



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

“Obtención de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas a partir de la biomasa lignocelulósica de tallos de sorgo dulce”

Tesis que presenta

Q.F.B. Mintzirani Equihua Sánchez

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA
RENOVABLE**

Mérida Yucatán, Diciembre 2013

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del centro de investigación científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la ley federal del derecho de autor y la ley de la propiedad industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho centro de investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la ley federal del derecho de autor y la ley de la propiedad industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

Mérida, Yucatán, México

10 de Diciembre de 2013

QFB. Mintzirani Equihua Sánchez

El trabajo de tesis titulado “Obtención de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas a partir de la biomasa lignocelulósica de tallos de sorgo dulce”, fue desarrollado por el QFB. Mintzirani Equihua Sánchez en las instalaciones del laboratorio USF15 de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Barahona Pérez y de la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché, conforme al programa de Maestría en Ciencias en Energía Renovable.

Dr. Felipe A. Vázquez Flota
Coordinación de Docencia
Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Dedicatoria:

Esta tesis la dedico a la VIDA, que siempre encuentra el camino para salir adelante, que no se rinde, que nos sorprende, nos maravilla.

Mi trabajo lo dedico a toda la HUMANIDAD, esperando que sirva para transitar hacia una sociedad más justa e igualitaria, que trate a la Tierra como un igual, con respeto y humildad, para que nuestra raza consiga por fin, vivir en armonía con los demás seres vivos y con la Tierra misma.

Personalmente dedico mis logros a mis PADRES, Maximina Sánchez y Martín Equihua. A mis HERMANOS, Tsezihangari, Zirahuén y Tzuryxeni Equihua. Sin ellos apoyándome día con día, esto no hubiese sido posible.

Por último, dedico éste trabajo a la mujer a quien le he dedicado todo desde que la conocí... Emma Beatriz B. H.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es el resultado de dos años de intensa investigación científica en la cual, han participado muchas personas brindándome su ayuda, sus consejos y conocimientos. Me permitieron aprender de ellos motivando y dando dirección a mi aun temprana carrera científica. Les doy las gracias y mi respeto, ustedes han hecho de mí una mejor persona, me han formado como científico y sin duda alguna hoy soy un mejor ciudadano, orgulloso de poder poner en alto el nombre de México.

Agradezco a:

- A mi comité tutorial, en especial a mi director ^[1] y a mi codirectora ^[2].
 - Dr. Luis Felipe Barahona Pérez ^[1]
 - Dra. Blondy Beatriz Canto Canché ^[2]
 - Dra. Liliana Alzate Gaviria
 - Dr. Fernando Antonio Peraza Luna
- A mis profesores en el programa de Maestría en Ciencias en Energía Renovable.
- A mis revisores, interno y externo, Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda y Dr. Agustín Jaime Castro Montoya
- A todos mis compañeros de maestría, en especial a Flor Fonseca, Zaira Barquera, Marisol Delgado, Diana Picciotto, Nancy Gonzalez, Guadalupe Revelez y Paola García.
- A todos mis amigos con los que compartí estos dos grandes años: Irving, Alfredo, Eduardo, Jorge, Pepe, Omar, Lizandro, Zamaria, Laurita, Joel, Ana, Lau, Vero, Aldo, Brenda, Jorge Carlos, Magda, Vincent.
- A todos los compañeros de la Unidad de Energía Renovable. A Jorge Domínguez y Tanit Toledano por el apoyo técnico en el laboratorio.
- A los siempre valientes integrantes del equipo de futbol CICY-MIX.
- A todos los mexicanos por hacer posible las becas CONACYT.
- Al CONACYT por el otorgamiento de la beca número 326960.

Por último, quiero agradecer a la Ciencia, por permitirnos mirar en la hermosa y compleja inmensidad del Universo.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| Índice de figuras..... | iii |
| Índice de tablas..... | v |
| Resumen | vii |
| Abstract..... | viii |
| Introducción..... | 1 |
| Capítulo 1 | 3 |
| Antecedentes | 3 |
| 1.1. El petróleo y su carácter finito..... | 3 |
| 1.2. Gases de efecto invernadero..... | 5 |
| 1.3. El cambio climático global antropogénico. | 6 |
| 1.4. Energía renovable, biocombustibles..... | 6 |
| 1.5. Cultivos energéticos. | 7 |
| 1.6. Sorgo Dulce. | 8 |
| 1.7. Bagazo de sorgo dulce..... | 9 |
| 1.8. Material lignocelulósico. | 11 |
| 1.9. Etanol carburante. | 15 |
| 1.10. Producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos. | 16 |
| 1.11. Sacarificación y fermentación simultáneas..... | 23 |
| Justificación..... | 25 |
| Hipótesis | 26 |
| Objetivos | 27 |
| Objetivo general | 27 |
| Objetivos específicos | 27 |
| Capítulo 2 | 28 |
| Materiales y Métodos..... | 28 |
| 2.1. Recolección y procesamiento de la muestra..... | 28 |
| 2.2. Composición química del bagazo de sorgo dulce. | 29 |
| 2.3. Pretratamiento termoquímico..... | 29 |
| 2.4. Hidrólisis enzimática (sacarificación). | 30 |
| 2.4.1. Determinación de carga de sustrato (CS). | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.2. Determinación de la carga enzimática óptima..... | 31 |
| 2.4.3. Sacarificación. | 32 |
| 2.5. Determinación de la estabilidad catalítica del preparado enzimático | |
| Accellerase 1500® respecto al tiempo..... | 32 |
| 2.6. Determinación de azúcares reductores (AR)..... | 32 |
| 2.7. Determinación de Etanol..... | 33 |
| 2.8. Fermentación..... | 33 |
| 2.9. Preparación del inóculo y curva de crecimiento..... | 33 |
| 2.10. Sacarificación y Fermentación Simultáneas. | 33 |
| 2.11. Destilación. | 34 |
| 2.12. Análisis Estadístico..... | 34 |
| Capítulo 3 | 35 |
| Resultados y Discusión | 35 |
| 3.1. Composición del bagazo de sorgo dulce. | 35 |
| 3.2. Pretratamientos. | 36 |
| 3.3. Hidrólisis enzimática (sacarificación). | 39 |
| 3.3.1. Carga de sustrato. | 39 |
| 3.3.2. Carga enzimática óptima para la sacarificación. | 40 |
| 3.4. Determinación de la estabilidad catalítica del preparado enzimático | |
| Accellerase 1500® respecto al tiempo..... | 41 |
| 3.5. Sacarificación enzimática del bagazo pretratado..... | 42 |
| 3.6. Producción de etanol por sacarificación y fermentación en etapas | |
| separadas (SFES)..... | 47 |
| 3.7. Producción de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas | |
| (SFS)..... | 49 |
| Conclusiones | 54 |
| Perspectivas | 55 |
| Bibliografía..... | 56 |
| Anexo 1..... | 62 |
| Determinación de Azúcares Reductores | 62 |
| Determinación de Etanol | 63 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Incremento de la población mundial comparada con el aumento en la producción de petróleo. | 3 |
| Figura 2. México bajo un modelo de Hubbert modificado (multicíclico). | 4 |
| Figura 3. Aumento en las concentraciones de dióxido de carbono en la atmósfera al 2013. | 5 |
| Figura 4. Tendencia en emisiones de gases de efecto invernadero (CO ₂ equivalente) y consumo energético en petajoules del sector transporte en México. | 7 |
| Figura 5. Cultivo de sorgo dulce, campo experimental Tizimín Yucatán..... | 9 |
| Figura 6. Composición estructural de la biomasa vegetal. | 11 |
| Figura 7. Estructura de las cadenas de celulosa..... | 12 |
| Figura 8. Conformación de las fibrillas de celulosa. | 12 |
| Figura 9. Grupos funcionales con presencia de hidroxilos en la molécula de glucosa que permiten la creación de puentes de hidrógeno..... | 13 |
| Figura 10. Representación del arreglo cristalino y amorfo de la celulosa. | 13 |
| Figura 11. Hidrólisis de las regiones cristalinas y amorfas de la celulosa por acción de enzimas celulolíticas. | 13 |
| Figura 12. Representación de la estructura de la hemicelulosa (heteroxilano)..... | 14 |
| Figura 13. Estructura modelo de la lignina de abeto. | 15 |
| Figura 14. Producción global de etanol del año 2000 al 2010. | 16 |
| Figura 15. Acción del pretratamiento en la biomasa lignocelulósica..... | 18 |
| Figura 16. Mecanismo de acción de las celulasas en las diferentes fases de la hidrólisis..... | 21 |
| Figura 17. Reacciones en la transformación del piruvato en etanol. | 23 |
| Figura 18. Fases en la producción de etanol lignocelulósico por etapas separadas. .. | 24 |
| Figura 19. Esquema del proceso de producción de etanol lignocelulósico utilizando la técnica de sacarificación y fermentación simultáneas..... | 24 |
| Figura 20. Tallos de sorgo dulce prensados. | 28 |
| Figura 21. Bagazo de sorgo molido, tamaño de partícula de 1 mm..... | 28 |
| Figura 22. Microdestilación del mosto fermentado de bagazo de sorgo dulce. | 34 |
| Figura 23. Recuperación y pérdida de biomasa por acción de los diferentes pretratamientos..... | 37 |
| Figura 24. Imagen de la corteza y la médula del bagazo de sorgo dulce sin tratamiento vista a 40X en microscopio óptico..... | 38 |

| | |
|---|----|
| Figura 25. Bagazo de sorgo dulce pretratado visto a 20X en microscopio óptico..... | 38 |
| Figura 26. Conversión de celulosa con respecto a la carga de sustrato..... | 40 |
| Figura 27. Efecto de la carga enzimática sobre la concentración de azúcares reductores..... | 40 |
| Figura 28. Efecto del tiempo de reacción sobre la actividad catalítica de las enzimas.. | 41 |
| Figura 29. Concentraciones de azúcares reductores finales después de la hidrólisis enzimática.. | 43 |
| Figura 30. Gramos de azúcares reductores liberados por acción de la hidrólisis enzimática.. | 44 |
| Figura 31. Porcentajes de sacarificación de cada pretratamiento. | 44 |
| Figura 32. Gráfica donde se presentan 3 de las variables más importantes a tomar en cuenta para determinar el mejor pretratamiento básico-oxidativo. | 45 |
| Figura 33. Concentración de AR, gramos de AR liberados y porcentaje de sacarificación en comparación de una hidrólisis enzimática utilizando el pretratamiento 8 y biomasa sin pretratar. | 46 |
| Figura 34. Bagazo de sorgo pretratado e hidrolizado enzimáticamente. | 47 |
| Figura 35. Curva de crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a una concentración de azúcares reductores de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 125 rpm en hidrolizado de sorgo dulce. | 48 |
| Figura 36. Consumo de azúcares reductores y producción de etanol en la fermentación por etapas separadas. | 49 |
| Figura 37. Concentración de azúcares reductores y concentración de etanol en la sacarificación y fermentación simultáneas. | 50 |
| Figura 38. Concentración de azúcares reductores derivados de un proceso de sacarificación simple y uno de sacarificación y fermentación simultáneas. | 50 |
| Figura 39. Concentración de etanol de los dos sistemas, sacarificación y fermentación en etapas separadas y sacarificación y fermentación simultáneas. | 52 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Composición estructural del bagazo de Sorgo Dulce. | 10 |
| Tabla 2. Actividades enzimáticas del complejo Accellerase 1500 [®] | 22 |
| Tabla 3. Diseño factorial de los pretratamientos termoquímicos. | 29 |
| Tabla 4. Cantidad de materia prima para la determinación de la carga de sustrato. ... | 30 |
| Tabla 5. Cantidad de enzima (Accellerase 1500 [®]) a utilizar con las diferentes cargas de sustrato. | 31 |
| Tabla 6. Variables para la determinación de la carga enzimática. | 31 |
| Tabla 7. Tiempo de sacarificación y aumento de carga de sustrato. | 32 |
| Tabla 8. Composición química del bagazo de sorgo dulce. | 35 |
| Tabla 9. Principales compuestos en el bagazo de sorgo dulce seco. | 35 |
| Tabla 10. Pérdida y recuperación de biomasa por acción de los pretratamientos. | 36 |
| Tabla 11. Resultados de la sacarificación a diferentes cargas de sustrato. | 39 |
| Tabla 12. Resultados de la sacarificación enzimática de biomasa pretratada. | 42 |

RESUMEN

Debido a la creciente demanda de combustibles para el transporte provocada por el constante aumento en la población mundial, la generalizada disminución en la producción global de petróleo y los variados fenómenos climáticos atribuidos al calentamiento global, se ha hecho necesario buscar alternativas energéticas que permitan satisfacer las necesidades de la sociedad moderna, sin comprometer la capacidad de las siguientes generaciones para satisfacer las propias. Los combustibles alternativos como el bioetanol, han demostrado ser capaces de funcionar como sustitutos de los combustibles convencionales con la tecnología existente de transporte, y al ser producidos de manera sustentable, logran disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero, aumentan la seguridad energética de un país y promueven el desarrollo agroindustrial.

En este trabajo se utilizó bagazo de sorgo dulce como materia prima para la producción de etanol lignocelulósico. Se probaron 9 diferentes variaciones de un pretratamiento básico-oxidativo. Se estudió la influencia de la carga de sustrato y la carga enzimática sobre el proceso de sacarificación, y se llevó a cabo la producción de etanol bajo el esquema de sacarificación y fermentación en etapas separadas y también a través de sacarificación y fermentación simultáneas, lo que permitió compararlos y estudiar los efectos positivos y negativos del proceso simultáneo sobre los rendimientos de producción de etanol.

El pretratamiento con 6% de NaOH y 10% de H₂O₂ fue el que permitió los mejores resultados en la sacarificación enzimática, con concentraciones de azúcares reductores de 80 g·L⁻¹ en 24 h y hasta 100 g·L⁻¹ a las 48 h, con una carga de sustrato del 13% y una carga enzimática en volumen de 0.5 mL·g⁻¹. La producción de etanol en etapas separadas resultó en una concentración final de 25.09 g·L⁻¹ en 48 horas de fermentación, mientras que con la sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) se obtuvo una concentración de etanol máxima de 27.97 g·L⁻¹ a las 36 horas. Comparando las dos técnicas se observó que el proceso simultáneo aumentó la eficiencia de la hidrólisis enzimática en un 14.76%, pero disminuyó la eficiencia de la fermentación en un 34.81%. En la SFS se alcanzó una mayor producción de etanol, se acortó el tiempo del proceso y se generaron menos residuos.

ABSTRACT

Due to the growing demand for transportation fuels caused by the constant increase in the world population, as well as the general declining in global oil production and the changes on climatic conditions registered in recent years attributed to global warming, it has become necessary to find energy alternatives to satisfy the needs of modern society but without compromising the ability of future generations to assure their own needs. Alternative fuels such as bioethanol have proven to be capable of functioning as replacement for conventional fuels using the existing transportation technology. A sustainable production of fuel ethanol allows reducing greenhouse gas emissions, increasing the national energy security and promoting the agro-industrial sector development.

In this work sweet sorghum bagasse was used as feedstock for lignocellulosic ethanol production. A basic-oxidative pretreatment was developed; also the influence of the enzyme and substrate loading in the saccharification process was studied. Ethanol production was carried out by two different techniques, the separate hydrolysis and fermentation and the simultaneous saccharification and fermentation, which allowed comparing the advantages and disadvantages of the simultaneous process in the final ethanol production.

The pretreatment with 6% NaOH and 10% H₂O₂ showed the best results in the enzymatic saccharification. Reducing sugars concentration of 80 g·L⁻¹ and 100 g·L⁻¹ were achieved at 24 and 48 hours, respectively, using 13% substrate loading and 0.5 mL·g⁻¹ of enzyme loading. The ethanol production by separate processes resulted in a final ethanol concentration of 25.09 g·L⁻¹ after 48 h fermentation, meanwhile the simultaneous saccharification and fermentation achieved a maximum ethanol concentration of 27.97 g·L⁻¹ after 36 h. When comparing the two techniques, it was observed that the simultaneous saccharification and fermentation increased the enzymatic hydrolysis efficiency by 14.76% but decreased the fermentation efficiency in 34.81%. Nevertheless, the final ethanol production was higher using simultaneous saccharification and fermentation and the time consumed by the whole process was shorter.

INTRODUCCIÓN

El sector transporte es sin lugar a duda uno de los más grandes dinamizadores del desarrollo social y económico de cualquier país. Contar con vehículos que faciliten el transporte de bienes, personas, materias primas y una gran variedad de mercancías, ha permitido alcanzar los niveles de desarrollo con el que hoy contamos como sociedad [1]. Sin embargo, el sustento de este enorme sector depende básicamente del petróleo. Al ser una materia prima tan versátil, los hidrocarburos han provisto de energía barata a prácticamente todos los motores de combustión existentes en el mundo, lo que ha provocado un grave deterioro ambiental debido a las concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI) emitidos a la atmósfera por la quema de combustibles fósiles [2], generando fenómenos como el denominado “cambio climático” [3]. Por otro lado, su indiscriminada explotación como recurso energético ha propiciado que las reservas mundiales de crudo disminuyan de manera extremadamente rápida —hablando en términos geológicos—, lo que obliga a buscar nuevas fuentes de energía que sean capaces de satisfacer la enorme demanda de combustibles a la que hoy nos enfrentamos [4, 5].

Siendo los combustibles líquidos los más ampliamente utilizados y al parecer los que seguirán siendo predominantes en los siguientes 50 años [1], se hace necesario buscar combustibles alternativos que provengan de fuentes renovables, más limpios y ambientalmente amigables, que permitan ir sustituyendo la completa dependencia que existe de los combustibles fósiles no renovables y altamente contaminantes. Una opción son los llamados biocombustibles. Esta denominación se les da a aquellas sustancias químicas producidas con fines energéticos a partir de biomasa no fosilizada y que pueden liberar energía en forma de calor en una reacción de combustión [6, 7].

Existen diferentes tipos de biocombustibles que pueden usarse como aditivos o para sustituir parcial o completamente a los combustibles de origen fósil, por ejemplo, el biodiesel para sustituir al diesel [8], la bioturbosina a la turbosina [9] y el etanol a la gasolina [6, 10].

