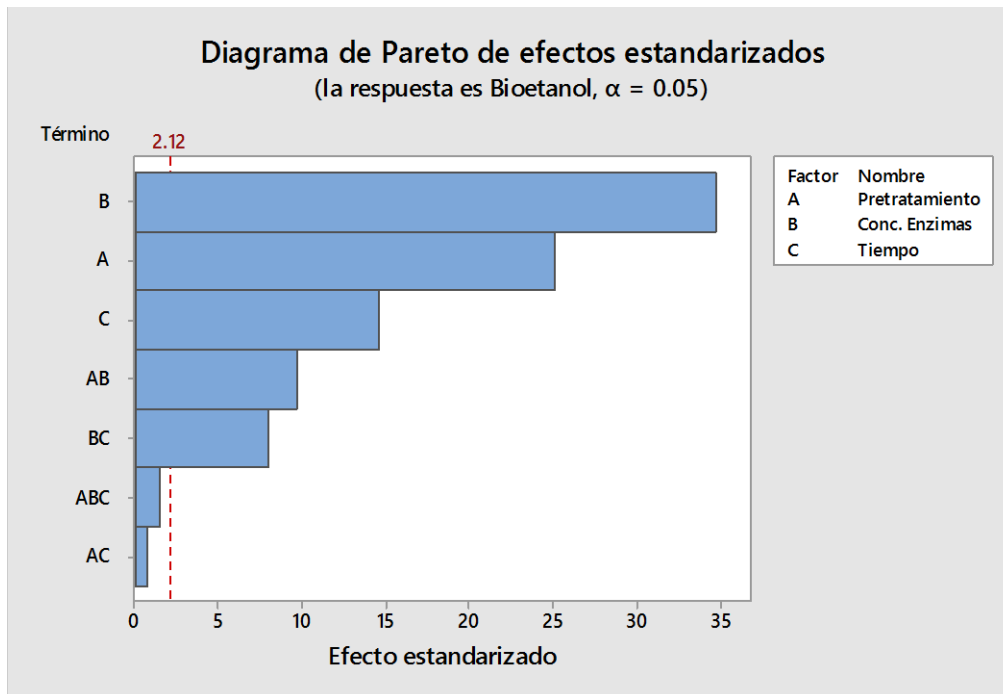


Figura 5.1 Diagrama de Pareto para los residuos de poda.

Se puede decir que el factor que más influyó para el caso de los residuos de poda fue la concentración de enzimas y para el caso de las combinaciones de estos la concentración de enzimas y el pretratamiento.

Entre los diversos gráficos que proporciona el software, hay uno de mayor relevancia, que es el gráfico de superficie de contorno (Figura 5.2) el cual permite conocer cuáles son los intervalos de valores de los factores para obtener la máxima variable de respuesta (producción de bioetanol).

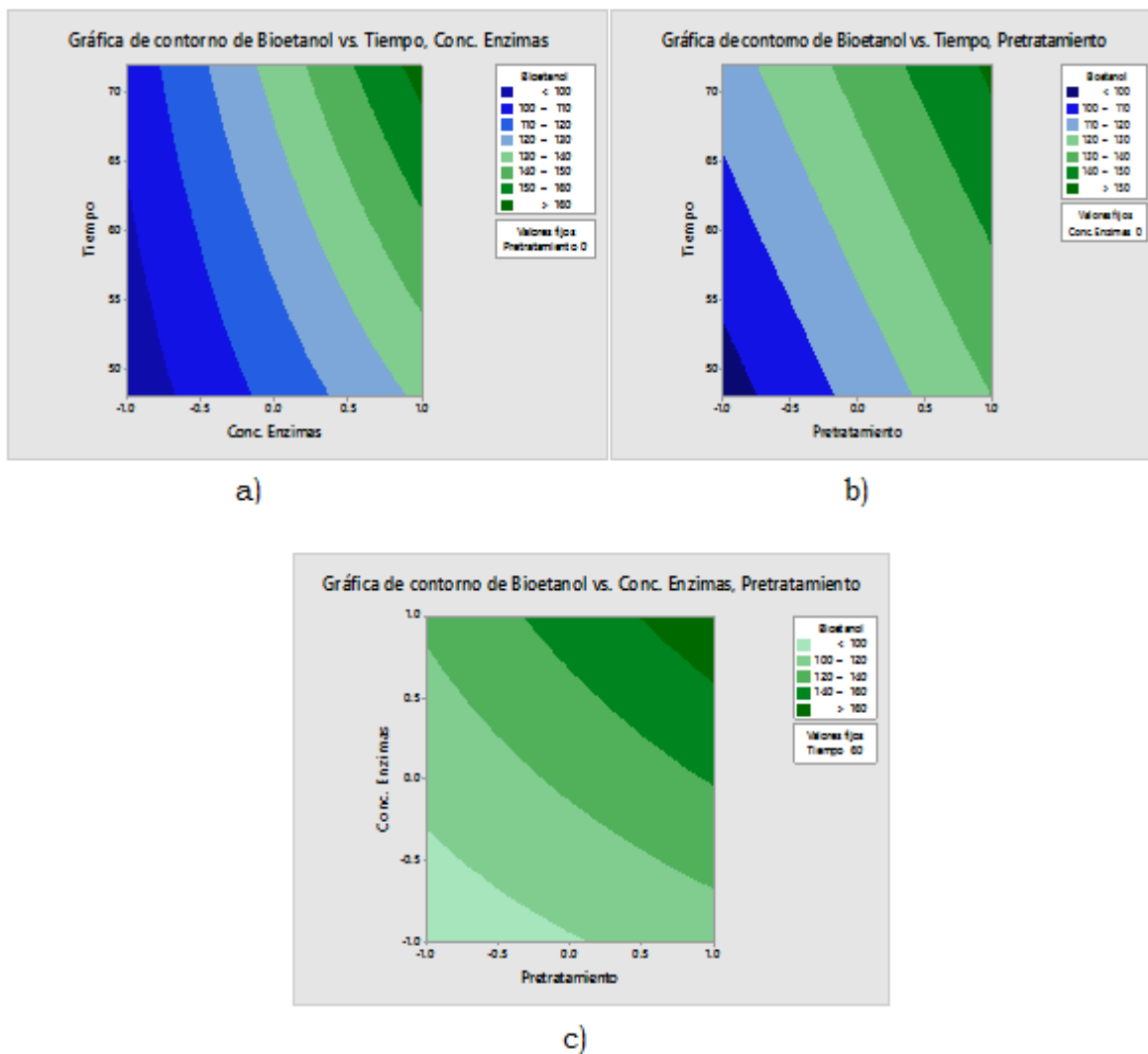


Figura 5.2 Gráficas de contornos de a) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Gráfica de contorno de Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas.

Como el objetivo principal de este trabajo fue maximizar la producción de bioetanol entonces se concluye que los factores utilizados deben encontrarse cerca de la zona superior derecha de los gráficos de contorno. En esta zona se obtuvieron las mayores producciones para cada combinación de factor, en el caso de residuos de poda resultaron estar por encima de los 160 mL por kg de base seca de residuos.

5.3 Análisis de datos para el residuo de alimentos

En el caso de los de residuos de alimentos la disposición final del diseño de experimentos se muestra en la tabla 5.3. Es importante señalar que los residuos de alimentos fueron los que tuvieron la mayor producción de bioetanol de los tres residuos utilizados en esta investigación.

Tabla 5.3 Disposición final del diseño de experimentos para el residuo de alimentos.

Alimento corrida	Factores						Bioetanol (mL / kg b.s)		
	A (Pret.)		B (Conc. de enzimas)		C (Tiempo)		Replicas		
							1	2	3
1	-1	sin	-1	baja	-1	48	198.3	192.1	194.1
2	1	con	-1	baja	-1	48	211.8	216.1	215.4
3	-1	sin	1	alta	-1	48	209.4	210.1	208.1
4	1	con	1	alta	-1	48	230.1	227.5	228.2
5	-1	sin	-1	baja	1	72	204.6	207.8	214.6
6	1	con	-1	baja	1	72	239.9	232.0	231.7
7	-1	sin	1	alta	1	72	240.5	237.8	238.9
8	1	con	1	alta	1	72	284.9	281.5	282.0

Estos datos fueron utilizados en el diseño de experimentos creado en el software Minitab versión 17 con el cual se realizó una corrida de tipo 2³ factorial. Como se realizó anteriormente para los residuos de poda lo primero en tomar en cuenta fue la tabla de que representa el análisis de varianza (ANOVA, Tabla 5.4).