El etanol es una sustancia química que puede ser obtenida mediante diversos procesos físico-químicos a partir de la biomasa vegetal (Bioetanol) [11]. Existen en la actualidad variadas metodologías para la producción de etanol y la elección de alguna de ellas se basa en la naturaleza de la materia prima a utilizar (azúcares simples,

almidón, celulosa) y en los diversos factores que implica un proceso de producción [12]. Para poder transformar la biomasa vegetal en etanol, son necesarios varios procesos según la tecnología de procesamiento que se esté usando, por lo que los balances energéticos incluso llegan a ser negativos [13]. La investigación sobre nuevas fuentes de materia prima (como residuos lignocelulósicos) así como procesos más eficientes de producción, permitirá obtener balances positivos y por lo tanto una fuente sustentable de energía [14, 15].

En este trabajo se estudió el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) que presenta ventajas significativas sobre la técnica más extendida que es la sacarificación y fermentación en etapas separadas. La materia prima elegida fue el bagazo de sorgo dulce, especie que ha demostrado ser un cultivo energético apto para ser explotado a gran escala [16-18].

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1. El petróleo y su carácter finito.

El petróleo existente en todo el planeta es de orden finito y actualmente es la fuente primaria de energía a nivel global, por lo que seguir disponiendo de él como materia prima para producir los combustibles utilizados en los motores de combustión, llevará indudablemente al agotamiento de este recurso y a las claras consecuencias de esto [19]. Basta observar la demanda energética actual y la tendencia que existe al incremento de la misma, para entender esta problemática [20]. La pregunta clave a responder es ¿Cuándo el petróleo llegará a su fin? Esta duda ha estado presente desde el comienzo de la explotación petrolera y ha prevalecido hasta nuestros días. La respuesta es uno de los temas que mayor especulación ha generado en los últimos años, fácilmente entendible, por las implicaciones a nivel mundial que tendrá un déficit petrolero en todos los ámbitos sociales [21].

El crecimiento y desarrollo que la sociedad ha alcanzado en los últimos 60 años ha sido vertiginoso; se ha llegado a la cifra de 7 mil millones de habitantes en un planeta donde el 60% de la población vive en zonas urbanas [22] y la demanda de energía se ha vuelto enorme (Ver figura 1), siendo de 12,150 millones de toneladas equivalentes de petróleo a nivel mundial en 2009 [23].

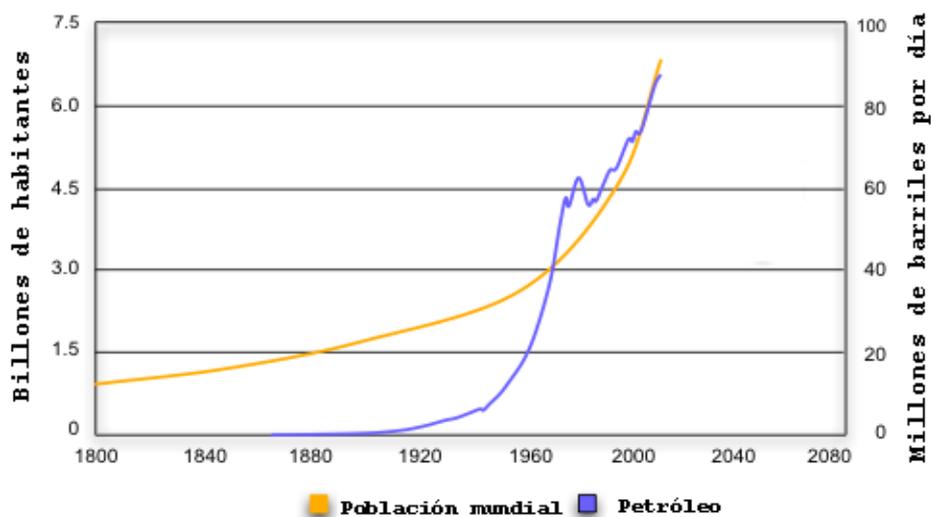


Figura 1. Incremento de la población mundial comparada con el aumento en la producción de petróleo [24, 25].

Este desmesurado crecimiento sólo ha sido posible gracias a una fuente de energía como el petróleo que históricamente a tenido un precio relativamente bajo, costado fácilmente por las ganancias generadas por la explotación de sus subproductos (el petróleo ha tenido un precio promedio real de 48.14 dólares por barril entre 1968 y 2012 con picos de 17.24 y hasta 106.3 dólares por barril [26]) además de ser abundante [27] y del cual cada barril proporciona un poder calorífico de 6,382 megajoules [28].

No fue hasta mediados de los años 50, con los trabajos del Dr. Marion King Hubbert [29] cuando verdaderamente la atención mundial se volcó sobre el tema del cenit petrolero. El Dr. Hubbert expuso que a finales del Siglo XX y principios del Siglo XXI, el petróleo llegaría a su máximo de producción mundial, cayendo después en un descenso sin retorno [30]. Un estudio hecho al sistema petrolero mexicano usando un modelo de Hubbert mejorado [31] muestra compatibilidad con estas predicciones en nuestro país (Ver figura 2).

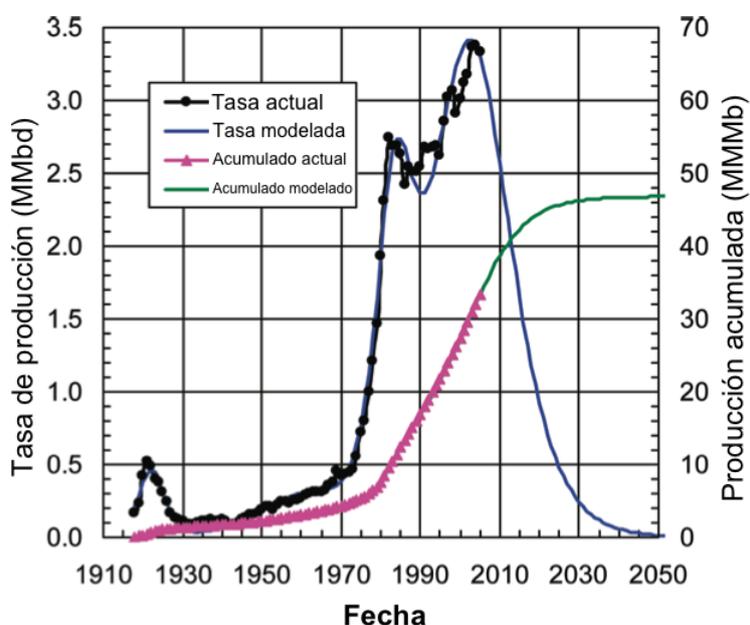


Figura 2. México bajo un modelo de Hubbert modificado (multicíclico) [31].

Para que las siguientes generaciones tengan los beneficios energéticos que la civilización moderna ha gozado hasta ahora, es necesario encontrar alternativas energéticas que permitan su desarrollo, pero que no comprometan la seguridad ambiental del planeta. La alternativa es utilizar fuentes renovables de energía y tecnologías eficientes de aprovechamiento.

1.2. Gases de efecto invernadero.

El efecto invernadero es causado por algunos gases presentes en la atmósfera, los cuales actúan como un filtro que aumenta o disminuye la permeabilidad de la atmósfera hacia la radiación emitida por el Sol y re-emitada por la tierra, por lo cual son llamados “gases de efecto invernadero (GEI)”. El dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4), el vapor de agua y el ozono (O_3) son de los principales. El ozono actúa como una barrera para los rayos ultravioleta provenientes del Sol, mientras que los otros, dejan pasar toda la gama de luz visible hacia la Tierra (radiaciones de onda corta y onda media), la que al ser irradiada, emite radiación infrarroja (radiación de onda larga, radiación térmica) de regreso a la atmósfera; los GEI absorben esa radiación, impidiendo que el calor salga de la atmósfera y emitiéndolo nuevamente a la superficie terrestre [3]. Las concentraciones de CO_2 (GEI de referencia) en la atmósfera han alcanzado alrededor de 400 ppm según datos reportados por el observatorio de Mauna Loa en Hawaii, donde se tienen mediciones ininterrumpidas de estas moléculas desde 1956 (Ver figura 3) [32]. Se dice que las concentraciones propicias están alrededor de 250 ppm, que son las concentraciones que se tenían en la época preindustrial.

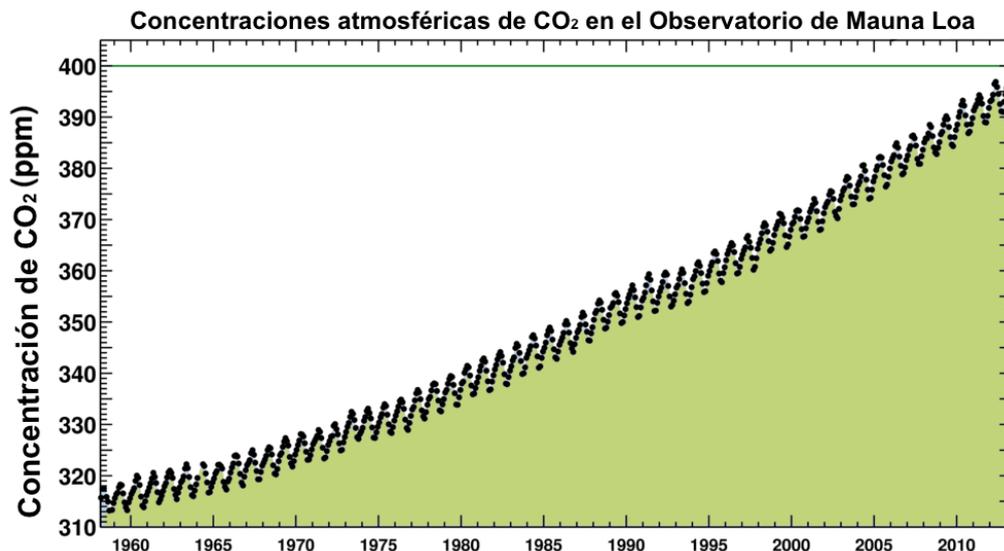


Figura 3. Aumento en las concentraciones de dióxido de carbono en la atmósfera al 2013 [32].

Desde la revolución industrial se han emitido contaminantes gaseosos hacia la atmósfera debido a la combustión de hidrocarburos como lo es el carbón, y posteriormente combustibles líquidos derivados del petróleo. Estos gases no se “eliminan” de la atmósfera rápidamente –haciendo referencia a que su tiempo de

residencia en la atmósfera es de varias décadas, hasta incluso cientos y miles de años según sea el caso—. Con el paso del tiempo, las emisiones y por consiguiente las concentraciones de GEI se incrementan, lo que va aumentando el problema gradualmente, aunado a la falta de acciones para mitigarlo [33].

1.3. El cambio climático global antropogénico.

En la actualidad, el mundo pasa por un gran problema que ha venido afectando a todos de mayor o menor forma y que en los próximos años amenaza seriamente con acrecentarse: el “Cambio Climático Global Antropogénico”. El clima es el resumen estadístico de varios años (de décadas al menos) del comportamiento de elementos como la precipitación pluvial, la temperatura del aire, humedad atmosférica, soleamiento, velocidad del viento, frecuencia de fenómenos tales como la niebla, heladas, tormentas eléctricas, granizo, etc. El cambio climático entonces es una modificación del patrón estadístico normal (de tres o más décadas) y que es igualmente perdurable por varios años, por tanto, en principio, es un fenómeno natural que ha existido desde el origen de la Tierra, mostrándose en diferentes épocas y de diferentes formas [34, 35]. El problema es el atípico crecimiento del patrón de calentamiento del planeta mostrado en los últimos tiempos, atribuible a diversas prácticas humanas como la quema de combustibles fósiles, lo que ha dado por consecuencia, el cambio climático antropogénico [3].

1.4. Energía renovable, biocombustibles.

A nivel mundial está creciendo la preocupación por la diversidad de fenómenos adversos que se presentan influenciados por el cambio climático antropogénico. De igual forma, las fluctuaciones macroeconómicas en la economía global, provocadas por la volatilidad en el precio del petróleo y el cenit petrolero en curso, dejan en claro que este recurso no será la opción energética de las próximas generaciones [36]. Por lo tanto los países desarrollados y muchos de los países en vías de desarrollo están adoptando medidas que les permitan transitar hacia una economía “verde” y baja en carbono. Una de estas estrategias es la investigación en fuentes de energía renovable, que permitan garantizar la soberanía y seguridad energética de una nación y a la vez, ayuden a disminuir las emisiones de GEI a la atmósfera. Las tecnologías de aprovechamiento de las fuentes de energía renovable contemplan una amplia gama de paquetes tecno-científicos que pretenden provocar el menor impacto ambiental al momento de la explotación de estos recursos energéticos. Una de estas fuentes de

energía renovable es la llamada bioenergía la cual es la energía química contenida en la biomasa no fosilizada (leña, carbón vegetal, aceites vegetales, residuos agroforestales) almacenada por acción de la fotosíntesis, y que se obtiene directamente por combustión en forma de calor o después de un procesamiento donde se pueden obtener derivados energéticos como biocombustibles sólidos (pellets de biomasa), líquidos (biodiesel, bioetanol, bioturbosina) y gaseosos (biometano, biohidrógeno) [37].

Las fuentes de energía renovable pueden ser utilizadas para satisfacer diferentes necesidades energéticas humanas, reduciendo de manera considerable el impacto ambiental generado por las fuentes de energía convencional. Uno de los sectores que más impacto causa por la cantidad de GEI que desprende a la atmósfera es el sector transporte [33]. En 2010 en México, según el inventario nacional de emisiones, la cantidad fue de 166,412 Gg de CO₂ equivalente [38] (Ver Figura 4). Para reducir los volúmenes de GEI que son inyectados a la atmósfera por el transporte y otros rubros afines, es necesario el uso de combustibles menos contaminantes, como lo son los biocombustibles líquidos avanzados o de segunda generación que no provengan de materias primas dedicadas a la alimentación. La tecnología actual permite utilizar bioetanol, bioturbosina y biodiesel en motores que ya están en circulación, y en motores especialmente diseñados para funcionar con biocombustibles puros. La cantidad de GEI que se dejarían de emitir al usar estos biocombustibles ayudaría a mitigar en gran medida el actual problema y prevenir su crecimiento [39].

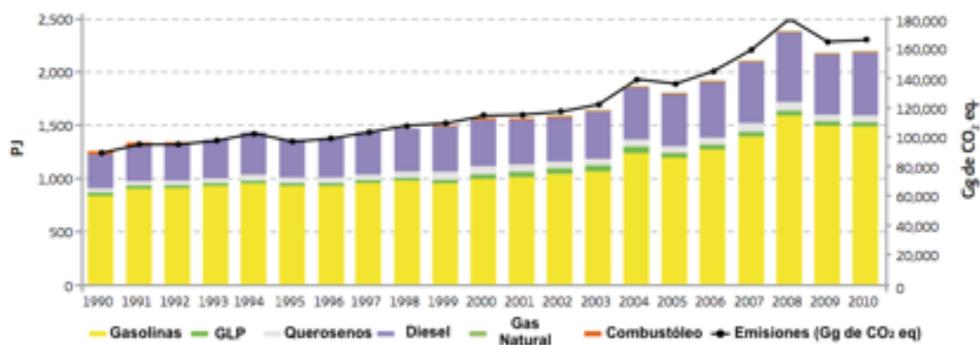


Figura 4. Tendencia en emisiones de gases de efecto invernadero (CO₂ equivalente) y consumo energético en petajoules del sector transporte en México [38].

1.5. Cultivos energéticos.

Son plantas cultivadas específicamente para producir algún tipo de energía, la cual puede ser aprovechada, bien sea por combustión directa, vía gasificación de los cultivos para producir calor y/o electricidad o convirtiendo la biomasa generada en

algún tipo de biocombustible [40]. Para que un cultivo pueda ser denominado como cultivo energético debe cumplir con ciertas condiciones generales:

Adaptación: Los cultivos deben ser adaptables para ser cultivados en tierras no aptas para la producción de alimentos y en áreas geográficas diversas.

Alta eficiencia: los rendimientos de biomasa deben ser lo suficientemente altos para ser rentable y además el cultivo debe ser capaz de utilizar los nutrientes y recursos de manera eficiente. Un cultivo energético no debe ser altamente demandante de agua ya que entra en competencia de recursos con los cultivos alimenticios.

Costos de producción bajos: Los costos asociados a la producción del cultivo deben ser competitivos comparados con los costos presentados por las fuentes de energía convencional.

Balance energético positivo: la energía que se extraiga del cultivo debe ser mayor a la utilizada para la propia producción de éste, además debe poder mejorar el balance medioambiental en relación a los cultivos tradicionales.

Naturaleza adecuada: El cultivo debe ser el indicado para ser usado como materia prima en un proceso de producción de bioenergía en alguna de sus formas.

1.6. Sorgo Dulce.

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor L.*) (Ver figura 5) es un cultivo que ha sido ampliamente reconocido como una fuente potencial de materia prima para la producción de biocombustibles y en específico de bioetanol [41]. Es considerado un cultivo análogo a la caña de azúcar, en especial en cuanto a la acumulación de azúcares totales (sacarosa, glucosa y fructosa) en el jugo. En la caña, un 9.8% del total del jugo son carbohidratos, mientras que en el sorgo lo es un 11.8% [42], pero el sorgo cuenta con una mayor estabilidad agronómica a las fluctuaciones de temperatura, menor requerimiento de agua (la caña de azúcar requiere 36,000 m³ por cosecha por hectárea mientras que el sorgo dulce requiere 8,000 m³ para 2 cosechas por hectárea [43]) y una mejor tolerancia a la salinidad y alcalinidad del suelo. Es apto para crecer en zonas con altas temperaturas, de hasta 38 °C [44], se adapta bien a terrenos pobres, lo que en general lo hace ideal para crecer en tierras que no son atractivas para muchos otros cultivos alimenticios [16].

El sorgo dulce cuenta con un metabolismo fotosintético C4, lo que significa que es más eficiente en la captura de carbono (CO_2) ya que agrega un paso adicional al tradicional metabolismo C3, por lo tanto, su producción de biomasa presenta mayores rendimientos y es más eficiente en el uso de los recursos [16].

Se han llevado a cabo muchas investigaciones que respaldan la posibilidad de producir etanol a partir del jugo de sorgo dulce por su alto contenido de azúcares libres, además la tecnología de producción es equivalente a la utilizada con la caña de azúcar [17, 18, 45].



Figura 5. Cultivo de sorgo dulce, campo experimental Tizimín Yucatán. Foto: Mintzirani Equihua S.

1.7. Bagazo de sorgo dulce.

Es la biomasa fibrosa de sorgo dulce a la cual se le ha removido el jugo y consta de los materiales estructurales de la planta en donde el tallo es la fracción más abundante. El bagazo está constituido primordialmente por tres clases de biopolímeros: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (Ver tabla 1), denominándolo por consiguiente como material lignocelulósico. Las proporciones en las cuales estén presentes cada uno de los biopolímeros mencionados es una de las características más importantes a tener en cuenta al momento de elegir una materia prima lignocelulósica para producir bioetanol de segunda generación. Será siempre conveniente un material lignocelulósico con alta concentración de celulosa (arriba de

un 35%), ya que es la fuente primordial de glucosa, así como también es importante que se tenga una baja concentración de lignina (menor al 20%) ya que es la principal barrera para el aprovechamiento de los carbohidratos estructurales. Por otro lado, dependiendo de la tecnología de transformación que se utilice para la producción de etanol, será la conveniencia de tener altas o bajas concentraciones de hemicelulosa; por ejemplo si se cuenta con un microorganismo capaz de fermentar pentosas entonces una concentración alta de hemicelulosa es deseable (arriba del 25%) [46].

El tallo del sorgo dulce está constituido por dos partes, la médula y la corteza. La médula comprende el 65% del tallo en base fresca. Las dos fracciones que componen el tallo del sorgo difieren sustancialmente en cuanto a composición ya que la médula está menos lignificada [47].

Tabla 1. Composición estructural del bagazo de Sorgo Dulce.

| Biopolímero | Proporción de biopolímero en tallo (%) | Fuente |
|---------------------|---|---------------|
| Celulosa | 44.76 | [47] |
| | 44.6 | [42] |
| | 37.75 | [48] |
| | 43.68 | [49] |
| Hemicelulosa | 36.82 | [47] |
| | 27.1 | [42] |
| | 31.84 | [48] |
| | 38.30 | [49] |
| Lignina | 17.32 | [47] |
| | 20.7 | [42] |
| | 4.24 | [48] |
| | 7.03 | [49] |
| Cenizas | 1.08 | [47] |
| | 0.4 | [42] |
| | 9.25 | [48] |
| | 10.97 | [49] |

1.8. Material lignocelulósico.

Son los principales constituyentes de la biomasa vegetal, por lo que representan una amplia, diversa y abundante fuente de recursos renovables [50]. Son los materiales de construcción utilizados por las células vegetales para formar la pared celular, estructura encargada de proporcionarle rigidez y protección. Tienen una composición compleja de 3 biopolímeros; celulosa, hemicelulosa y lignina (Ver figura 6).

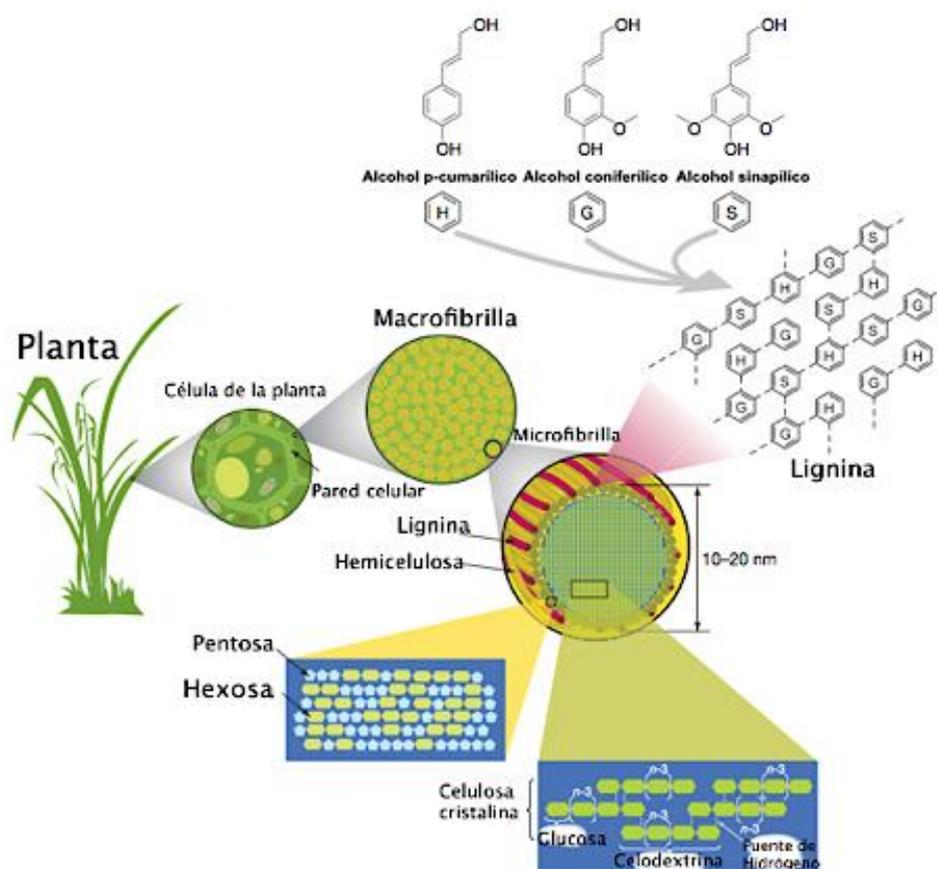


Figura 6. Composición estructural de la biomasa vegetal [50].

Cada compuesto tiene una función estructural específica [51]:

Celulosa: Un homopolímero de alto peso molecular constituido por monómeros de glucosa unidos mediante un enlace glucosídico β (1-4). Es el principal componente de la biomasa vegetal en cuanto a constitución y el polímero más abundante en el mundo [52] (Ver figura 7). Este polímero está estructurado en diferentes niveles de ordenamiento y embebido en una matriz de hemicelulosa y lignina. En el nivel inferior se encuentran las cadenas de celulosa formada por los monómeros de glucosa de manera lineal con un número de

polimerización de entre 8,000 y 15,000 dependiendo de la fuente de la celulosa [53].



Figura 7. Estructura de las cadenas de celulosa. Se observa la unión de moléculas de glucosa por medio de un enlace glucosídico formando cellobiosa [53].

Estas cadenas lineales están empaquetadas unas sobre otras en estructuras tubulares denominadas microfibrillas, que a su vez, están conjuntadas en túbulos más grandes llamados macrofibrillas que son las formadoras de las estructuras de las paredes celulares [54] (Ver figura 8).

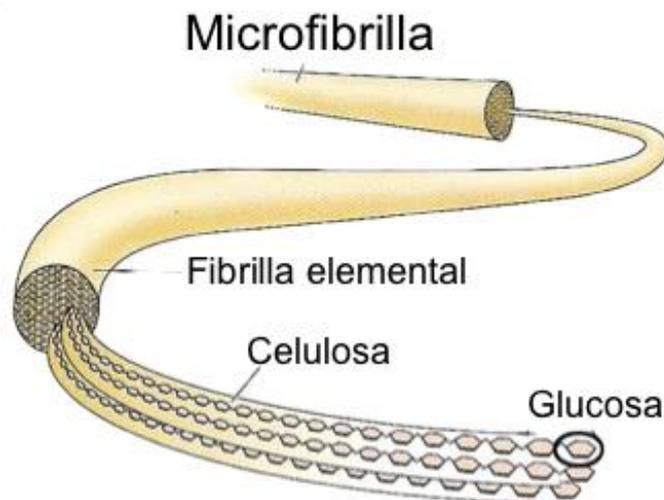


Figura 8. Conformación de las fibrillas de celulosa [54].

Las moléculas de glucosa constituyentes de la celulosa (unidades de anhidroglucosa) presentan 3 grupos hidroxilo en sus ramificaciones, por lo que son capaces de formar fácilmente enlaces por puentes de hidrógeno con otras moléculas vecinas, y le confiere a la celulosa sus principales atributos, llegando a presentar 2 tipos de estructuras con las fibrillas contiguas, la forma cristalina y la amorfa [55] (Ver figuras 9 y 10).

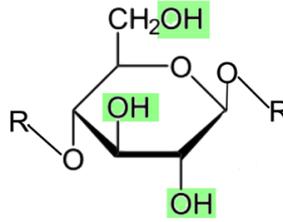


Figura 9. Grupos funcionales con presencia de hidroxilos en la molécula de glucosa que permiten la creación de puentes de hidrógeno [52].

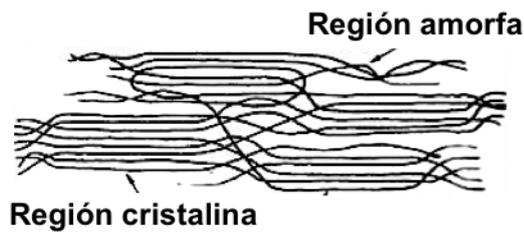


Figura 10. Representación del arreglo cristalino y amorfo de la celulosa [51].

En la forma cristalina las moléculas de celulosa presentan un arreglo uniforme, lo que dificulta su hidrólisis. En esta conformación se crean más puentes de hidrógeno brindando mayor cohesión y solidez a la estructura, pero también impide el acceso de enzimas celulolíticas. En las partes amorfas los enlaces son menores, por lo tanto presentan menor rigidez y es más fácil hidrolizarlos. Las enzimas tienden a atacar primero las regiones amorfas y seguir hidrolizando de ahí las partes cristalinas, como se muestra en la figura 11 [56].

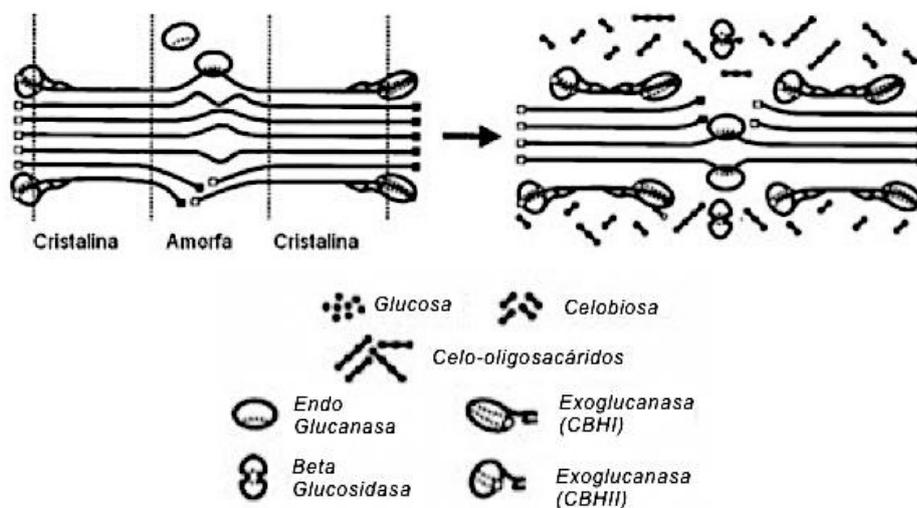


Figura 11. Hidrólisis de las regiones cristalinas y amorfas de la celulosa por acción de enzimas celulolíticas [56].

- **Hemicelulosas:** es un polímero heterogéneo constituido por pentosas (xilosa, arabinosa) y hexosas (mannosa, glucosa, galactosa). Son el segundo polisacárido más común en la naturaleza, representa alrededor de 20-30% de la biomasa lignocelulósica, siendo los xilanos el tipo de hemicelulosas más abundantes (Ver figura 12). Este compuesto sirve para mantener unidas las fibrillas de celulosa creando una red en la cual queda embebida [57].

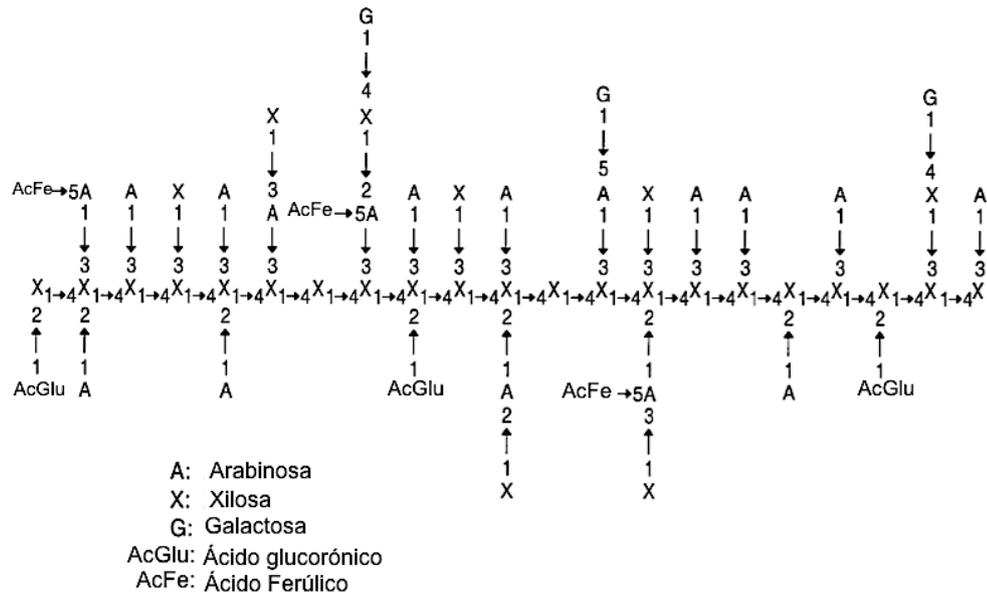


Figura 12. Representación de la estructura de la hemicelulosa (heteroxilano) donde se aprecian los monómeros constituyentes y sus enlaces con moléculas adyacentes [57].

- **Lignina:** es un polímero fenólico tridimensional que brinda una superficie hidrofóbica a células conductoras de agua y que provee la rigidez estructural necesaria para el soporte mecánico de las estructuras vegetales (Ver figura 13). La lignina es un compuesto con alta densidad energética resultado de la gran cantidad de enlaces carbono-carbono que pueden ser oxidados. Es el polímero más complejo de la naturaleza [58].

La lignina puede afectar de manera negativa el rendimiento de la sacarificación enzimática de la celulosa en azúcares fermentables, ya que limita la interacción entre las enzimas celulolíticas y el sustrato, así como también adsorbe y liga de manera irreversible a las enzimas [59].

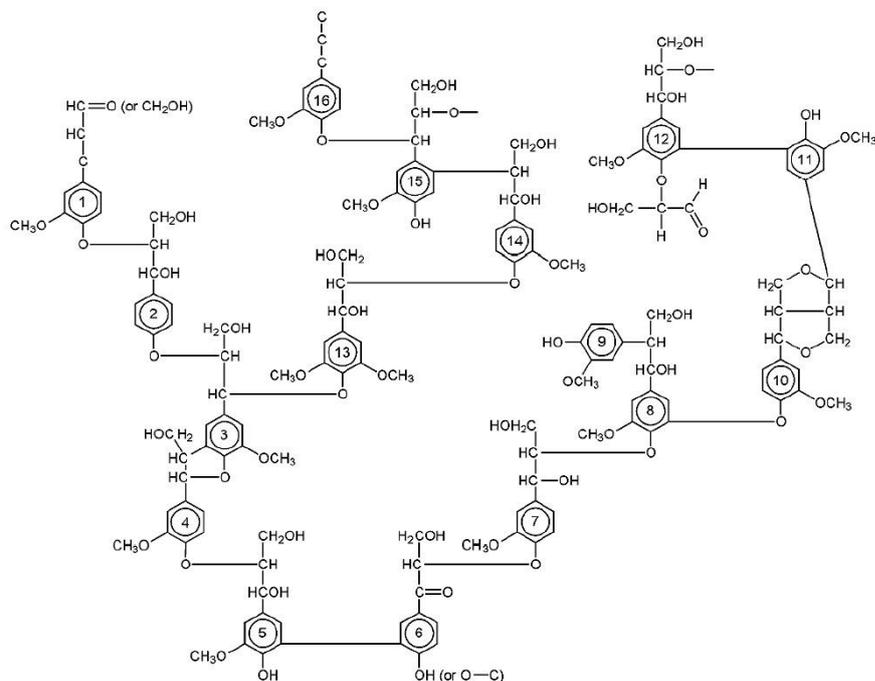


Figura 13. Estructura modelo de la lignina de abeto [58].

1.9. Etanol carburante.

La sustancia química conocida como etanol es un líquido incoloro, volátil, con un olor característico y sabor picante en condiciones normales de presión y temperatura (25 °C, 1 atm). También se conoce como alcohol etílico y sus vapores son más pesados que el aire. Está compuesto por Carbono (52.24%), Hidrógeno (13.13%) y Oxígeno (34.73%) con fórmula $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ y un peso molecular de 46.07 g/mol [60].

El etanol se ha producido desde hace varios miles de años con fines principalmente recreativos (bebidas embriagantes). A lo largo del tiempo su uso se ha extendido al área médica (como antiséptico), química (como solvente), pero no fue hasta 1824 cuando comenzó su utilización en el área de los combustibles, con la creación del primer motor de combustión interna por Samuel Morey, el cual funcionaba con etanol y trementina. El etanol combustible dio uno de sus más grandes saltos cuando en 1908 Henry Ford lanzó el automóvil FORD modelo T, el cual era capaz de utilizar etanol, queroseno y gasolina. El etanol quedó relegado en su uso como combustible para automóviles por la gran expansión de los hidrocarburos fósiles donde la gasolina ganó el terreno casi por completo. El etanol como combustible tomó importancia a nivel mundial en el año 1973 cuando la OPEP (Organización de los Países Exportadores de Petróleo) realizó un embargo energético, negándole la venta de petróleo a los Estados

Unidos y a los Países Bajos como parte de la estrategia de la guerra del Yom Kippur [61]. Desde ese momento, Brasil, EUA y la Unión Europea han tomado muy en serio su soberanía y seguridad energética, por lo que desarrollaron políticas nacionales para el impulso de los bioenergéticos con grandes logros hasta el momento siendo ahora los mayores productores y consumidores de etanol carburante a nivel mundial [10]. Se ha llegado a una producción global de etanol que sobrepasó los 80 billones de litros en el 2010 [62] (Ver figura 14).

Al día de hoy y por los factores que se han discutido anteriormente, el etanol es una alternativa viable para ser usado como combustible en motores de combustión. La tecnología automotriz para su aprovechamiento existe, siendo la parte limitante la posibilidad de producir etanol de manera sustentable y con un margen costo-beneficio positivo [63]. Los automóviles modernos pueden utilizar una mezcla de gasolina y etanol de hasta 20% v/v sin necesidad de modificaciones técnicas [64].