Si se tiene en cuenta que sólo los valores-P que sean mayor que ($\alpha=0.05$) no son significativos, se puede decir que para el caso de los residuos de alimentos todos los factores analizados son significativos para tener una mayor variable de respuesta.

Para poder definir qué factor y qué combinación de factores resultó más significativo en la producción de final de bioetanol a partir de los residuos de alimentos se utilizó el diagrama de Pareto el cual se muestra en la figura 5.3. A diferencia de los residuos de poda en este caso el factor más influyente en la variable respuesta fue el tiempo y la combinación de factores que más significación estadística mostró fue la combinación del tiempo con la concentración de enzimas. En este caso no se tuvo ningún factor o

combinación por debajo de la línea estándar, es decir, no se encontraron valores que no fueran significativos en la producción final de bioetanol.

Tabla 5.4 Análisis de varianza para la producción de bioetanol de los residuos de alimentos.

Fuente	Grados Libertad	Suma Cuadros Ajust.	Media Cuadrada Ajust.	Valor-F	Valor-P
Pretratamiento	1	4397.3	4397.26	497.67	0.000
Conc. Enzimas	1	4284.7	4284.70	484.93	0.000
Tiempo	1	5252.0	5251.96	594.40	0.000
Pretratamiento*Conc. Enzimas	1	121.2	121.21	13.72	0.002
Pretratamiento*Tiempo	1	342.4	342.44	38.76	0.000
Conc. Enzimas*Tiempo	1	932.7	932.66	105.56	0.000
Pretratamiento*Conc. Enzimas*Tiempo	1	127.0	126.98	14.37	0.002
Error	16	141.4	8.84		
Total	23	15598.6			

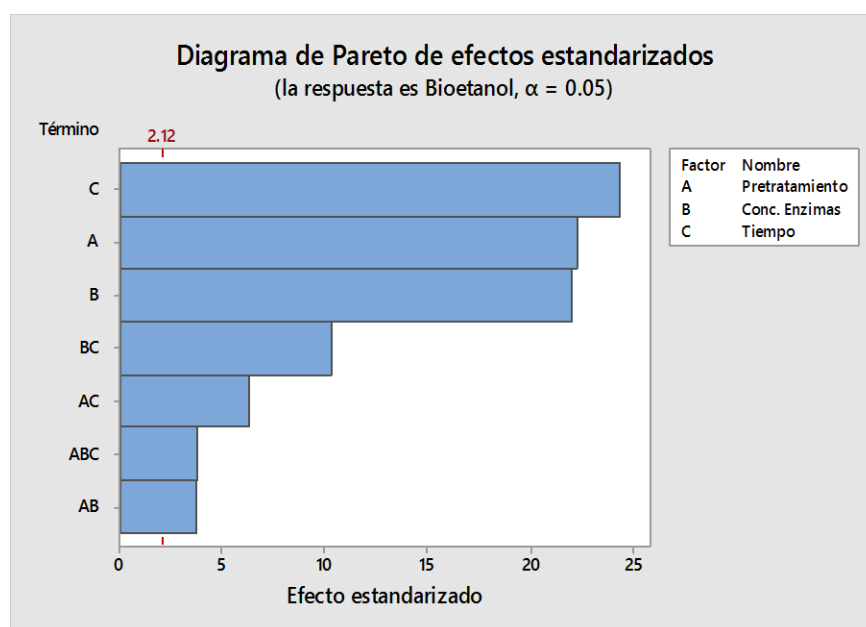
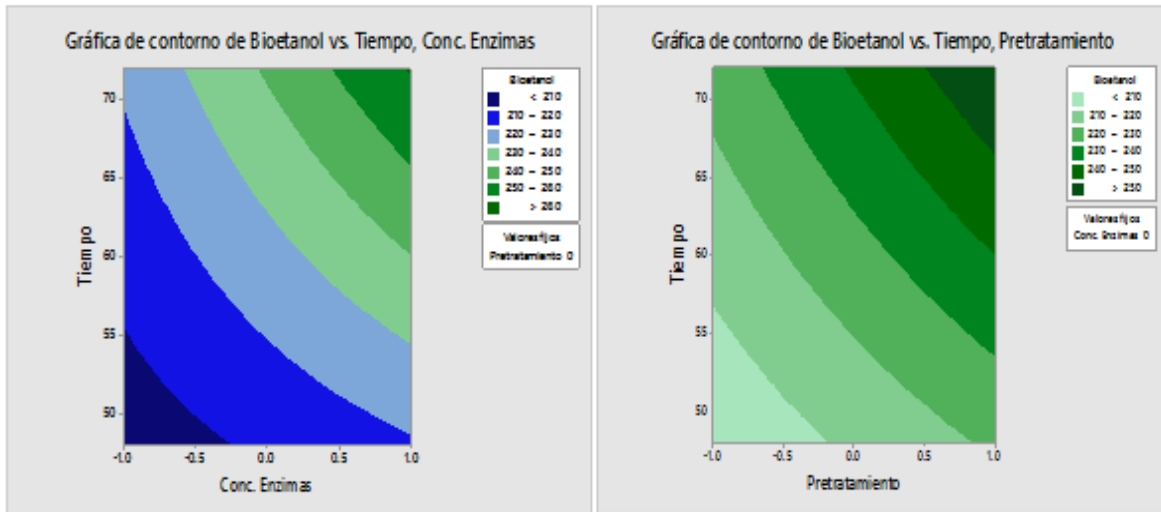


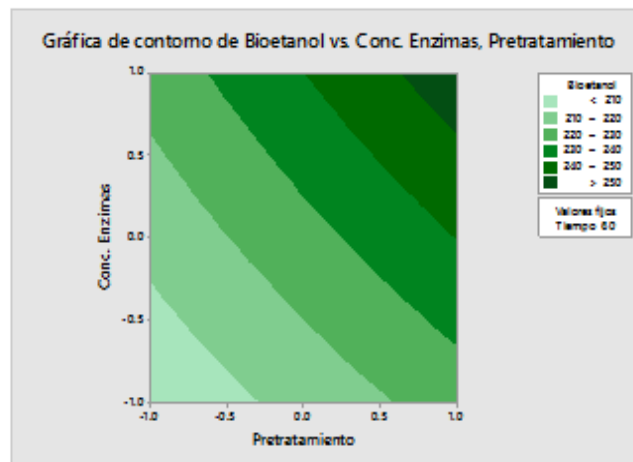
Figura 5.3 Diagrama de Pareto para los residuos de alimentos.

Para poder explicar mejor de qué manera influye cada factor y cómo encontrar la mejor combinación de los factores para aumentar la producción de bioetanol, se debe observar la gráfica de contorno que proporcionó el software para el caso de los residuos de alimentos.



a)

b)



c)

Figura 5.4 Gráficas de contornos de a) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Gráfica de contorno de Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas.

Si se observa la figura 5.4 las mayores producciones se encuentran en las zonas que superan las 70 horas de proceso en el factor tiempo y cuando coinciden con el nivel alto de los otros dos factores, es decir, a pesar de que el tiempo es el factor de mayor influencia en este caso, para obtener

producciones de bioetanol mayores a 250ml/kg b.s es necesario realizar la experimentación con todos los factores en su nivel alto.

Se puede pensar que la influencia del factor tiempo en el caso de los residuos de alimentos, se debe a que el efecto que tiene el pretratamiento no es muy marcado, sobre todo si recordamos que este tipo de residuo fue recolectado luego de estar cocinado lo que quiere decir que se le había realizado ya un pretratamiento térmico.

Resta evidenciar que este experimento fue realizado de forma confiable lo que se demuestra con la gráfica de probabilidad normal que se muestra en la figura 5.5.