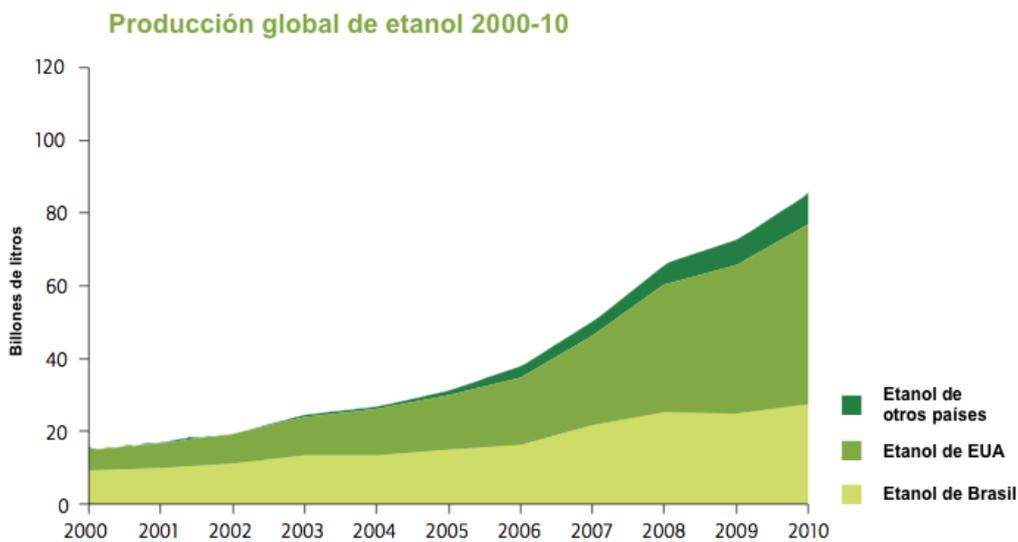


Figura 14. Producción global de etanol del año 2000 al 2010 [62].

1.10. Producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos.

La idea base de la producción biológica de etanol es convertir azúcares simples en alcohol etílico utilizando el metabolismo de un microorganismo, por lo tanto, las dos variables fundamentales de todo proceso son la fuente de carbohidratos y el microorganismo capaz de transformarlos. En la búsqueda de fuentes de materia prima para este fin, primero se utilizaron los jugos vegetales que contienen azúcares simples

de fácil disposición, después materias de mayor complejidad como los cereales con alto contenido de almidón, el cual puede ser hidrolizado a glucosa por acción enzimática y/o termoquímica. Recientemente la atención se ha volcado hacia los materiales lignocelulósicos, los cuales poseen altos contenidos de celulosa, otra fuente de glucosa, pero de difícil acceso. Esta última sin embargo, es una fuente de materia prima prometedora, ya que existe una gran cantidad de biomasa subutilizada a nivel mundial [65] que puede ser usada con fines energéticos. En cuanto a los microorganismos capaces de convertir azúcares en etanol, existe una gran variedad y se distinguen por tener un metabolismo fermentativo, pero sin duda, el más estudiado, el que presenta los mejores rendimientos, estabilidad e inocuidad hasta nuestros días es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [66].

La producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos comúnmente se lleva a cabo en distintas etapas, cada una de las cuales es específica para un proceso particular. Estas etapas nos permiten separar, recuperar y transformar cada uno de los diferentes compuestos que constituyen la biomasa. La celulosa, cuyo monómero estructural es la glucosa, es la fracción de mayor interés como materia prima base para la producción de etanol.

Los siguientes procesos son regularmente utilizados para la producción de etanol celulósico:

1.10.1. Selección y preparación de la materia prima: hacer una selección adecuada de la materia prima brinda grandes ventajas para el proceso de producción. Serán necesarios menos químicos para tratar, hidrolizar y retirar los compuestos que no sean de interés. De igual manera, la demanda energética del proceso disminuirá cuanto menor sea la energía necesaria para separar los compuestos requeridos. Se prefiere un material con altas concentraciones de celulosa, baja concentración de lignina y baja cantidad de hemicelulosas. Conviene utilizar residuos de actividades agroforestales como bagazo de caña, bagazo de sorgo, bagazo de henequén, bagazo de agave, paja de trigo, rastrojo de maíz, cáscara de arroz y otros, debido a sus bajos costos, baja demanda comercial y alta disponibilidad, o también y más recientemente, cultivos dedicados explícitamente a la generación de biomasa lignocelulósica que cumpla con las demandas de una tecnología de producción específica. Un proceso de producción es más o menos efectivo para cada tipo de biomasa en particular [67].

Una vez teniendo una fuente de biomasa, es necesario procesarla de tal forma que como resultado se obtenga un material con características físicas que brinde las mayores ventajas al proceso de transformación de biomasa en etanol carburante tales como alta porosidad, reducción de partes cristalinas en la celulosa, remoción de lignina, entre otras. Inicialmente se realiza el secado de la biomasa para evitar la proliferación de agentes biológicos como hongos y bacterias que puedan utilizar la celulosa como fuente de carbono para su desarrollo. Paso subsecuente es la molienda, que permite reducir el tamaño de partícula del material lignocelulósico lo que aumenta la superficie de contacto entre el material y los agentes químicos utilizados en el proceso de pretratamiento y posteriormente en la hidrólisis enzimática [68].

1.10.2. Pretratamiento: permite romper y modificar la estructura del material lignocelulósico elegido como materia prima brindándole características conformacionales aprovechables en la hidrólisis enzimática. También ayuda a retirar de la biomasa los compuestos diferentes a la celulosa, como la hemicelulosa y la lignina (Ver figura 15).

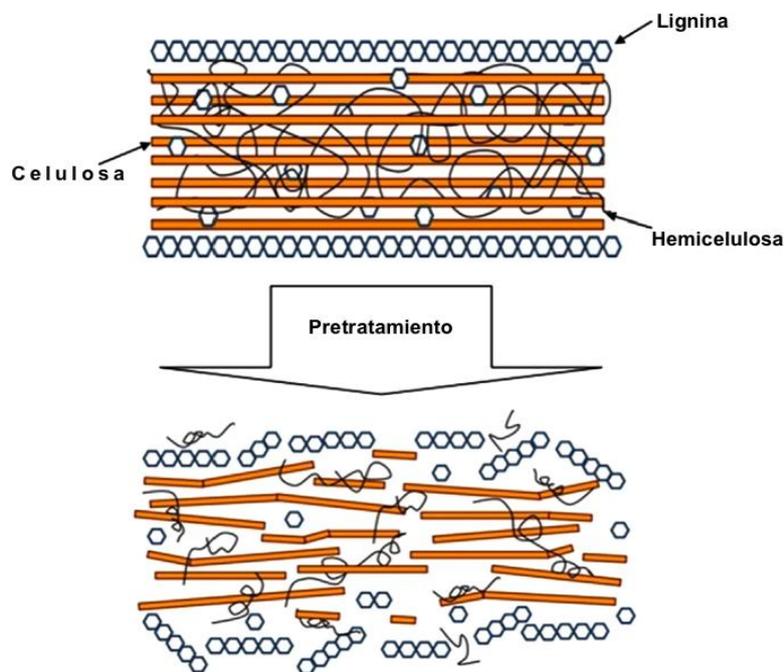


Figura 15. Acción del pretratamiento en la biomasa lignocelulósica [46].

Como lo discute Galbe *et al.* [69] al igual que otros autores [46, 58, 70], un pretratamiento debe proporcionar ciertos beneficios básicos para ser considerado una opción:

- Debe procurar una alta recuperación y una mínima pérdida de carbohidratos estructurales.
- Resultar en una alta digestibilidad de la celulosa en el subsecuente proceso de hidrólisis enzimática.
- Debe propiciar que la lignina no represente una barrera física ni química para la hidrólisis de los carbohidratos, por lo que debe producir muy pocos o nulos inhibidores.
- La hemicelulosa debe ser hidrolizada y los azúcares de 5 carbonos retirados (esto en el caso de no contar con un microorganismo que fermente pentosas).
- El material debe contener elevada porosidad en su estructura.
- La estructura cristalina de la celulosa debe ser modificada debiendo predominar las partes amorfas.

El pretratamiento debe garantizar el aumento de la superficie de contacto entre la celulosa y las enzimas celulolíticas para propiciar una mayor interacción en la sacarificación. Esto resultará en una mayor eficiencia en la hidrólisis de la celulosa a glucosa y por lo tanto, una concentración final más alta de glucosa viable para la fermentación [71].

Existe una amplia variedad de procesos físico-químicos e incluso biológicos que pueden ser usados como pretratamientos, por ejemplo, tratamiento con ácido sulfúrico diluido, explosión de vapor, uso de organosolventes, líquidos iónicos, pretratamiento alcalino, explosión de fibras con amoníaco, uso de entidades fúngicas como el hongo de la pudrición blanca, entre otros, sin embargo, la elección del pretratamiento a utilizar dependerá de la composición del material lignocelulósico y de como esté estructurado, determinado por la naturaleza misma de la especie vegetal de la cual provenga la biomasa. También dependerá de la tecnología con la que se cuente y del microorganismo elegido para llevar a cabo la producción biológica de etanol.

1.10.3. Hidrólisis Enzimática (Sacarificación): poder obtener los azúcares simples que constituyen a la celulosa y hemicelulosa es uno de los pasos claves en el proceso

de producción de etanol lignocelulósico. Desde hace una década el interés por los biocombustibles de segunda generación se ha venido incrementando rápidamente [72] buscando técnicas para poder hidrolizar la celulosa en monómeros de glucosa y hasta el momento la hidrólisis enzimática ha sido el método que ha demostrado tener resultados más favorables, como la no generación de residuos tóxicos, alta especificidad de producción de compuestos finales (glucosa), estandarización de los procesos, tiempos cortos de reacción (regularmente no sobrepasan las 48 horas). Así, este proceso puede integrarse a un sistema sustentable de producción de bioetanol lignocelulósico, sin embargo, la tecnología enzimática aún no ha logrado generar enzimas o cocteles enzimáticos que hidrolicen el 100% de la biomasa y sigue siendo una tecnología de costo elevado, pero sin duda, es la opción que más avances y desarrollos ha tenido en los últimos años [73].

Las enzimas encargadas de hidrolizar la celulosa son las llamadas celulasas, éstas enzimas están clasificadas en la familia de las glicosil hidrolasas [74]. Se caracterizan por llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa en unidades monoméricas de glucosa por la acción sinérgica de tres distintas clases de enzimas:

- Endoglucanasas (EGs), las cuales hidrolizan enlaces internos β (1-4) glucosídicos de forma aleatoria en la cadena de celulosa.
- Celobiosahidrolasas (CBHs), también llamadas “exoglucanasas” las cuales actúan a lo largo de la cadena de celulosa desprendiendo unidades de celobiosa de los extremos.
- β -glucosidasas (BG), también conocidas como “ β -glucósido glucohidrolasas” las cuales hidrolizan la celobiosa a 2 unidades de glucosa [73].

La hidrólisis de la celulosa se lleva a cabo en dos fases, la hidrólisis primaria y la hidrólisis secundaria. En la primaria intervienen las endoglucanasas y las exoglucanasas y ocurre en la superficie del material sólido, por esta acción es que se liberan azúcares solubles al medio. La hidrólisis secundaria se da en la fase líquida, es aquí donde ocurre la ruptura de la celobiosa y por ende, donde se liberan las unidades de glucosa por acción de las β -glucosidasas, como se muestra en la figura 16.

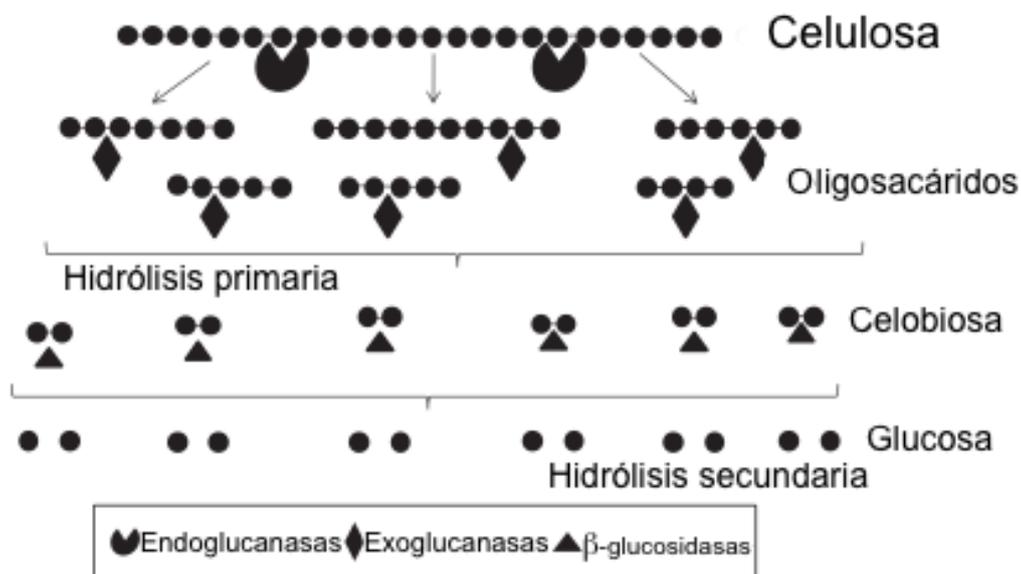


Figura 16. Mecanismo de acción de las celulasas en las diferentes fases de la hidrólisis [73].

Existen factores que influyen en la dinámica de la hidrólisis enzimática, a continuación describimos tres de ellos:

- **Carga de sustrato (C/S):** es la cantidad de material lignocelulósico (sólido o semisólido) que será agregado al sistema con respecto a la fase líquida que lo contiene (solución reguladora), expresado como porcentaje en peso-volumen (p/v). La máxima carga de sustrato a utilizar será la que permita llevar a cabo las reacciones bioquímicas con eficiencia y que no represente una barrera física para la dinámica de las reacciones [75].

Carga enzimática: Es la cantidad en volumen del preparado enzimático que se adiciona a la reacción, respecto a la cantidad de biomasa a hidrolizar. El volumen debe ser aquel con el que se asegure la actividad enzimática óptima sobre el sustrato y lleve a cabo la hidrólisis más completa de la biomasa. Si la actividad del preparado enzimático no es igual a la descrita, entonces se debe ajustar el volumen a uno que garantice la actividad deseada. Como ejemplo, Accellerase 1500[®] es un complejo enzimático y su actividad catalítica total es el resultado de la actividad sinérgica de las diferentes enzimas que lo componen [76] las cuales se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Actividades enzimáticas del complejo Accellerase 1500®.

| Actividad | Valor | Referencia |
|-------------------------|-------------------------|------------|
| Endoglucanasa | 2200 – 2800 CMC U/g * | [76] |
| Beta-Glucosidasa | 525 – 775 pNPG U/g ** | [76] |
| Avicelasea | 0.77±0.02 U/mg-proteína | [77] |
| Celobiasa | 5.6±0.3 U/mg-proteína | [77] |

* CMC: Carboximetil celulosa

** pNPG: Para-nitrofenil-B-D-glucopiranososa

- **Temperatura:** desempeña un papel clave en la reacción de hidrólisis ya que cada enzima logra su conformación estructural catalítica a diferentes temperaturas, por lo tanto, la temperatura de reacción debe ser aquella a la cual las enzimas presenten una estructura terciaria y una cuaternaria idóneas que deriven en una catálisis eficiente [78]. Las celulasas contenidas en el preparado Accellerase 1500® tienen su temperatura óptima de reacción en el rango entre 50 y 65 °C [76].

1.10.4. Fermentación alcohólica: En condiciones aerobias el metabolismo de la glucosa produce moléculas de trifosfato de adenosina (ATP por sus siglas en inglés) utilizada como principal portadora de energía química por los organismos vivos. Este fenómeno se lleva a cabo en el ciclo bioquímico llamado “glucólisis” en el cual, la glucosa se degrada por medio de reacciones mediadas por enzimas y se obtienen 2 moléculas de ATP netas como ganancia energética. La molécula resultante de este ciclo es el piruvato. En condiciones aeróbicas el piruvato se oxida a acetato, el cual es usado en el ciclo del ácido cítrico y es oxidado a CO₂ y H₂O, y el NADH formado por la deshidrogenación del gliceraldehído 3-fosfato en la glucólisis, se reoxida a NAD⁺ mediante el paso final de sus electrones al O₂ en el proceso de respiración mitocondrial. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, el NADH generado en la glucólisis no puede ser reoxidado por el oxígeno. No poder regenerar el NAD⁺ (del que las células tienen cantidades limitadas), dejaría a la célula sin aceptor de electrones

para la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato, con lo que se detendrían las reacciones de la glucólisis que producen energía, por lo tanto es necesario regenerar el NAD^+ por otra vía y es aquí donde los microorganismos utilizan la fermentación.

En la fermentación alcohólica el NAD^+ es regenerado con la transformación del piruvato a etanol y CO_2 en una reacción de 2 pasos, como se aprecia en la figura 17.

En el primer paso, se lleva a cabo una reacción donde el piruvato es descarboxilado para producir acetaldehído y CO_2 , la cual es catalizada por la enzima piruvato descarboxilasa. En el segundo paso el acetaldehído es reducido a etanol por acción del $\text{NADH} + \text{H}^+$ y la reacción es catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa, lo que regenera una molécula de NAD^+ que será utilizada en la fase de beneficios de la glucólisis para la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato [79, 80].

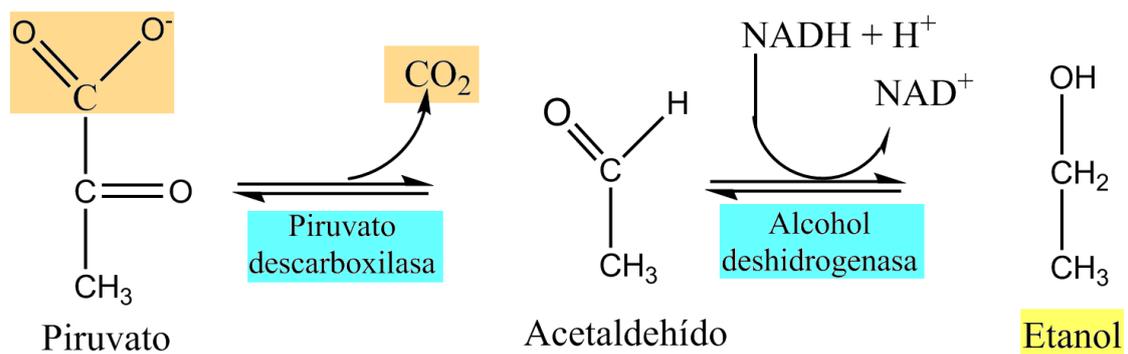


Figura 17. Reacciones en la transformación del piruvato en etanol [79].

La fermentación alcohólica puede ser realizada por diferentes tipos de microorganismos pero sin duda el más estudiado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y ha tenido un gran uso a lo largo de la historia, principalmente en la industria de la panificación y en la de bebidas alcohólicas.

1.11. Sacarificación y fermentación simultáneas.

El proceso de producción de etanol lignocelulósico se realiza regularmente en diferentes etapas, llevándose a cabo un proceso específico a la vez, tal como está esquematizado en la figura 18. La sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) es un proceso que puede usarse como opción para la producción de etanol lignocelulósico. Sus principales ventajas con respecto a la producción por etapas separadas, es la disminución de la inhibición enzimática por la acumulación de

productos provenientes de la hidrólisis de la celulosa, principalmente glucosa y celobiosa (dímero de glucosa) [81].



Figura 18. Fases en la producción de etanol lignocelulósico por etapas separadas.

En este modo de producción, al tiempo en que la hidrólisis va liberando los azúcares simples, las levaduras van consumiéndolos y metabolizándolos hasta el producto final que es etanol, lo que permite un mayor rendimiento de producción y disminución de los costos de proceso. En esta técnica, la sacarificación enzimática y la fermentación se llevan a cabo en el mismo reactor al mismo tiempo (Ver figura 19).

Al igual que en el proceso por etapas separadas la materia prima también debe de pasar por un tratamiento previo [82, 83].



Figura 19. Esquema del proceso de producción de etanol lignocelulósico utilizando la técnica de sacarificación y fermentación simultáneas.

Sin embargo esta técnica presenta algunos problemas, siendo uno de los principales la diferencia entre las condiciones fisicoquímicas óptimas para cada proceso. La sacarificación enzimática se lleva a cabo a un pH de 5 y a una temperatura de 50 °C con lo cual la enzima alcanza su conformación estructural más favorable para que su sitio activo tenga la mejor actividad catalítica. Por otro lado la temperatura óptima para la fermentación es 30 °C y un pH de 4.0. Para tener un proceso con buenos rendimientos se debe encontrar un compromiso entre las condiciones de los dos procesos donde tanto el coctel enzimático como la levadura lleven a cabo su función eficientemente. En estudios previos se ha encontrado que el punto medio se encuentra a una temperatura de 37 °C y a un pH de 5 [82-84].

JUSTIFICACIÓN

Debido a los grandes problemas medioambientales causados por la quema de combustibles de origen fósil y la incertidumbre provocada por la creciente inestabilidad en la producción mundial de petróleo, se ha hecho necesaria la búsqueda de soluciones alternas que permitan satisfacer la demanda energética de nuestro país de manera sustentable. El uso de etanol carburante figura como una posible alternativa.

Para que el etanol sea un combustible verdaderamente sustentable, con balance energético y de carbono positivos, es necesario tomar en cuenta varios factores a la hora de su producción, como lo es la elección de una materia prima adecuada y un proceso de producción eficiente, así como la integración de los subproductos a una cadena de valor bajo el concepto de biorefinería.

La utilización del bagazo de sorgo dulce, una materia prima subutilizada, junto con la implementación de una técnica denominada “Sacarificación y Fermentación Simultáneas” permitirá reducir los pasos en el proceso de producción y aumentar el rendimiento de etanol. Al final esto se traduce en una mayor eficiencia de proceso y en la reducción de costos [85].

HIPÓTESIS

En la técnica de sacarificación y fermentación simultáneas se propicia una hidrólisis enzimática más eficiente al disminuir la inhibición de las enzimas por concentración de productos y una fermentación más eficiente al evitar que las levaduras se inhiban por una alta concentración de sustrato como puede suceder en el método de sacarificación y fermentación por etapas separadas. Por lo tanto es posible obtener rendimientos de etanol más altos si se encuentran las condiciones de sacarificación-fermentación simultáneas adecuadas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener etanol por sacarificación y fermentación simultáneas a partir de residuos lignocelulósicos provenientes del tallo de sorgo dulce.

Objetivos específicos

- Realizar un estudio de pretratamiento termoquímico básico-oxidativo a los residuos lignocelulósicos del sorgo dulce, variando la concentración de los agentes químicos elegidos para este propósito (hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno) en condiciones controladas
- Realizar un estudio de hidrólisis enzimática a los residuos lignocelulósicos de sorgo dulce pretratados termoquímicamente utilizando un preparado enzimático comercial (Accellerase 1500[®])
- Determinar el rendimiento de etanol producido por etapas separadas utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo para la fermentación
- Determinar el rendimiento de etanol producido por sacarificación y fermentación simultáneas y compararlo con los resultados obtenidos en el proceso de etapas separadas

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección y procesamiento de la muestra.

Se recolectaron muestras de una variedad híbrida (SD- 401) de sorgo dulce (*Sorghum bicolor L.*) proporcionada por la empresa EnerAll, en la localidad de Tizimín, Yucatán, México. El jugo fue extraído de los tallos por prensado mecánico quedando como se observa en la figura 20.



Figura 20. Tallos de sorgo dulce prensados. Foto: Mintzirani Equihua Sánchez

Los tallos fueron secados a una temperatura de 80 °C por 24 horas. El bagazo fue molido en un molino “Pagani 2030” hasta obtener un polvo con tamaño de partícula de 1 mm (figura 21).



Figura 21. Bagazo de sorgo molido, tamaño de partícula de 1 mm

2.2. Composición química del bagazo de sorgo dulce.

Fue realizada en el departamento de Madera, Celulosa y Papel de la Universidad de Guadalajara usando las técnicas estándar TAPPI para determinar humedad [86], lignina insoluble en ácidos [87], holocelulosa [88] así como alfa, beta y gamma celulosa [89].

2.3. Pretratamiento termoquímico.

El pretratamiento termoquímico se realizó usando un método básico-oxidativo (Hidróxido de Sodio + Peróxido de Hidrógeno) de dos etapas como describen Cao *et al.* [90]. En la primera etapa se llevó a cabo el tratamiento básico-térmico donde se utilizó una solución de hidróxido de sodio y un calentamiento a 120 °C en condiciones de presión constante (1 Kg/cm²) por 60 minutos. En la segunda etapa se realizó un tratamiento oxidativo, donde se agregó una solución de peróxido de hidrógeno y se dejó reaccionar por 24 horas en ausencia de luz y a temperatura ambiente para propiciar una oxidación lenta y constante.

En este estudio se utilizaron 3 diferentes concentraciones de hidróxido de sodio y 3 de peróxido de hidrógeno en las combinaciones que se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Diseño factorial de los pretratamientos termoquímicos.

| Tratamiento | Concentración de NaOH | Concentración de H ₂ O ₂ |
|-------------|-----------------------------|--|
| | Porcentaje peso-volumen (%) | Porcentaje volumen-volumen (%) |
| 1 | 2 | 3.25 |
| 2 | 6 | 3.25 |
| 3 | 10 | 3.25 |
| 4 | 2 | 6.5 |
| 5 | 6 | 6.5 |
| 6 | 10 | 6.5 |
| 7 | 2 | 10 |
| 8 | 6 | 10 |
| 9 | 10 | 10 |

Los experimentos fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 10 g de bagazo molido y un volumen de trabajo de 100 mL. Los tratamientos se realizaron por

cuadruplicado utilizándose una de las 4 réplicas para determinar la pérdida de masa a partir de la biomasa inicial, lo que nos indicó la cantidad de materia retirada del bagazo de sorgo por acción del pretratamiento completo. La biomasa resultante fue lavada hasta pH neutro para retirar posibles inhibidores enzimáticos y después se prensó suavemente para retirar la mayor cantidad de agua de la misma. La biomasa pretratada se guardó a 4 °C hasta ser usada en las etapas posteriores.

2.4. Hidrólisis enzimática (sacarificación).

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado se estudiaron 2 de las variables determinantes para este proceso, la carga de sustrato y la carga enzimática.

2.4.1. Determinación de carga de sustrato (CS).

Para determinar la carga de sustrato a la cual es posible llevar a cabo una mejor sacarificación del bagazo de sorgo, primero se realizó un experimento de referencia utilizando papel filtro como fuente de celulosa (papel de alta pureza marca Whatman® constituido en un 98% de celulosa), lo que nos permite evitar que otros compuestos puedan interferir en la hidrólisis, para posteriormente extrapolar los resultados al bagazo de sorgo dulce.

Se estudiaron 4 diferentes cargas de sustrato: 2%, 5%, 10% y 13% (p/v). Por arriba de 13% la fase sólida (sustrato) absorbe por completo la fase líquida (solución reguladora) convirtiéndose en una barrera física que impide a la enzima llegar a la totalidad de la muestra, deteniendo la hidrólisis completa de la celulosa.

Los experimentos se realizaron en matraces de 250 mL usando 30 mL de solución reguladora y las diferentes CS quedando como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Cantidad de materia prima para la determinación de la carga de sustrato.

| Carga de Sustrato (% p/v) | Materia prima* (g) |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| 2 | 0.6 |
| 5 | 1.5 |
| 10 | 3.0 |
| 13 | 3.9 |

* Papel filtro de alta pureza.

* Materia prima en gramos equivalentes a las diferentes cargas de sustrato en un volumen de trabajo de 30 mL.

Las sacarificaciones con las diferentes cargas de sustrato se realizaron con una carga enzimática de 0.5 mL del preparado enzimático por gramo de muestra (cantidad determinada experimentalmente como se explica adelante en el texto, y recomendada por el fabricante de la preparación enzimática Accellerase 1500[®]) quedando como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Cantidad de enzima (Accellerase 1500[®]) a utilizar con las diferentes cargas de sustrato.

| Carga de Sustrato (%) | Preparado enzimático (mL) |
|-----------------------|---------------------------|
| 2 | 0.3 |
| 5 | 0.75 |
| 10 | 1.5 |
| 13 | 1.95 |

2.4.2. Determinación de la carga enzimática óptima.

La carga enzimática fue determinada probando 5 diferentes relaciones entre la cantidad del preparado enzimático y la biomasa equivalente a la carga de sustrato de 13%, como se muestra en la tabla 6. Los valores iniciales se fijaron según las recomendaciones del fabricante de Accellerase 1500[®]. En esta determinación se utilizó bagazo de sorgo dulce pretratado con el tratamiento termoquímico bajo las siguientes condiciones: hidróxido de sodio al 6%, peróxido de hidrógeno al 10%, temperatura de 120 °C a una presión de 1 Kg/cm². En los ensayos de hidrólisis enzimática se utilizó una solución reguladora de citrato de sodio para mantener un pH de 5.0, una temperatura de 50 °C y agitación a 125 rpm durante 24 horas [76].

Tabla 6. Variables para la determinación de la carga enzimática

| Ensayo | Carga de sustrato (%) | Bagazo de sorgo dulce (g) | Solución reguladora (mL) | Carga enzimática (mL·g ⁻¹) | Volumen final de coctel enzimático (mL) |
|--------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|--|---|
| 1 | 13 | 3.6 | 27.69 | 0.05 | 0.18 |
| 2 | 13 | 3.6 | 27.69 | 0.1 | 0.36 |
| 3 | 13 | 3.6 | 27.69 | 0.3 | 1.08 |
| 4 | 13 | 3.6 | 27.69 | 0.5 | 1.8 |
| 5 | 13 | 3.6 | 27.69 | 0.7 | 2.52 |

Al final de la hidrólisis, se cuantificó la concentración de azúcares reductores por el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [91].

2.4.3. Sacarificación.

Se llevaron a cabo sacarificaciones de cada una de las muestras pretratadas en condiciones óptimas para las enzimas celulolíticas: temperatura de 50 °C, una solución reguladora de citratos de pH 5, una agitación de 125 rpm, durante 24 horas. Fueron realizadas a una carga de sustrato de 13% y una carga enzimática en volumen de 0.5 mL·g⁻¹ determinado experimentalmente como se explica posteriormente en el trabajo.

2.5. Determinación de la estabilidad catalítica del preparado enzimático Accellerase 1500[®] respecto al tiempo.

Se realizó un experimento de sacarificación para conocer el tiempo durante el cual el preparado enzimático Accellerase 1500[®] conserva su actividad catalítica sobre el sustrato. Se utilizó papel filtro de alta pureza marca Whatman[®] como fuente de celulosa. El experimento se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con una carga enzimática de 0.5 mL·g⁻¹ usando una solución reguladora de citratos para mantener el pH en 5 y una temperatura de 50 °C [76]. Se inició con una CS de 2% y se fue aumentando cada 48 horas como se indica en la tabla 7. Se realizó la determinación de azúcares reductores cada 24 horas para cuantificar la liberación de azúcares al medio.

Tabla 7. Tiempo de sacarificación y aumento de carga de sustrato.

| Tiempo (h) | Carga de sustrato agregada (%) |
|------------|--------------------------------|
| 0 | 2 |
| 24 | -- |
| 48 | 3 |
| 72 | -- |
| 96 | 2 |
| 120 | -- |

Los periodos marcados con un guion (--) indican el incremento de tiempo pero sin aumento en la carga de sustrato.

2.6. Determinación de azúcares reductores (AR).

La determinación de la concentración de azúcares reductores se llevó a cabo por el método colorimétrico del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) [91]. Ver Anexo 1.

2.7. Determinación de Etanol.

La determinación de la concentración de etanol se llevó a cabo por el método colorimétrico del Dicromato de Potasio [92]. Ver Anexo 1.

2.8. Fermentación.

En la fermentación se usaron los hidrolizados enzimáticos del bagazo de sorgo dulce como fuente de azúcares. Se llevó a cabo por 48 horas utilizando 12 réplicas idénticas. Se utilizó una cepa comercial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Safmex®) la cual fue habilitada por resiembras continuas en medio GELPA (glucosa, extracto de levadura, peptona y agar) hasta obtener una viabilidad celular del 99%. Se utilizó sulfato de amonio a una concentración final de $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ como fuente de nitrógeno y un inóculo de 10% del volumen final a fermentar. Se tomaron muestras cada 6 horas para monitorear la concentración de azúcares reductores y cada 12 horas para determinar la evolución en la producción de etanol. La fermentación se efectuó en una incubadora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, en condiciones anóxicas y sin agitación [93-96].

2.9. Preparación del inóculo y curva de crecimiento.

Para preparar el inóculo se llevó a cabo un conteo celular de una suspensión de levaduras utilizando una cámara de Neubauer. Una vez conocida la concentración celular, se determinó el volumen para tener un inóculo con una concentración de $3 \times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$. También se realizó una curva de crecimiento de la levadura para determinar el tiempo al que empieza a declinar la fase exponencial, ya que es en ese punto donde la levadura tiene mayor capacidad metabólica. La curva de crecimiento así como el inóculo se realizaron a una concentración inicial de azúcares reductores de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando el sacarificado de sorgo dulce como fuente de carbohidratos. Se añadió sulfato de amonio a una concentración de $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en agitación a 125 rpm. En la curva de crecimiento se tomaron muestras cada 4 horas las primeras 12 horas y después cada 6 horas. Se realizaron conteos celulares de todas las muestras obtenidas [94-97].

2.10. Sacarificación y Fermentación Simultáneas.

Para llevar a cabo la sacarificación y fermentación simultánea se utilizó como materia prima el bagazo de sorgo pretratado termoquímicamente con hidróxido de sodio al 6% y peróxido de hidrógeno al 10%. Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con una carga de sustrato de 13%, una carga enzimática de $0.5 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ de coctel enzimático Accellerase 1500®. Se utilizó una cepa de la levadura

Saccharomyces cerevisiae con una viabilidad celular del 99%. Se utilizó sulfato de amonio a una concentración final de $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ como fuente de nitrógeno y un inóculo de 10% del volumen total a fermentar. Los matraces fueron cerrados para propiciar condiciones anóxicas y los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5, una agitación de 125 rpm y por un tiempo de 48 horas [98]. Se realizaron 12 réplicas idénticas del experimento, así como 2 réplicas extras como control.

Se cuantificó la concentración de azúcares reductores tomando muestras cada 6 horas y además se tomaron muestras cada 12 horas para determinar la producción de etanol [76, 83, 84, 99, 100].

2.11. Destilación.

Se llevó a cabo usando un equipo de microdestilación (Ver figura 22) donde se mezclaron 25 mL de mosto fermentado con 25 mL de agua destilada, calentando a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta obtener 25 mL de destilado. Seguidamente se determinó la concentración de etanol en el destilado [94, 96].



Figura 22. Microdestilación del mosto fermentado de bagazo de sorgo dulce.

2.12. Análisis Estadístico.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se llevaron a cabo análisis de varianza de una vía así como la prueba *post hoc* de Scheffé con un nivel de confianza de 0.05. El análisis estadístico se realizó usando el programa STATISTICA Base (StatSoft®, Oklahoma, USA).

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Composición del bagazo de sorgo dulce.

La determinación de la composición química del bagazo de sorgo fue realizada por el Departamento de Madera, Celulosa y Papel de la Universidad de Guadalajara usando 2 réplicas de la muestra. Cada réplica fue analizada por triplicado y los resultados de las medias se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Composición química del bagazo de sorgo dulce.

| Réplica | Humedad (%) | Extractos totales (%)* | Lignina (%)* | Holocelulosa (%)* | Alfa Celulosa (%)** | Beta Celulosa (%)** | Gamma Celulosa (%)** |
|---------|-------------|------------------------|--------------|-------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 7.97 | 21.3 | 16.5 | 60.6 | 60.5 | 2.6 | 36.9 |
| 2 | 7.07 | 25.6 | 12.9 | 62.4 | 61.7 | 5.1 | 33.2 |

* Expresado con respecto al material en base seca.

** Expresado en porcentaje respecto a la holocelulosa.

La holocelulosa es el nombre que se le da a la suma de los carbohidratos estructurales de la biomasa, por lo que para saber la cantidad de celulosa y hemicelulosa total de la muestra primero se separa la holocelulosa en alfa celulosa, beta celulosa y gamma celulosa, donde las dos primeras corresponden a la celulosa total y la gamma a la hemicelulosa [89, 101]. La composición del bagazo de sorgo en cuanto a celulosa, hemicelulosa, lignina y compuestos extraíbles se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Principales compuestos en el bagazo de sorgo dulce seco.

| Compuestos | Porcentaje del total (%) |
|--------------------------|--------------------------|
| Extractos totales | 23.45* |
| Lignina | 14.7* |
| Celulosa | 39.93* |
| Hemicelulosa | 21.55* |
| Total | 99.63 |

* Los porcentajes expresados son las medias de las muestras analizadas.