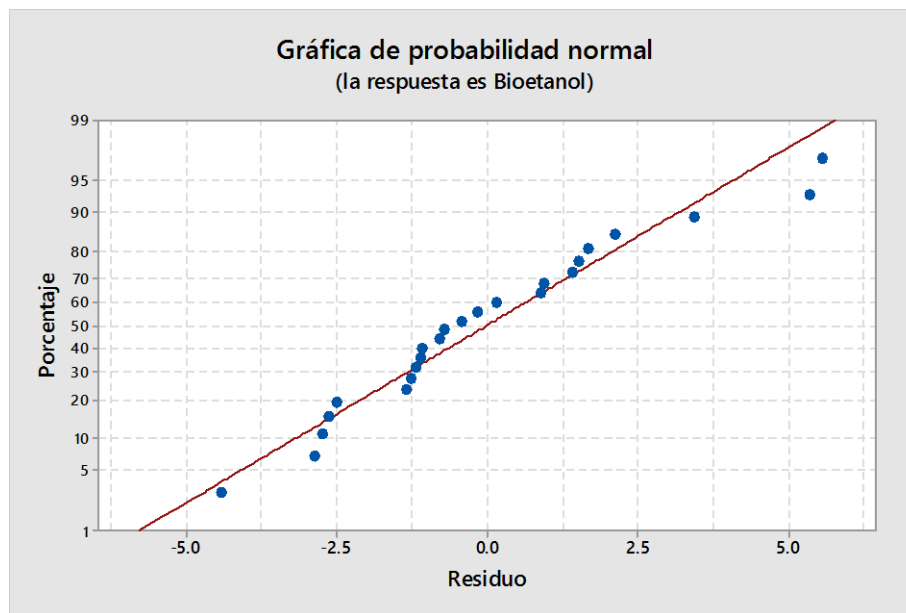


Figura 5.5 Gráfica de probabilidad normal para los residuos de alimentos.

Se puede decir que el experimento se realizó de forma confiable porque los puntos dispersos se encuentran a distancias muy cercanas a la recta de probabilidad normal de la variable respuesta.

5.4 Análisis de datos para el residuo de maíz

Por último, se analizaron las respuestas procedentes de los residuos de maíz (hojas) y la disposición final del diseño se muestra en la siguiente tabla 5.5, es importante señalar que se obtuvieron producciones cercanas a la de los residuos de alimentos cuando se utilizaron todos los factores en nivel alto,

pero fue el que más contraste presentó en cuanto a producción se refiere cuando los factores fueron utilizados en nivel bajo.

Tabla 5.5 Disposición final del diseño de experimentos para el residuo de maíz (hojas).

Maíz (hojas) corrida	Factores						Bioetanol (mL / kg b.s)		
	A (Pret.)		B (Conc. de enzimas)		C (Tiempo)		Réplicas		
							1	2	3
1	-1	sin	-1	baja	-1	48	109.4	109.2	109.8
2	1	con	-1	baja	-1	48	201.2	206.0	202.9
3	-1	sin	1	alta	-1	48	154.3	153.7	152.3
4	1	con	1	alta	-1	48	216.3	217.5	219.3
5	-1	sin	-1	baja	1	72	124.2	118.6	118.6
6	1	con	-1	baja	1	72	218.1	219.9	210.5
7	-1	sin	1	alta	1	72	197.6	197.9	195.7
8	1	con	1	alta	1	72	261.6	257.8	253.9

Si se observa la corrida 1 que representa la corrida donde todos los factores se encuentran en nivel bajo y se compara con la corrida 8 en la que todos los factores se encuentran en nivel alto la producción aumenta de aproximadamente 109 a 257 mL/kg b.s, lo que representa un incremento de más del 100%.

Como se hizo anteriormente con los otros dos residuos se realizó un análisis de varianza mediante la tabla 5.6 (ANOVA) que arrojó el software utilizado. Esta tabla aporta información valiosa sobre cuáles fueron los factores que influyeron estadísticamente en la variable respuesta.

Si se comparan los Valor-P con un ($\alpha=0.05$) se puede decir que todos los factores fueron significativos estadísticamente, pero a diferencia de los residuos de alimentos sólo dos combinaciones de factores resultaron ser influyentes en este caso y fueron la combinación de los factores (concentración de enzimas y tiempo) y la combinación de (pretratamiento y concentración de enzimas).

En el diagrama de Pareto se observa qué factor y qué combinaciones fueron más influyentes en maximización de la variable de respuesta. Para el caso del maíz el factor más significativo, al igual que en el caso de los residuos

de poda, fue el pretratamiento como se observa claramente en la figura 5.6, la barra de pretratamiento es la que más sobrepasa la línea de efectos estandarizados del diagrama.

Tabla 5.6 Análisis de varianza para la producción de Bioetanol de los residuos de maíz (hojas).

Fuente	Grados Libertad	Suma Cuadrados Ajust.	Media Cuadrada Ajust.	Valor-F	Valor-P
Pretratamiento	1	37093.0	37093.0	4839.54	0.000
Conc. Enzimas	1	11684.4	11684.4	1524.46	0.000
Tiempo	1	4332.4	4332.4	565.24	0.000
Pretratamiento* Conc. Enzimas	1	1564.1	1564.1	204.07	0.000
Pretratamiento*Tiempo	1	1.2	1.2	0.15	0.702
Conc. Enzimas*Tiempo	1	1345.0	1345.0	175.49	0.000
Pretratamiento* Conc. Enzimas*Tiempo	1	10.9	10.9	1.43	0.250
Error	16	122.6	7.7		
Total	23	56153.6			

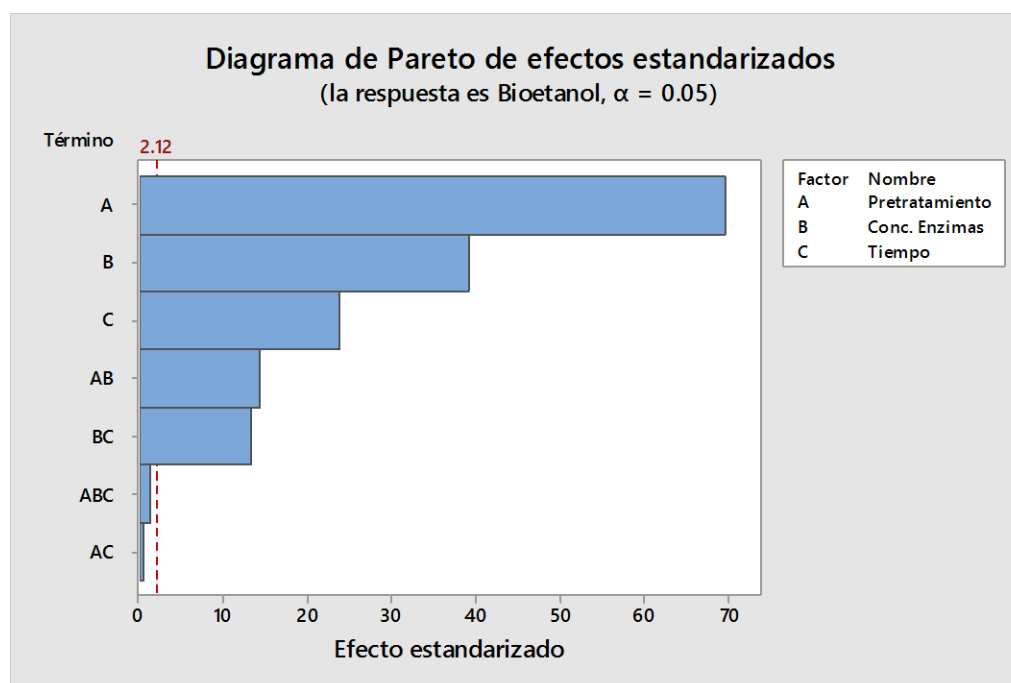


Figura 5.6 Diagrama de Pareto para los residuos de maíz (hojas).

Los gráficos de contorno para el caso de los residuos de maíz (hojas) muestran (figura 5.7a) que cuando el pretratamiento se mantiene con su valor medio la probabilidad de aumentar la producción de bioetanol disminuye pues el área que pertenece a la zona superior derecha (oscura) que es donde se encuentran los valores por encima de los 220 mL/kg b.s de residuos es mucho más pequeña que la zona superior derecha (oscura) en la figura (figura 5.7b) siendo ésta la que más probabilidad de aumentar la variable de respuesta reporta.

En el caso de la figura 5.7c se observa un área oscura en la parte superior derecha del gráfico bastante pronunciada, esta zona representa los intervalos de valores en los que se obtuvo la mayor producción de bioetanol.

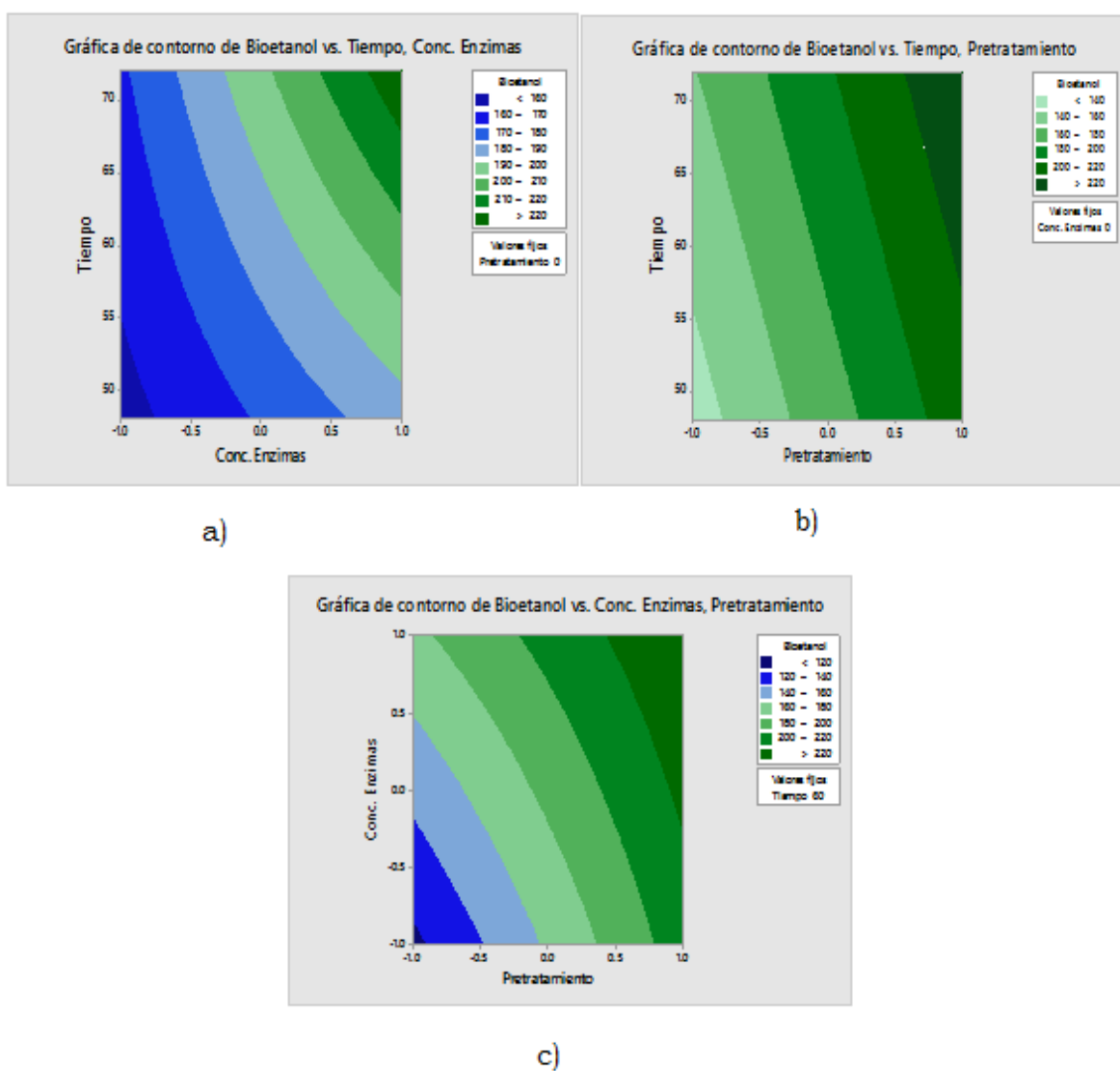


Figura 5.7 Gráficas de contornos de residuo maíz a) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Gráfica de contorno de Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas.

En la revisión bibliográfica realizada para esta investigación no se encontraron análisis estadísticos con el objetivo de determinar qué tipos de condiciones de operaciones tienen un mayor impacto en la realización del proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS). El análisis estadístico tiene como principal objetivo determinar en qué intervalos deben encontrarse los factores (pretratamiento, concentración de enzimas y tiempo) para obtener la mayor producción de bioetanol de cada uno de los residuos (poda, alimentos y maíz).

También se determinaron de qué combinaciones de factores (pretratamiento, concentración de enzimas y tiempo) influyen con mayor fortaleza en la producción de bioetanol, lo que tiene una importancia a la hora de realizar posteriores estudios de esta rama, porque va permitir determinar de la manera más exacta posible los pretratamientos, las concentraciones de enzimas y los tiempos del proceso. Todo lo anteriormente planteado está enfocado en mejorar los rendimientos y la producción de este tipo de bioproceso.

6 CONCLUSIONES

El proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) de los residuos de poda, alimentos y maíz, pretratados a bioetanol permite obtener mayores productividades volumétricas de etanol y rendimientos globales que el proceso de etapas separadas. La combinación del pretratamiento mecánico (molienda) y el químico (ácido sulfúrico diluido) es un método efectivo para alterar la estructura de los residuos orgánicos utilizados (poda, alimentos y maíz) favoreciendo la accesibilidad de las enzimas en la etapa de hidrólisis enzimática, y su efectividad depende de la severidad del pretratamiento y del tamaño de partícula empleado durante el mismo.

El tiempo de reacción es una de las variables principales del proceso, al realizar los ensayos con las mismas condiciones, la variación del tiempo trajo como consecuencia el aumento de la producción de bioetanol de aproximadamente entre el 15 y el 23 % cuando se comparó las producciones de bioetanol del proceso de 72 horas contra el proceso realizado a 48 horas. Las mayores producciones de bioetanol se obtuvieron cuando se realizó el proceso empleando un tiempo de 72 horas.

La combinación del pretratamiento mecánico (molienda) y el químico (ácido sulfúrico diluido) es un método efectivo para alterar la estructura los residuos orgánicos utilizados (poda, alimentos y maíz) favoreciendo la accesibilidad de las enzimas en la etapa de hidrólisis enzimática. La combinación de los pretratamientos provoca una solubilización parcial de la hemicelulosa y una mayor concentración de la celulosa en material pretratado completo, cuya proporción depende de la severidad del pretratamiento y del tamaño de partícula empleado durante el mismo.

La utilización del pretratamiento químico combinado con el mecánico reflejó un aumento en la producción de bioetanol, de 22 a 65 % dependiendo del tipo de residuo, si se compara con el experimento realizado en las mismas condiciones, pero sólo con pretratamiento mecánico. En el caso de los experimentos realizados con pretratamiento químico se lograron rendimientos del proceso de sacarificación y fermentación simultánea por encima del 30 %.

Se observó que una variación en la concentración de las enzimas de (40 mg de CELUZYME y 300 µl de CELUZYME XB) a (80 mg de CELUZYME y 600 µl de CELUZYME XB) provocó un aumento de entre 1 y 7% en la degradación de los azúcares en el proceso de fermentación. Además, se acrecentó

significativamente las cantidades de bioetanol para cada uno de los residuos en intervalos que varían del 25 al 40 %. Sin embargo, cuando se utilizó una concentración mayor a (80 mg de CELUZYME y 600 μ l de CELUZYME XB) las producciones comenzaban a disminuir.

Del resultado de análisis estadístico se puede concluir que las mejores condiciones para obtener bioetanol son utilizar la combinación del pretratamiento químico con el mecánico, realizando el proceso de sacarificación y fermentación simultánea en un intervalo de tiempo entre 70 y 72 horas y utilizando la mezcla de enzimas con alta concentración.

Los mejores resultados de producción de bioetanol se obtuvieron al realizar los experimentos utilizando residuos provenientes de alimentos y utilizando los factores pretratamiento, concentración de enzimas y tiempo en sus niveles altos, esto se debe a que su material lignocelulósico es menos complejo que el de los otros residuos (poda y maíz). La producción máxima de bioetanol fue de 282.8 mL lo que significó un incremento de un 9 % con respecto a la máxima producción con residuos de maíz y un 50% de la máxima producción con los residuos de poda en las mismas condiciones.