* Los valores están representados en base al material seco.

La biomasa objetivo en este trabajo es la celulosa que compone casi 40% del total del bagazo de sorgo dulce.

3.2. Pretratamientos.

De la constitución total del bagazo de sorgo dulce, alrededor del 40% es celulosa (Ver tablas 2 y 9), biopolímero de interés en el presente trabajo. Con base en este dato se determinaron las condiciones del pretratamiento básico-oxidativo capaces de remover el 60% de material restante, compuesto por lignina y hemicelulosa. Para ello, se probaron distintas concentraciones de NaOH y H₂O₂ según se mencionó en el Capítulo 2. Los resultados de pérdida y recuperación de biomasa se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Pérdida y recuperación de biomasa por acción de los pretratamientos.

| Pretratamiento | Pérdida de biomasa * (%) | Biomasa recuperada ** (%) |
|----------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1 | 51.1 | 48.9 |
| 2 | 61.8 | 38.2 |
| 3 | 67.7 | 32.3 |
| 4 | 46.6 | 53.3 |
| 5 | 61.5 | 38.4 |
| 6 | 65.8 | 34.2 |
| 7 | 44.5 | 55.4 |
| 8 | 61.9 | 38.0 |
| 9 | 58.6 | 41.3 |

* Biomasa perdida por acción del pretratamiento y cuantificada después del lavado de la biomasa resultante.

** La biomasa fue lavada y secada antes del pasaje.

Si la biomasa recuperada es mayor al 40%, entonces es un indicio de la presencia de compuestos diferentes a la celulosa en la matriz estructural del material, y si es menor, se estará removiendo celulosa, desaprovechándose. En la figura 23 se observa (en orden decreciente en cuanto a porcentaje de biomasa recuperada) que los pretratamientos 9, 5, 2 y 8 son los que se acercan más a este valor, los cuales comparten la similitud de utilizar concentraciones de NaOH por arriba del 6%. Se observa una tendencia indicando que a mayor concentración de hidróxido de sodio la remoción de biomasa es superior. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Wang *et al.* [102]. En el caso de la concentración del H₂O₂, se observó que no tiene un efecto tan alto como el NaOH en la remoción de biomasa después del pretratamiento.

Otro punto a tener en cuenta es el hecho de que dos pretratamientos pueden remover material de manera similar, pero actuar de forma diferente sobre la estructura de la biomasa [69, 70]. Esta característica es importante para el subsecuente proceso de hidrólisis ya que la biomasa debe ser fácilmente digerible por las enzimas celulolíticas para asegurar un alto porcentaje de sacarificación.

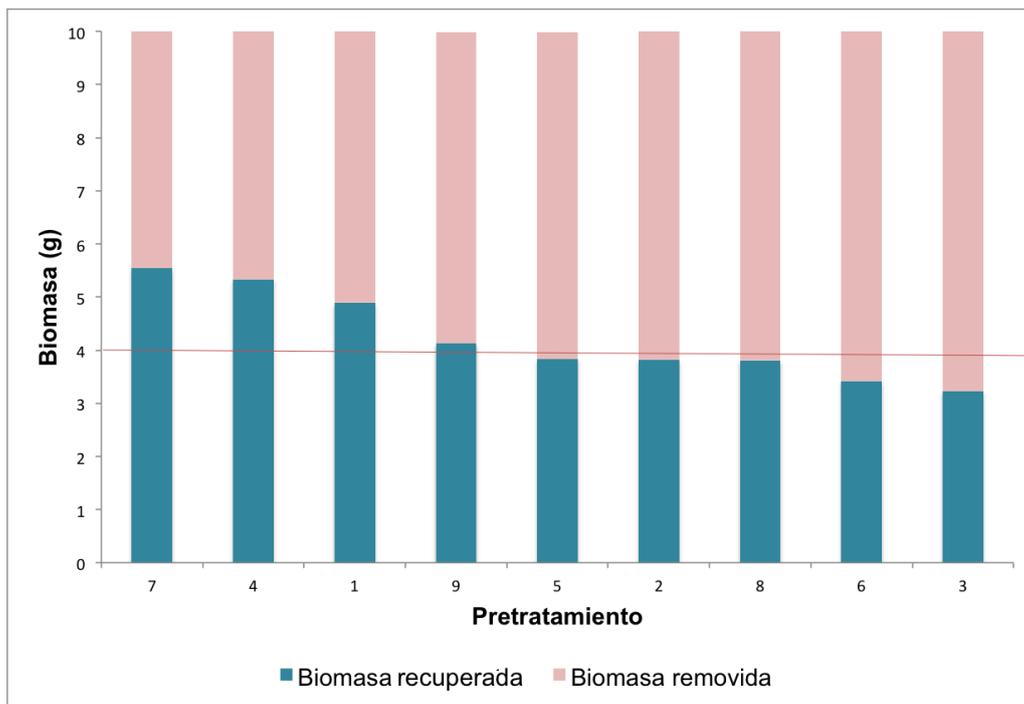


Figura 23. Recuperación y pérdida de biomasa por acción de los diferentes pretratamientos.

En la figura 24 se observan diferentes estructuras de las partes que componen el bagazo de sorgo dulce antes de ser sometido a los pretratamientos. En la figura 24a se puede observar la integridad estructural de la corteza del tallo, uno de los componentes más abundantes en el bagazo, donde se aprecia una estructura robusta producida por la orientación compacta de las macrofibras de celulosa y, debido al mayor contenido de lignina, se produce una fuerte coloración. En la figura 24b se observa una estructura característica de la médula del tallo, donde se perciben las paredes celulares en color oscuro debido a la lignina, material que se busca retirar y que cubre las estructuras celulares. Este tipo de conformación propia de los materiales lignocelulósicos, impide que las enzimas penetren la estructura y sean capaces de alcanzar grandes cantidades de celulosa, por lo que sacarificar un material sin pretratamiento solo brinda a las enzimas la oportunidad de atacar las partes expuestas de las fibras de celulosa.

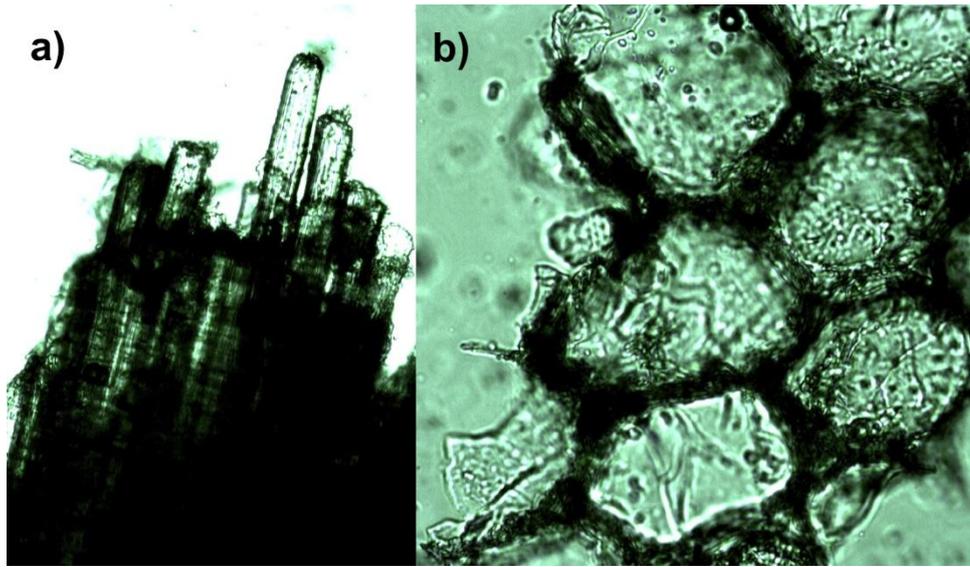


Figura 24. Imagen de la corteza (a) y la médula (b) del bagazo de sorgo dulce sin tratamiento vista a 40X en microscopio óptico.

En la figura 25 se pueden apreciar diferentes exposiciones del bagazo pretratado con 6% de NaOH y 10% de H₂O₂ observándose diferencias estructurales con respecto al bagazo original, provocadas por la acción del pretratamiento. En la figura 25a se muestra una macrofibra sin la coloración oscura que da principalmente la lignina [103], como se observa en la figura 24a. Al remover la lignina, la macrofibra pierde su integridad estructural y las fibras que la conforman se separan, como se observa en la figura 25b. En la figura 25c se observa la estructura de una sola fibra. La estructura de la biomasa que resulta después del pretratamiento es adecuada para la sacarificación, ya que al separar las fibras y retirar la lignina, se aumenta la superficie de contacto entre las enzimas y la celulosa. También se disminuyen los compuestos que podrían inhibir la actividad enzimática [104].

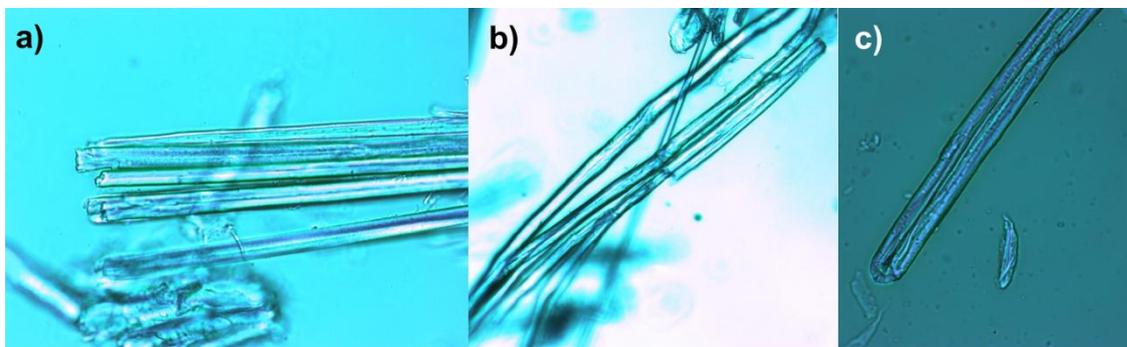


Figura 25. Bagazo de sorgo dulce pretratado visto a 20X en microscopio óptico. (a) macrofibra sin lignina; (b) fibras separadas; (c) una sola fibra a 40X.

Estos resultados permitieron corroborar que el pretratamiento básico-oxidativo es una opción confiable para remover la lignina y ocasionar cambios en la biomasa que son aprovechables para la conversión del bagazo de sorgo dulce en etanol.

3.3. Hidrólisis enzimática (sacarificación).

Para determinar cuál de los 9 pretratamientos proporciona la estructura física más favorable para que las enzimas lleven a cabo la sacarificación de la biomasa, fue necesario realizar experimentos de hidrólisis enzimática de todas las muestras de bagazo pretratado, para lo cual, primero se determinaron 2 de las variables básicas para la hidrólisis: la carga de sustrato y la carga enzimática.

3.3.1. Carga de sustrato.

Los resultados obtenidos presentados en la tabla 11 indican que entre más se aumenta la carga de sustrato, aumenta también la concentración final de azúcares reductores. Con base en estos datos se utilizó la carga de 13% que fue la que mejores resultados presentó entre los parámetros del experimento (una carga de sustrato por arriba de 13% provocó problemas en el sistema, ya que la biomasa absorbía a la fase líquida, creándose una barrera física para la dispersión de la enzima).

Tabla 11. Resultados de la sacarificación a diferentes cargas de sustrato.

| Carga de sustrato (%) | Biomasa* (g) | Concentración de azúcares reductores (g·L ⁻¹) | Equivalente en gramos de glucosa (g) | Porcentaje de sacarificación (%) |
|-----------------------|--------------|---|--------------------------------------|----------------------------------|
| 2 | 0.6 | 7.73 | 0.23 | 36.24 |
| 5 | 1.5 | 23.88 | 0.71 | 47.76 |
| 10 | 3.0 | 45.04 | 1.35 | 45.04 |
| 13 | 3.9 | 59.26 | 1.77 | 45.60 |

* Papel filtro de alta pureza

No obstante se observa que la eficiencia del preparado enzimático llega a un límite de alrededor de 47% una vez que se alcanza una carga de sustrato de 5% y permanece cercana a este valor, no importando que se aumente hasta el máximo de 13% (Ver figura 26), lo que fue corroborado con el análisis de varianza, el cual indicó que entre los porcentajes de sacarificación de las cargas 5, 10 y 13%, no existen diferencias significativas (n=3, p=0.05). Esto indica que la eficiencia en la hidrólisis enzimática está limitada por la conformación estructural de la biomasa (en este caso papel filtro

de alta pureza) y no por la inhibición enzimática debido a la concentración de productos (se alcanza una concentración de azúcares reductores de $59.26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

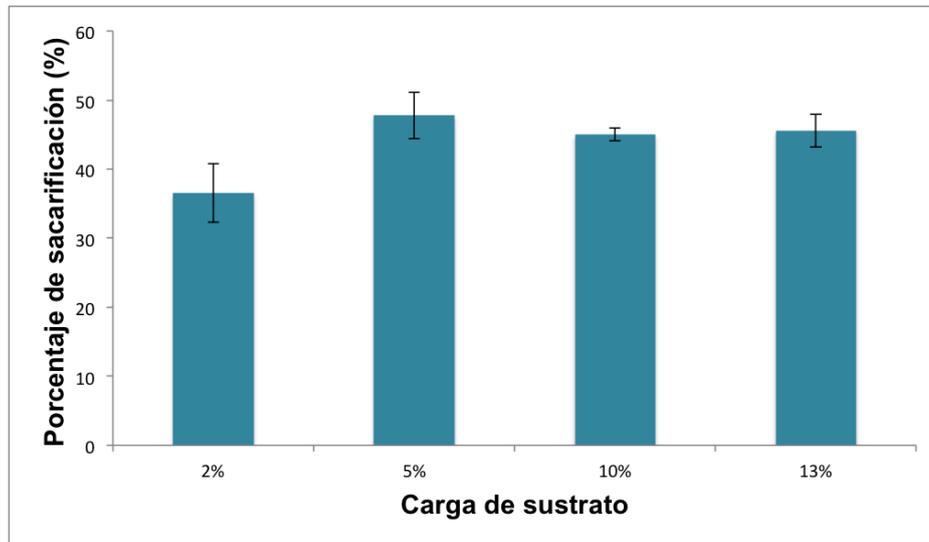


Figura 26. Conversión de celulosa con respecto a la carga de sustrato.

3.3.2. Carga enzimática óptima para la sacarificación.

En cuanto a la carga enzimática las determinaciones fueron realizadas usando bagazo de sorgo pretratado como materia prima y una carga de sustrato de 13%. Los resultados se muestran en la figura 27.

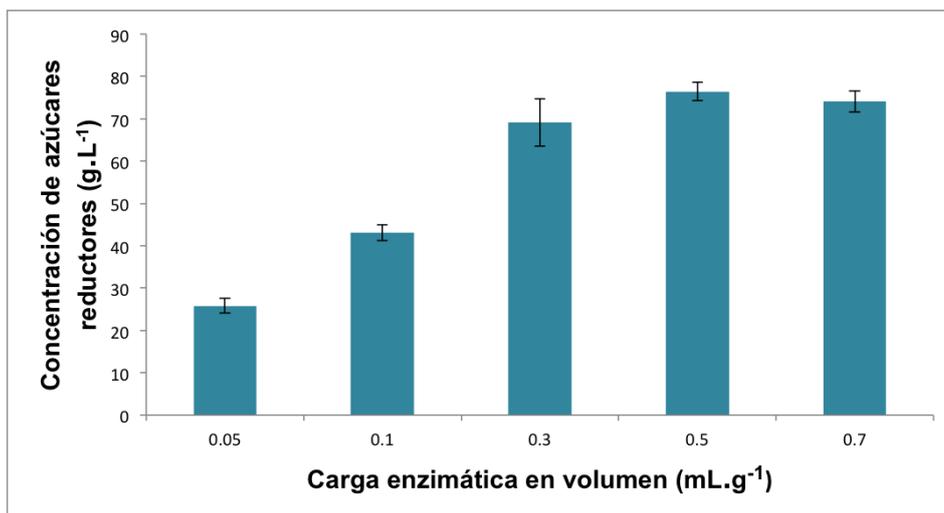


Figura 27. Efecto de la carga enzimática sobre la concentración de azúcares reductores.

Se puede observar que la máxima concentración de azúcares reductores resulta de una carga enzimática en volumen de 0.5 mL por cada gramo de biomasa, aunque las desviaciones estándar de los resultados parecen indicar que por arriba de $0.3 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$

los resultados de la concentración de azúcares reductores son estadísticamente iguales, el análisis de varianza mostró que si existen diferencias significativas entre las cargas de 0.3, 0.5 y 0.7 mL·g⁻¹ (n=3, p=0.05). Se optó por utilizar una carga enzimática de 0.5 mL·g⁻¹, lo que funcionará siempre y cuando el preparado enzimático contenga las mismas enzimas en las mismas proporciones, bajo las mismas condiciones fisicoquímicas, y semejante actividad catalítica [76].

3.4. Determinación de la estabilidad catalítica del preparado enzimático Accellerase 1500[®] respecto al tiempo.

Los resultados de este experimento permitieron determinar el tiempo adecuado para el proceso de sacarificación, tanto para el proceso de etapas separadas, como de sacarificación y fermentación simultáneas. En un trabajo realizado por *Cao et al.* [90], se muestra que a las 24 horas se liberan la mayoría de los azúcares reductores en la hidrólisis de bagazo de sorgo dulce pretratado con un método básico-oxidativo, pero con un diferente preparado enzimático. Por esto, fue necesario comprobar que Accellerase 1500[®] conserva su actividad catalítica por un período mínimo de 24 horas. Al realizar el ensayo se observó que aún en la última adición de sustrato a las 96 horas, el complejo enzimático es capaz de liberar azúcares de la biomasa, aunque en menor medida que en las primeras adiciones, al inicio y a las 48 horas (Ver figura 28).