RECOMENDACIONES

Realizar las determinaciones de azúcares reductores con una frecuencia de 6 a 8 horas durante el proceso, para poder analizar la cinética de proceso y encontrar los tiempos durante éste donde obtiene la mayor producción de azúcares reductores, además de encontrar la ecuación general del modelo.

Utilizar levaduras termotolerantes y con alta resistencia a los productos tóxicos se producen durante los pretratamientos, para poder elevar las temperaturas y la eficiencia en cuanto a producción, además poder utilizar el material pretratado completo, y así evitar tener otra etapa durante el proceso como los lavados y las desintoxicaciones que elevan el costo final de la producción.

Utilizar las etapas de proceso de forma simultánea es decir pretratamiento, hidrólisis y fermentación, y realizar el proceso con cepas recombinantes modificadas genéticamente y lograr la producción de las enzimas dentro de proceso y así disminuir los costos por la obtención de enzimas comerciales.

7 REFERENCIAS

- [1] M. Zhang, F. Wang, R. Su, W. Qi, and Z. He, "Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 13, pp. 4959–4964, 2010.
- [2] D. Dahnum, S. Octavia, E. Triwahyuni, and M. Nurdin, "Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch," *Energy Procedia*, vol. 68, pp. 107–116, 2015.
- [3] M. E. Tomás Pejó, "Bioetanol De Paja De Trigo: Estrategias De Integración De Las Etapas Del Proceso.," UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, 2010.
- [4] J. Arbutó, T. Martínez, and F. Murrieta, "Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos Technical and economical evaluation of bioethanol production from lignocelulosic residues," *Tecnol. Ciencia, Educ.*, vol. 23, no. 1, pp. 23–30, 2008.
- [5] Gob. N.L, "Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey www.sadm.gob.mx," *Cuatro generaciones de biocombustible en búsqueda de la sustentabilidad*, 2016. [Online]. Available: <http://www.sadm.gob.mx/PortalSadm/jsp/seccion.jsp?id=298>.
- [6] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, and M. J. Negro, "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 13, pp. 4851–61, Jul. 2010.
- [7] Y. Sun and J. Cheng, "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review," *Bioresour. Technol.*, vol. 83, no. 1, pp. 1–11, May 2002.
- [8] N. Sarkar, S. K. Ghosh, S. Bannerjee, and K. Aikat, "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview," *Renew. Energy*, vol. 37, no. 1, pp. 19–27, 2012.
- [9] A. Singh, D. Pant, N. E. Korres, A.-S. Nizami, S. Prasad, and J. D. Murphy, "Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: Challenges and perspectives," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 13, pp. 5003–5012, 2010.
- [10] M. C. Fernandes, M. D. Ferro, A. F. C. Paulino, J. A. S. Mendes, J. Gravitis, D. V. Evtuguin, and A. M. R. B. Xavier, "Bioresource

- Technology Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion,” *Bioresour. Technol.*, vol. 186, pp. 309–315, 2015.
- [11] F. O. Licht, “World Biodiesel Markets The Outlook to 2010 study from World Biodiesel Markets The Outlook to 2010,” *Balanc. Sheet*, 2010.
- [12] Ó. J. Sánchez and C. a. Cardona, “Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks,” *Bioresour. Technol.*, vol. 99, pp. 5270–5295, 2008.
- [13] V. B. Agbor, N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin, and D. B. Levin, “Biomass pretreatment: Fundamentals toward application,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 675–685, 2011.
- [14] A. T. W. M. Hendriks and G. Zeeman, “Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 1, pp. 10–8, Jan. 2009.
- [15] P. Kumar, D. M. Barrett, M. J. Delwiche, and P. Stroeve, “Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production,” *Ind. Eng. Chem. (Analytical Ed.)*, pp. 3713–3729, 2009.
- [16] S. K. Ritter, “Cover Story – Lignocellulose A Complex Biomaterial,” *Chemical & Engineering News*, 2008. [Online]. Available: <http://cen.acs.org/articles/86/i49/Lignocellulose-Complex-Biomaterial.html>. [Accessed: 25-Apr-2015].
- [17] J. Manuel and G. Camús, “b i o c a r b u r a n t e s líquidos: biodiésel y bioetanol.” Consejería de educación, Comunidad de Madrid, Madrid, España, p. 122, 2006.
- [18] C. Ministerio de Economía, MINECO Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, M. Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, S. Secretaría de Industria y Comercio, and M. Ministerio del Economía, Industria y Comercio, “BIOCOMBUSTIBLES. ETANOL CARBURANTE ANHIDRO Y ETANOL CARBURANTE ANHIDRO DESNATURALIZADO Y SUS MEZCLAS CON GASOLINA. ESPECIFICACIONES.,” 2005.
- [19] B. D. Solomon, J. R. Barnes, and K. E. Halvorsen, “Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 31, no. 6, pp. 416–425, 2007.
- [20] I. E. Agency, “IEA - Biofuels,” *Government Fuel Blending Mandates*, 2013. [Online]. Available: <http://www.iea.org/etp/tracking/biofuels/>.

- [21] R. Zhang, H. M. El-Mashad, K. Hartman, F. Wang, G. Liu, C. Choate, and P. Gamble, "Characterization of food waste as feedstock for anaerobic digestion," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 4, pp. 929–935, 2007.
- [22] Sedema, "Inventario de Residuos Sólidos del Distrito Federal 2012," 2013. [Online]. Available: <http://www.sedema.df.gob.mx/flippingbook/inventario-residuos-solidos-2012/>. [Accessed: 16-May-2015].
- [23] JICA Kokusai Kogyo Co. Ltd, "Estudio sobre el manejo de residuos sólidos para la Ciudad de México de Los Estados Unidos Mexicanos, Informe Final, Vol. I," vol. Volumen I, p. 131, 1999.
- [24] Secretaría de hacienda y crédito público (SHCP), "Panorama del Maíz," pp. 3–4, 2014.
- [25] V. M. Escamilla, "Residuos del maíz, idea emprendedora - Emprendedores - CNNExpansion," *11 de septiembre*, México, p. 2, 2012.
- [26] P. Arenas-Cardenas, A. López-López, E. León-Becerril, and G. E. Moeller-Chávez, "Current Pretreatments of Lignocellulosic Residues in the Production of Bioethanol," *Waste Biomass Valorization*, vol. 1–21, p. 21, 2016.
- [27] C. Cara, E. Ruiz, J. M. Oliva, F. Sáez, and E. Castro, "Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 6, pp. 1869–1876, 2008.
- [28] E. Varga, K. Réczey, and G. Zacchi, "Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility.," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 113–116, pp. 509–523, 2004.
- [29] I. Ballesteros, M. J. Negro, J. M. Oliva, A. Cabañas, P. Manzanares, and M. Ballesteros, "Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw.," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 129–132, pp. 496–508, 2006.
- [30] B. Yang and C. E. Wyman, "Effect of Xylan and Lignin Removal by Batch and Flowthrough Pretreatment on the Enzymatic Digestibility of Corn Stover Cellulose," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 86, no. 1, pp. 88–95, 2004.
- [31] H. Alizadeh, F. Teymouri, T. I. Gilbert, and B. E. Dale, "Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX).," *Appl. Biochem.*

Biotechnol., vol. 121–124, pp. 1133–1141, 2005.