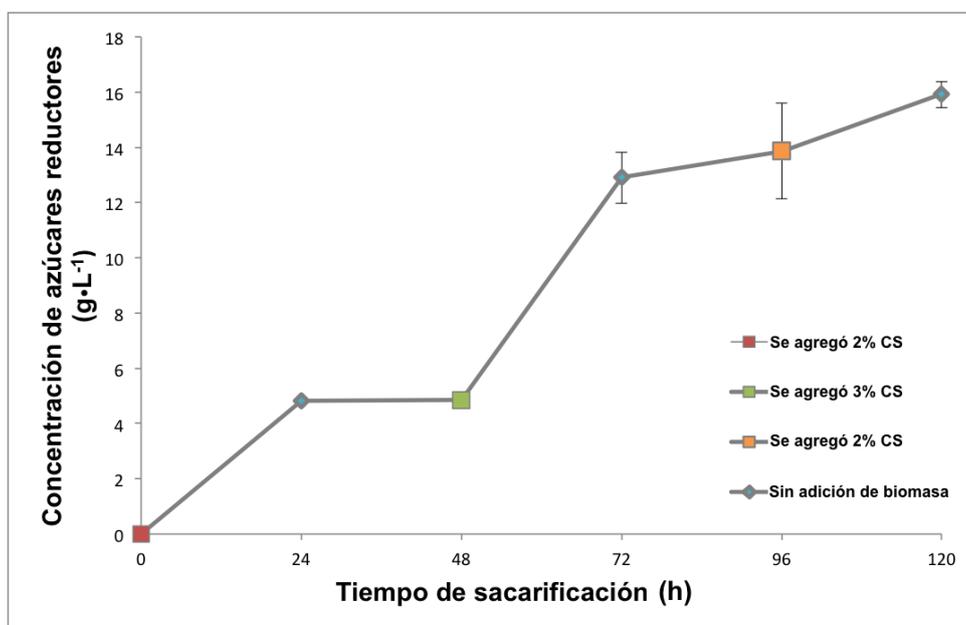


Figura 28. Efecto del tiempo de reacción sobre la actividad catalítica de las enzimas. Se observa como las enzimas responden al aumento de la carga de sustrato (CS).

3.5. Sacarificación enzimática del bagazo pretratado.

Una vez que se determinó la carga de sustrato, la carga enzimática y el tiempo de sacarificación, se llevó a cabo la sacarificación del material resultante de cada uno de los 9 pretratamientos a los que fue sometido el bagazo de sorgo dulce. De esta manera se pudo determinar cuál de los pretratamientos proporciona mayores ventajas para la hidrólisis enzimática. A este respecto Galbe *et al.* [69] sugieren que el pretratamiento es un paso crucial para el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. El pretratamiento seleccionado fue utilizado en los posteriores procesos de producción de etanol tanto en fases separadas como en la sacarificación y fermentación simultáneas.

La hidrólisis enzimática del bagazo pretratado se llevó a cabo bajo una carga de sustrato de 13%, una carga enzimática de $0.5 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, un pH de 5 (utilizando una solución reguladora de citratos) y una temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ [76] por un período de 24 horas. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 12. Resultados de la sacarificación enzimática de biomasa pretratada.

| Tratamiento | Bagazo pretratado (g) | Concentración de AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | Gramos de AR liberados (g) | Porcentaje de sacarificación (%) |
|-------------|-----------------------|--|----------------------------|----------------------------------|
| 1 | 4.89 | 53.13 | 1.99 | 40.86 |
| 2 | 3.82 | 62.30 | 1.83 | 47.92 |
| 3 | 3.23 | 71.48 | 1.77 | 54.97 |
| 4 | 5.33 | 57.51 | 2.36 | 44.23 |
| 5 | 3.84 | 70.99 | 2.09 | 54.59 |
| 6 | 3.42 | 74.33 | 1.95 | 57.16 |
| 7 | 5.54 | 66.36 | 2.83 | 51.04 |
| 8 | 3.80 | 79.57 | 2.33 | 61.21 |
| 9 | 4.13 | 80.73 | 2.56 | 62.09 |

Los valores presentados corresponden a las medias de tres determinaciones.

En la tabla 13 se observan 3 variables de estudio: concentración final de azúcares reductores, los gramos de glucosa liberados y el porcentaje de sacarificación. El primero es obtenido experimentalmente y los dos siguientes son calculados.

En la figura 29 se observan los resultados de los análisis estadísticos realizados a las concentraciones finales de azúcares reductores. Esta variable es una de las más importantes a considerar, ya que las concentraciones altas de azúcares en el medio favorecen el metabolismo fermentativo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, reprimiendo su metabolismo aerobio (Crabtree Effect) [105] y en el cual, el principal subproducto es el etanol, mientras que bajas concentraciones de azúcares junto con la presencia de oxígeno en el medio propician la respiración celular, lo que induce la reproducción de la levadura, generando biomasa y no etanol [106]. Los resultados indican que los pretratamientos 6, 8 y 9 fueron los que permitieron obtener concentraciones más altas de azúcares reductores vía hidrólisis enzimática y entre éstos no existen diferencias significativas.

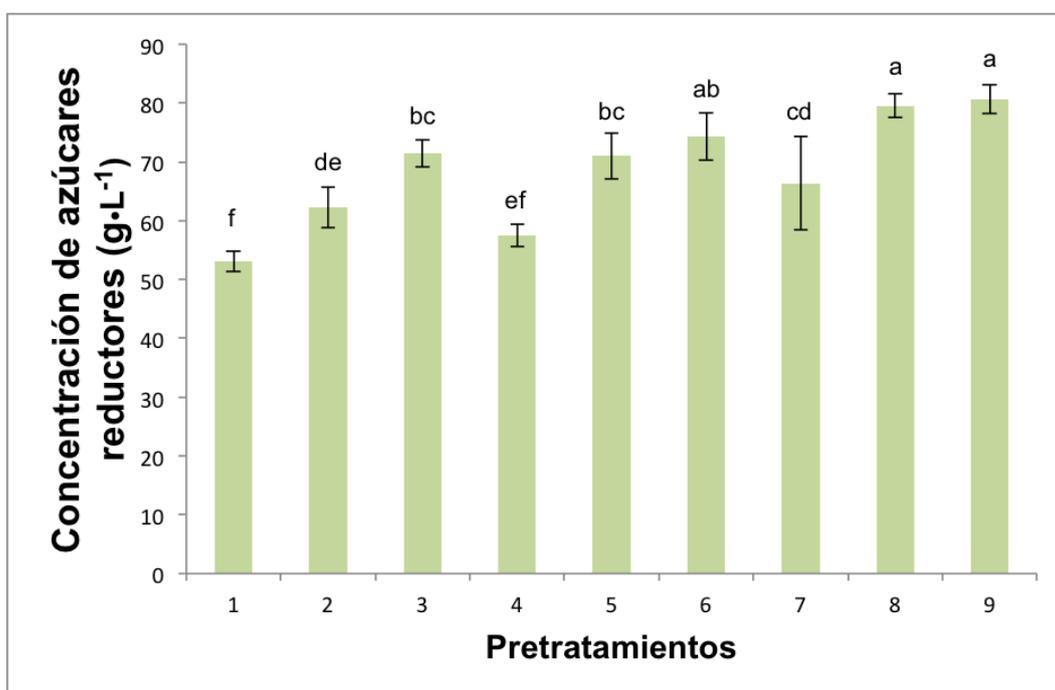


Figura 29. Concentraciones de azúcares reductores finales después de la hidrólisis enzimática. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

En la figura 30 se aprecian los resultados de las pruebas estadísticas respecto a los gramos de azúcares reductores liberados por la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada. Se observa que los pretratamientos 4, 7, 8 y 9 son los que permiten obtener las mayores cantidades de azúcares reductores. También indican que entre los pretratamientos 4, 8 y 9 no existe diferencia significativa, pero si con el pretratamiento 7, aunque entre éste y el 9 no las hay.

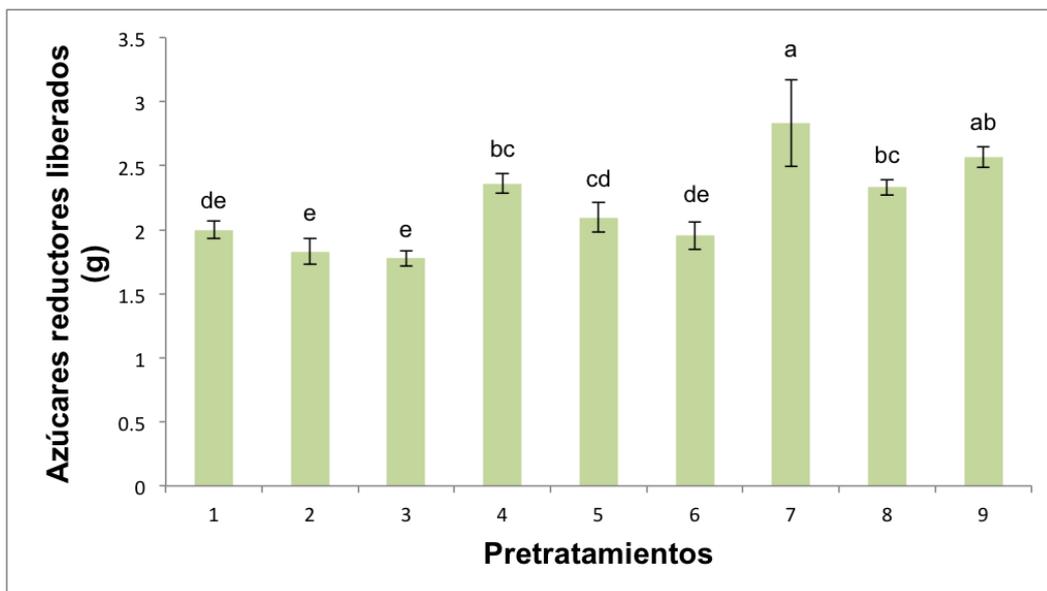


Figura 30. Gramos de azúcares reductores liberados por acción de la hidrólisis enzimática. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

Con estos datos se calculó el porcentaje de sacarificación (parte proporcional de material que es hidrolizado con respecto a la biomasa total sometida a hidrólisis). El mayor porcentaje lo obtuvieron los pretratamientos 6, 8 y 9 entre los cuales no existen diferencias estadísticamente significativas como se aprecia en la figura 31.

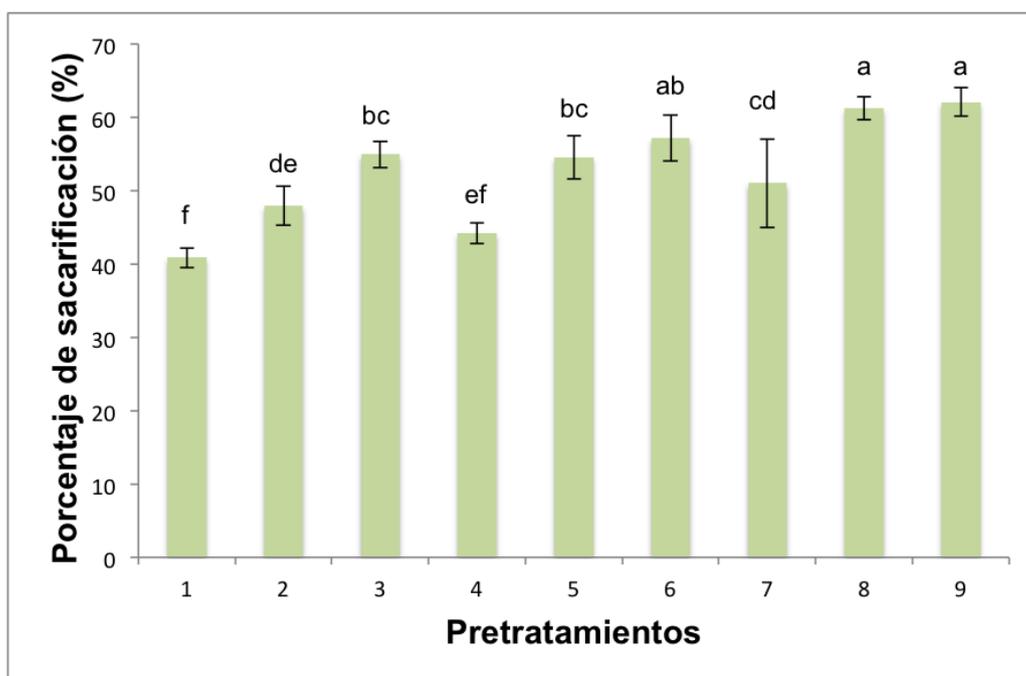


Figura 31. Porcentajes de sacarificación de cada pretratamiento. El 100% representa el total de biomasa que es sometida a la hidrólisis enzimática. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.

Con los datos obtenidos se determinó el mejor pretratamiento entre los 9 estudiados, para ser seleccionado como el pretratamiento básico-oxidativo para un proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica de sorgo dulce. En la figura 32 se muestra el conjunto de tres variables consideradas como las más convenientes para decidir el mejor pretratamiento. Los que arrojaron los mejores resultados en cuanto a concentración de azúcares reductores, eficiencia de la recuperación de biomasa objetivo y gramos de glucosa liberados fueron los pretratamientos 8 y 9. Sin embargo, siendo el pretratamiento 8 el que usó una menor cantidad de hidróxido de sodio (pretratamiento 8 = NaOH al 6% + H₂O₂ al 10%, pretratamiento 9 = NaOH al 10% + H₂O₂ al 10%) fue el seleccionado para continuar con este trabajo.

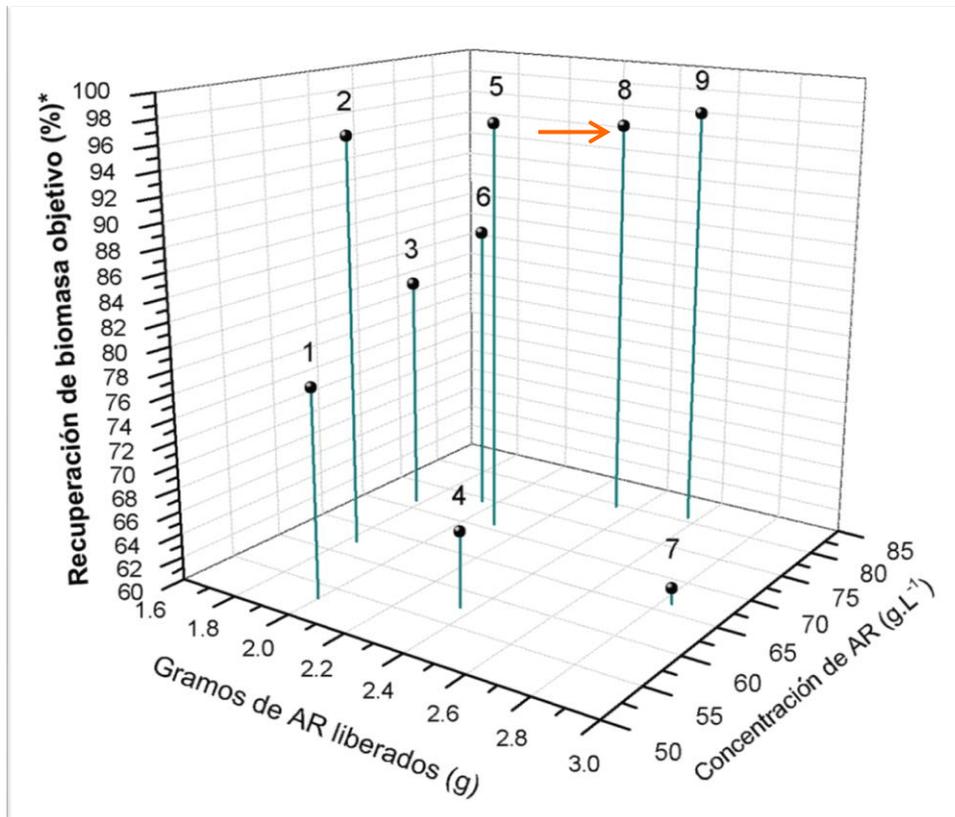


Figura 32. Gráfica donde se presentan 3 de las variables más importantes a tomar en cuenta para determinar el mejor pretratamiento básico-oxidativo.

* La recuperación de "biomasa objetivo" hace referencia al 40% del total del bagazo de sorgo dulce que corresponde a la celulosa. Los pretratamientos que en este eje (Y) se acercan más al 100%, son los que fueron más eficientes para recuperar ese 40% de interés.

Una vez elegido el pretratamiento 8, se realizó una prueba que nos permitió apreciar directamente sus beneficios comparada con la biomasa sin pretratar (pretratamiento 0). En la figura 33 se muestran los resultados obtenidos. El pretratamiento 8 permitió obtener concentraciones 10 veces más altas de azúcares reductores con respecto a la biomasa sin pretratar, al igual que se constató un aumento de 8.6 y 10.2 veces en cuanto a los gramos de glucosa liberados y el porcentaje de sacarificación, respectivamente.

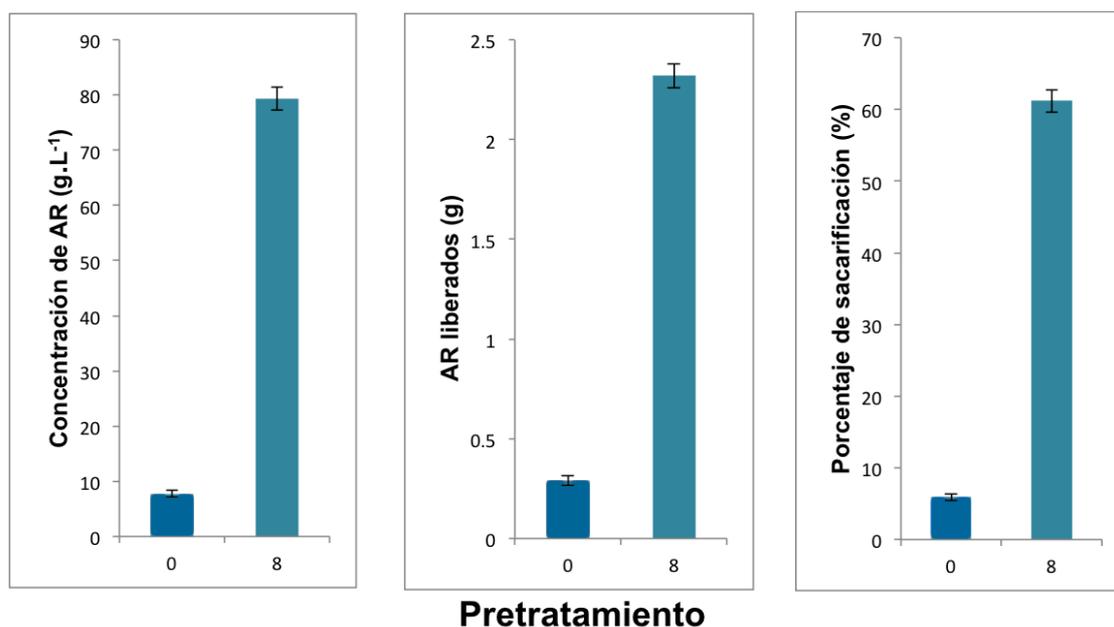


Figura 33. Concentración de AR, gramos de AR liberados y porcentaje de sacarificación en comparación de una hidrólisis enzimática utilizando el pretratamiento 8 y biomasa sin pretratar.