- [32] Q. Li, Y. C. He, M. Xian, G. Jun, X. Xu, J. M. Yang, and L. Z. Li, “Improving enzymatic hydrolysis of wheat straw using ionic liquid 1-ethyl-3-methyl imidazolium diethyl phosphate pretreatment,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 14, pp. 3570–3575, 2009.
- [33] B. C. Saha, L. B. Iten, M. a. Cotta, and Y. V. Wu, “Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol,” *Process Biochem.*, vol. 40, no. 12, pp. 3693–3700, 2005.
- [34] H. C. Pelaez, M. C. Betancur, C. M. Gomez, and A. A. Cárdenas, “Producción de etanol a partir de harina de yuca en un sistema de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea,” *Dyna*, vol. 78, pp. 158–166, 2011.
- [35] L. F. Mejía, D. C. Albán, R. Cuervo, and J. Durán, “Hidrólisis y fermentación alcohólica simultánea (HFS) del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L) utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* spp y cepa recombinante RH 218 *,” 2009.
- [36] I. Ballesteros, J. M. Oliva, M. J. Negro, P. Manzanares, and M. Ballesteros, “Proceso de sacarificación y fermentación simultáneas para la conversión de la fracción celulósica del residuo de la extracción del aceite de oliva en etanol,” *Grasas y Aceites*, vol. 53, pp. 282–288, 2002.
- [37] Y.-S. Lin, W.-C. Lee, K.-J. Duan, and Y.-H. Lin, “Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation in rotary drum reactor using thermotolerant *Kluveromyces marxianus*,” *Appl. Energy*, vol. 105, pp. 389–394, May 2013.
- [38] L. R. Lynd, W. H. Van Zyl, J. E. McBride, and M. Laser, “Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass : an update,” pp. 577–583, 2005.
- [39] G. L. Miller, “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar,” *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.
- [40] D. Montgomery, *Diseño y análisis de experimentos*, Segunda. México, 2004.
- [41] D. R. Mertens, M. Allen, J. Carmany, J. Clegg, a. Davidowicz, M. Drouches, K. Frank, D. Gambin, M. Garkie, B. Gildemeister, D. Jeffress, C. S. Jeon, D. Jones, D. Kaplan, G. N. Kim, S. Kobata, D. Main, X. Moua, B. Paul, J. Robertson, D. Taysom, N. Thiex, J. Williams, and M. Wolf, “Gravimetric determination of amylase-treated

neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study,” *J. AOAC Int.*, vol. 85, no. 6, pp. 1217–1240, 2002.

- [42] FAO, “Nutricion Y Alimentacion De Peces Y Camarones Cultivados Manual De,” 1986. [Online]. Available: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/ab492s06.htm>.

8 APÉNDICES

8.1 Apéndice A

Método de DNS

Fundamento: Para la realización de este proceso es necesario preparar varias soluciones, descritas a continuación.

Objetivo: Determinar la concentración de azúcares reductores en tres diferentes sustratos.

Reactivos	Símbolos y abreviaturas
Glucosa anhidra	% porcentaje
Hidróxido de sodio (NaOH)	mL mililitro
Tartrato de sodio y potasio	°C grados centígrados
DNS (ver solución 1)	nm nanómetros
Agua destilada	g gramos

Preparación de solución (stock) de glucosa (0.4 %).

- Tomar 0.4 g de glucosa.
- Disolver en agua destilada y aforar a 100 mL.

Preparación del DNS.

Solución 1

- Pesar 1.6 g de NaOH
- Pesar 30 g de Tartrato de sodio y potasio.
- Disolverlos con 50 mL de agua destilada.

Solución 2

- Pesar 1 g de DNS.
- Disolver con 30 mL de agua destilada.
- Agregar lentamente y con agitación la (Solución 2) a la (Solución 1).

- d. Ajustar aforo a 100 mL
- e. Filtrar
- f. Envasar en frasco ámbar.

Tabla 8.1 Soluciones patrón para la elaboración de la curva de calibración del método de DNS.

	Muestras						
	Blanco	1	2	3	4	5	6
Glucosa (0.4 %) (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
Agua destilada (mL)	2	1.9	1.8	1.7	1.6	1.51	1.4
g/L de glucosa	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2

1. 0.5 mL de muestra problema o 0.5 mL de solución patrón con 0.5 mL de agua destilada.
2. Adicionar 0.5 mL de DNS.
3. Agitar los tubos con vortex.
4. Llevar a ebullición por 5 minutos en baño maría.
5. Enfriar a temperatura ambiente.
6. Adicionar a cada tubo 5 mL de agua destilada y agitar con vortex.
7. Dejar en reposo 15 minutos.

Lectura de la absorbancia

- a) Encender el espectrofotómetro y esperar 10 minutos.
- b) Seleccionar la longitud de onda (546_m).
- c) Introducir la muestra que funcionará como blanco.
- d) Se introduce la celda en el espectrofotómetro, se leen los datos.
- e) Continuar el mismo procedimiento con las demás diluciones, vertiéndolas de menor a mayor concentración.
- f) Enjuagar la celda con agua destilada.
- g) Concentrar datos en una tabla y hacer gráfico de calibración.
- h) Calcular azúcares reductores usando gráfica de absorbancia y fórmula.

Tabla 8.2 Curva de calibración con glucosa anhidra para el método de DNS.

Muestra	Concentración de glucosa (g/L)	Absorbancia 1 (nm)	Absorbancia 2 (nm)	Promedio
Blanco	0	0	0	0
1	0.2	0.071	0.078	0.0745
2	0.4	0.149	0.158	0.1535
3	0.6	0.23	0.234	0.232
4	0.8	0.314	0.319	0.3165
5	1.0	0.401	0.407	0.404
6	1.2	0.492	0.474	0.483

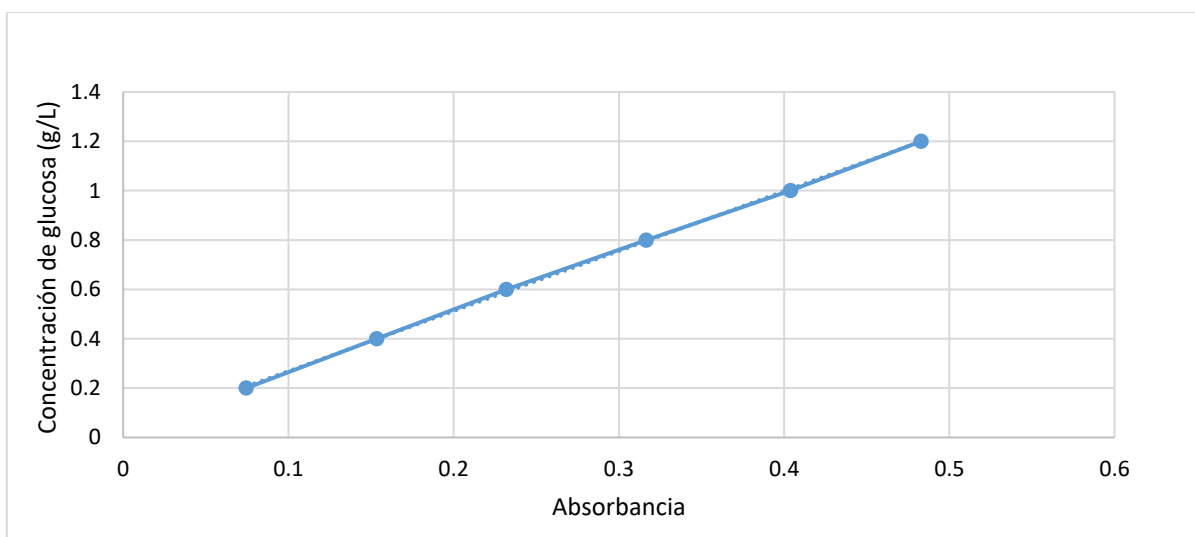


Figura 8.1 Curva de calibración para el método DNS. La línea punteada representa el ajuste de los datos.

La línea punteada de la figura 8.1 representa el ajuste lineal de los datos y la ecuación que lo representa es $y = 2.431 * x + 0.026$ con un $R^2=0.9997$.

8.2 Apéndice B

Resultados del análisis estadístico para los residuos de poda.

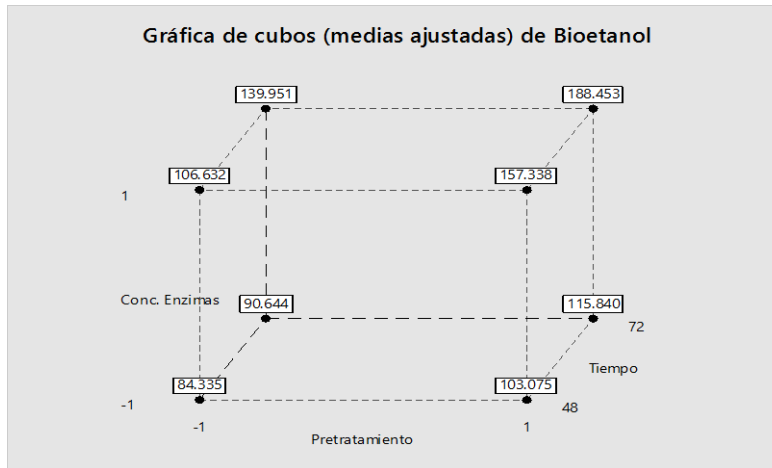


Figura 8.2 Gráfica de cubos de bioetanol para el residuo de poda.

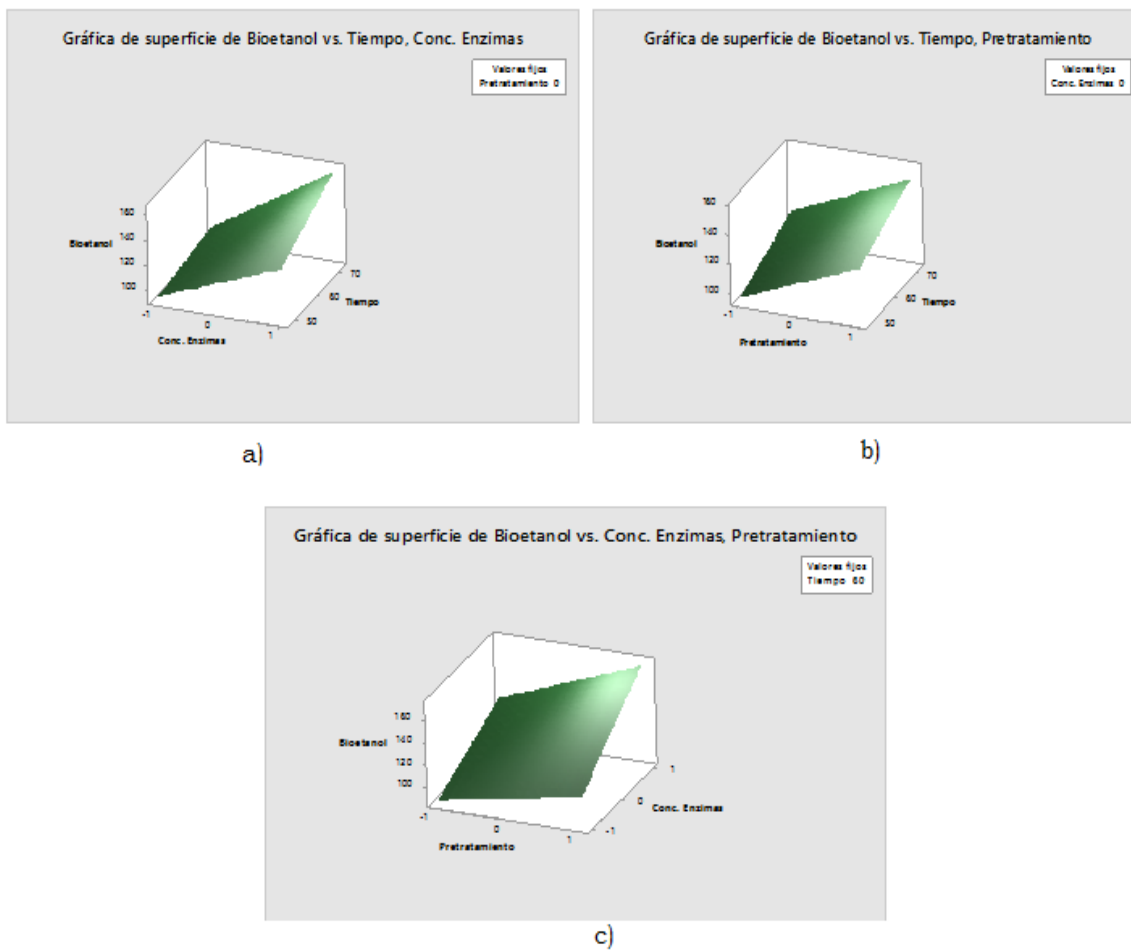


Figura 8.3 Gráficas de superficie de residuo poda a) Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento.

Resultados del análisis estadístico para los residuos de alimentos.

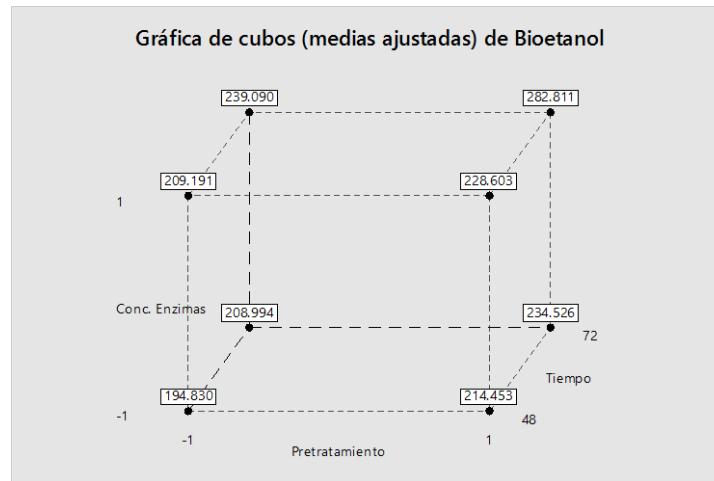


Figura 8.4 Gráfica de cubos de bioetanol para el residuo de alimentos.

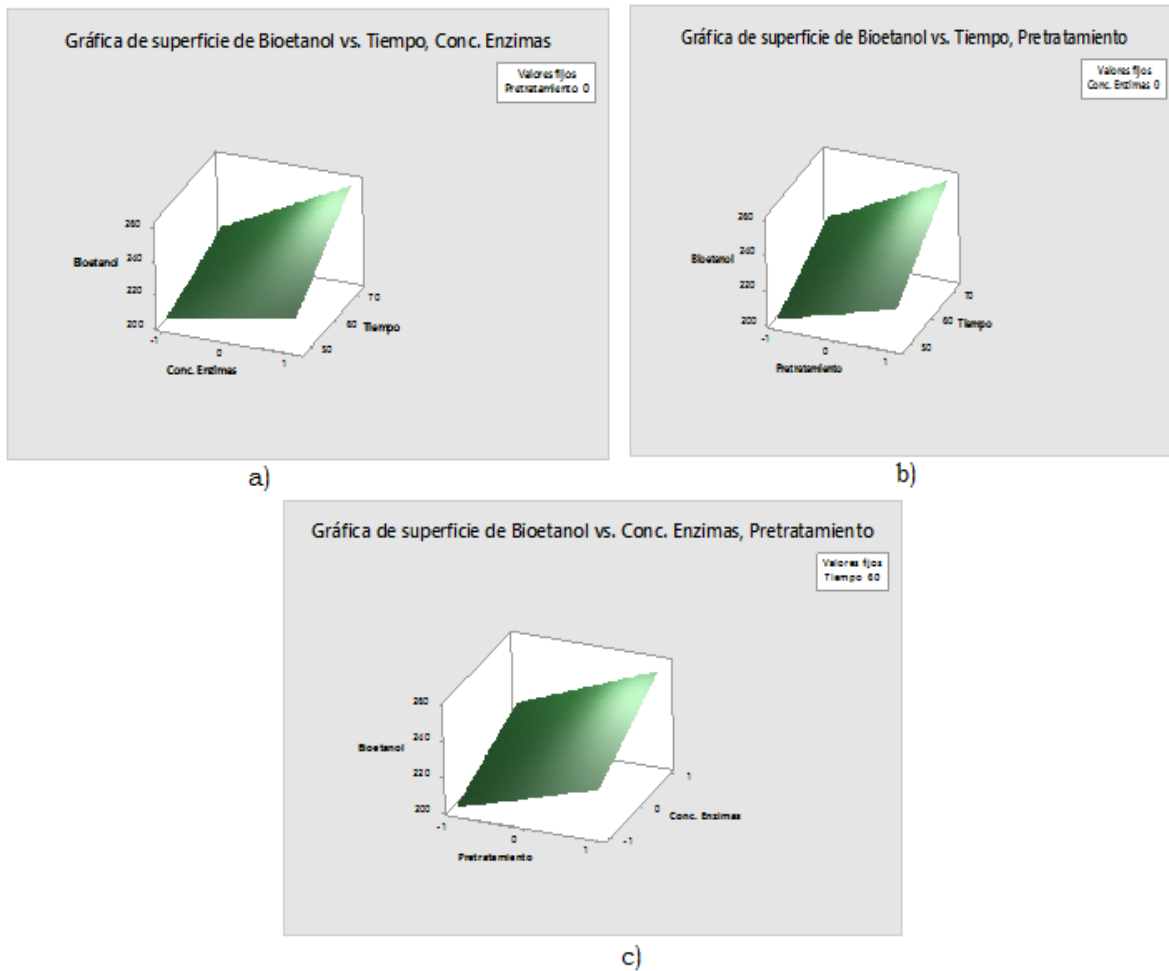


Figura 8.5 Gráficas de superficie de residuo alimentos a) Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretreatment y c) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretreatment.

Resultados del análisis estadístico para los residuos de maíz.

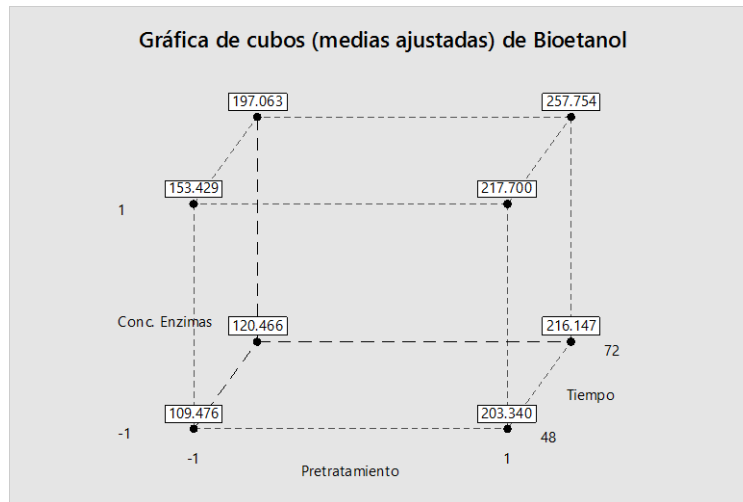


Figura 8.6 Gráfica de cubos de bioetanol para el residuo de alimentos.

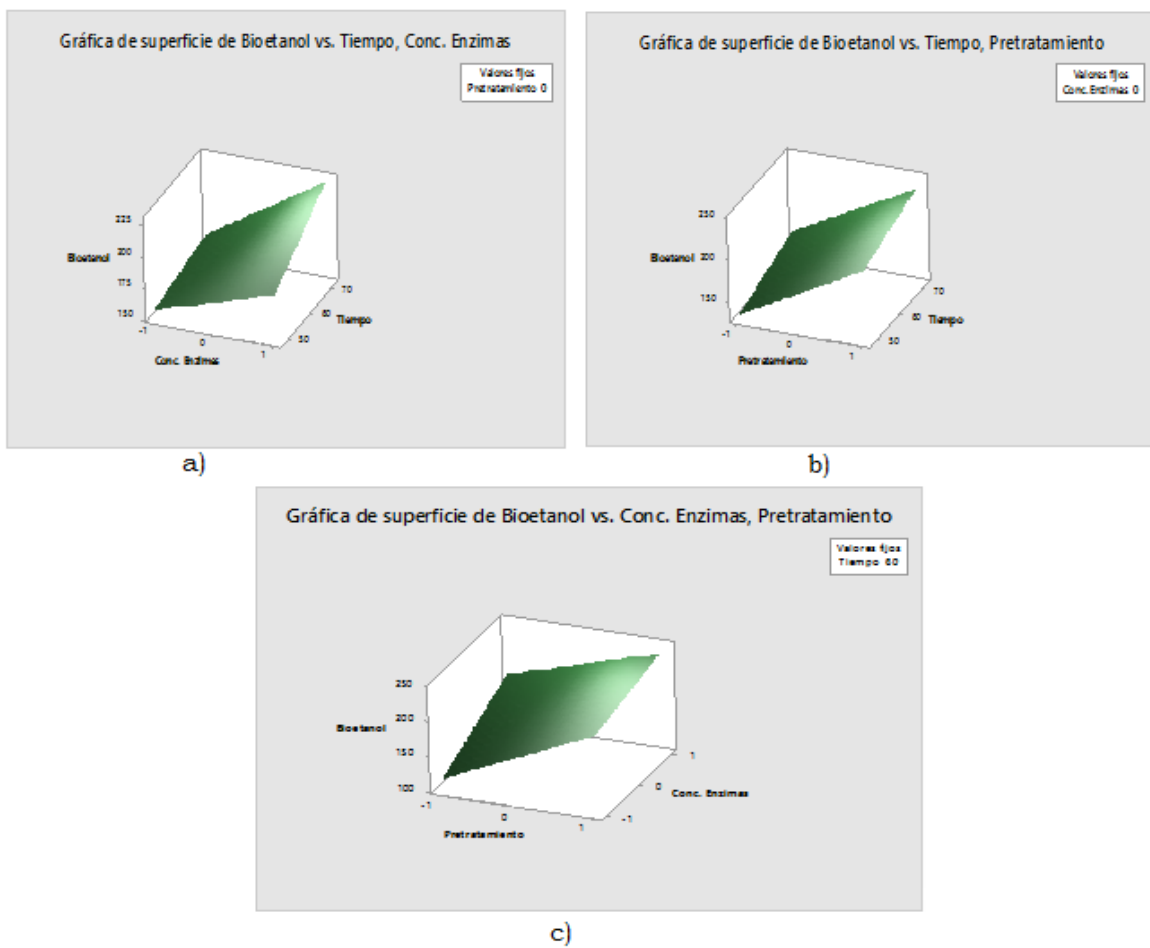


Figura 8.7 Gráficas de superficie de residuo alimentos a) Bioetanol vs. Tiempo, Concentración de enzimas, b) Bioetanol vs. Tiempo, Pretratamiento y c) Bioetanol vs. Concentración de enzimas, Pretratamiento.

8.3 Apéndice C

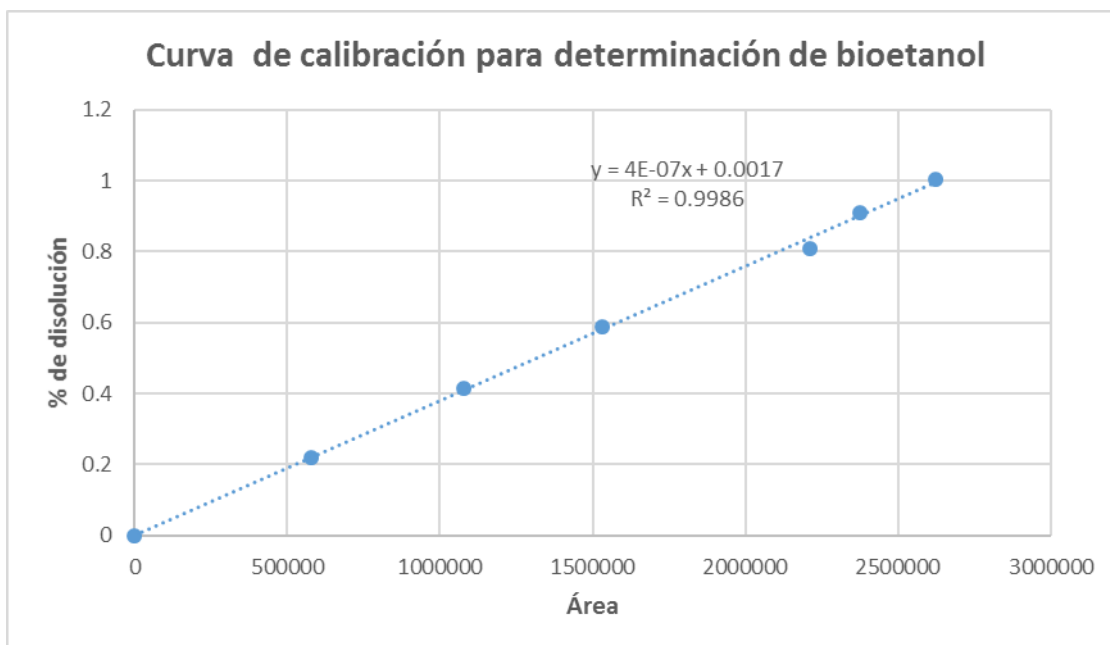


Figura 8.8 Curva de calibración de porcentaje de bioetanol contra área.

La línea punteada de la figura 3.5 representa el ajuste lineal de los datos entre los porcentajes de 0 a 1 contra las áreas reportadas y la ecuación que lo representa es $y = 2 * E^{-07} * x + 0.0017$ con un $R^2=0.9986$.