En la figura 34 se muestran varias imágenes de la fase sólida remanente después de 24 horas de hidrólisis enzimática. En la figura 34a y 34b se puede observar que las fibras son degradadas por las enzimas celulolíticas principalmente en la parte central de su estructura. En la figura 34c se observa también cómo otra fibra se ha fracturado en diferentes secciones debido al debilitamiento de su estructura que se genera en la sacarificación. Las imágenes fueron capturadas a un aumento 40X. Este tipo de modificaciones estructurales no están presentes en las fibras antes de la adición de las enzimas, por lo que no son resultado de un daño mecánico. Las fibras presentadas son parte del material que no alcanza a sacarificarse en las 24 horas de la hidrólisis enzimática, ya que gran parte de la biomasa es licuada y solubilizada en la solución reguladora, por lo tanto no es posible observarla al microscopio óptico.

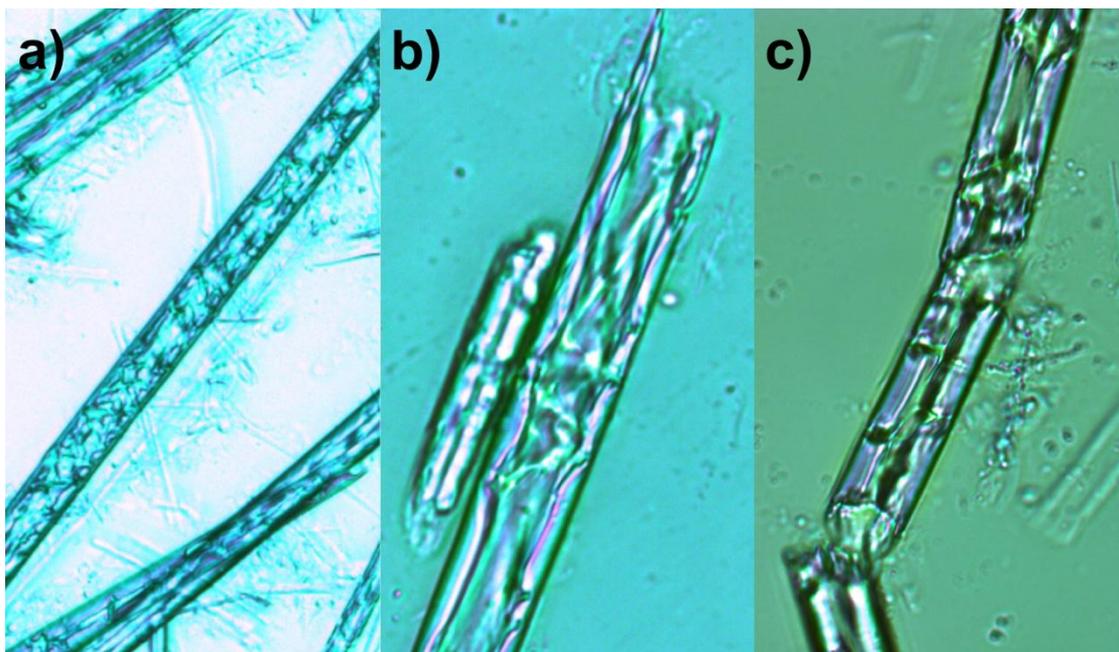


Figura 34. Bagazo de sorgo pretratado e hidrolizado enzimáticamente.

3.6. Producción de etanol por sacarificación y fermentación en etapas separadas (SFES).

Para llevar a cabo la fermentación primero se realizó una curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con lo que se determinó el tiempo de incubación del inóculo. La curva de crecimiento se presenta en la figura 35. Se puede observar que a las 12 horas la fase exponencial del crecimiento de la levadura llega a su máximo y su viabilidad comienza a decrecer. A las 24 h se observó un segundo ciclo de crecimiento, presentando un comportamiento diáuxico. Este tipo de fenómeno generalmente se presenta cuando la fuente principal de carbono se agota y la levadura cambia su metabolismo para poder consumir otra fuente [106]. En el presente trabajo la fuente de carbono es glucosa (resultante de la hidrólisis de la celulosa por acción de las celulasas constituyentes del complejo enzimático Accellerase 1500), por lo que este comportamiento puede ser debido a otras condiciones del cultivo, como por ejemplo, la alta temperatura a la que se llevó a cabo el crecimiento (37 °C). Es necesario realizar otros estudios para determinar la causa de este comportamiento.

Se tomó un período de 12 horas para realizar la incubación del inóculo. La concentración celular de la levadura casi se triplica en este tiempo.

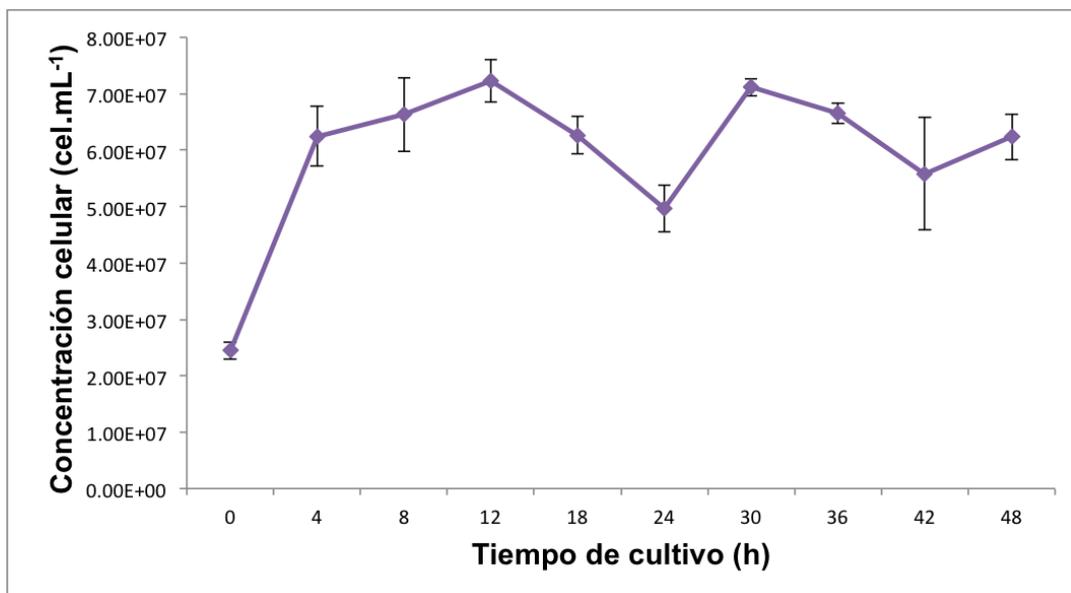


Figura 35. Curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración de azúcares reductores de 20 g·L⁻¹, 37 °C y 125 rpm en hidrolizado de sorgo dulce.

Se realizó la fermentación de los hidrolizados enzimáticos del bagazo de sorgo dulce, los cuales contaban con una concentración inicial de azúcares reductores de 80 g·L⁻¹, sin embargo la concentración real al inicio de la fermentación fue de 74.94 g·L⁻¹ debido al volumen extra que se agrega al incluir el inóculo para la fermentación. Los resultados de la producción de etanol por etapas separadas se muestran en la figura 36. Se puede apreciar que la concentración de azúcares reductores disminuyó de 74.94 g·L⁻¹ hasta 18.72 g·L⁻¹ en 48 horas de fermentación, por lo que la levadura sólo consumió el equivalente a 56.22 g·L⁻¹. *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de consumir azúcares equivalentes a una concentración de 80 g·L⁻¹ en 24 horas y producir con ellos hasta 32 g·L⁻¹ de etanol con una eficiencia del 80% en la fermentación, esto en condiciones fisicoquímicas óptimas según lo reportado por Arrizon *et al.* [107]. Sin embargo, las fermentaciones por fases separadas llevadas a cabo en este trabajo no fueron realizadas en condiciones óptimas (30 °C, pH 4), sino que fueron realizadas a las condiciones de la sacarificación y fermentación simultáneas: 37 °C y pH 5 [82] para poder comparar y argumentar los resultados finales. Es probable que por eso a las 48 horas de fermentación quedó en el medio un remanente de 18.72 g·L⁻¹ lo que representa un consumo por las levaduras del 75% del total de azúcares disponibles. Los AR consumidos por las levaduras en esta fermentación tienen un potencial teórico de producción de etanol de 28.72 g·L⁻¹ [108].

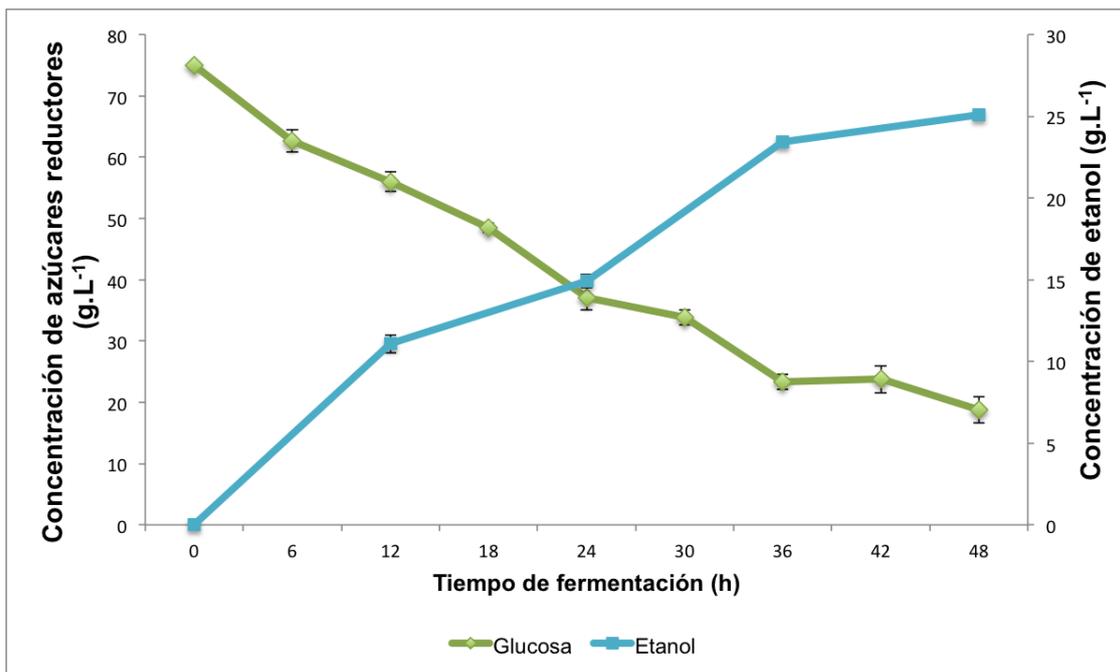


Figura 36. Consumo de azúcares reductores y producción de etanol en la fermentación por etapas separadas.

La producción de etanol fue constante hasta obtener una concentración final de 25.09 g·L⁻¹, equivalente a un porcentaje en volumen del 2.5%. El rendimiento de la fermentación fue de 87.33% del máximo teórico.

3.7. Producción de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas (SFS).

Durante el proceso de SFS las levaduras consumen la glucosa a la par que ésta se va liberando de la celulosa, por lo que los datos de concentración de azúcares reductores en este caso sólo representan la cantidad de azúcares reductores disponibles en el medio al momento de la medición y no la producción total por la sacarificación. Los resultados en cuanto a concentración de azúcares reductores y producción de etanol se encuentran en la figura 37. Se puede observar que la máxima concentración de azúcares reductores durante todo el proceso no sobrepasó los 33.13 g·L⁻¹ y que después de 48 horas de reacción, la concentración final fue de 15.79 g·L⁻¹. En cuanto a la producción de etanol, la concentración final a las 48 horas fue de 26.65 g·L⁻¹, pero la concentración máxima se dio a las 36 horas con un valor de 27.97 g·L⁻¹. La producción de etanol fue continua y sólo decreció en las últimas 12 horas.

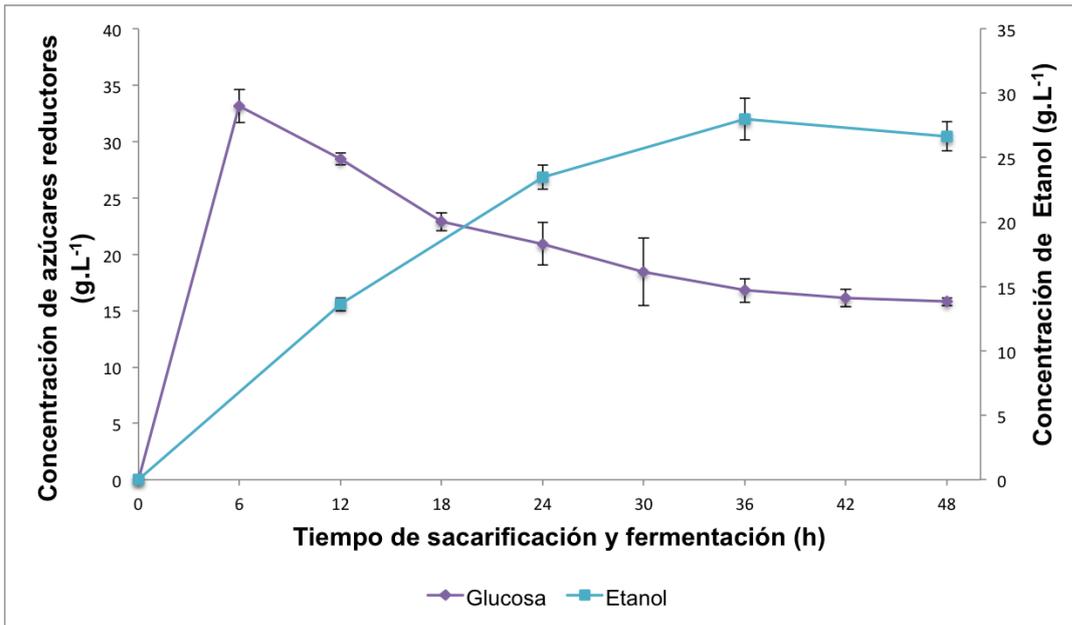


Figura 37. Concentración de azúcares reductores y concentración de etanol en la sacarificación y fermentación simultáneas.

Para poder tener una aproximación de la producción de azúcares reductores se realizó en forma paralela, una sacarificación con los mismos componentes que la SFS, faltando únicamente la levadura. Las concentraciones de azúcares reductores de ambos procesos se muestran en la figura 38.

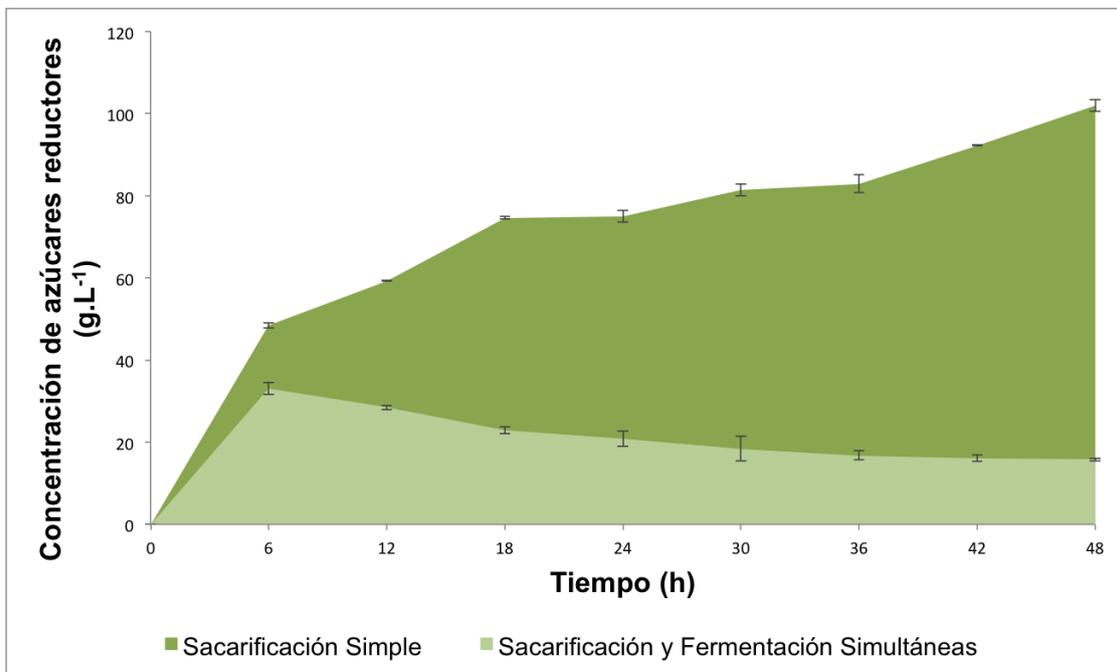


Figura 38. Concentración de azúcares reductores derivados de un proceso de sacarificación simple y uno de sacarificación y fermentación simultáneas.

Al comparar los dos sistemas se puede observar que la concentración de azúcares reductores siempre es menor en la sacarificación y fermentación simultáneas que en la sacarificación simple debido a que en esta última los azúcares se acumulan después de ser producidos, mientras que en la SFS se consumen al mismo tiempo que son liberados de la matriz de celulosa. Este efecto tiene ventajas para la hidrólisis, pero desventajas para la fermentación, como se expone más adelante.

Para determinar la eficiencia de la sacarificación en la SFS, se cuantificó por gravimetría la cantidad de biomasa que no fue hidrolizada después de las 48 horas de reacción, con lo que se obtuvo que el porcentaje de sacarificación fue de 93.22%. Esto equivaldría a una concentración de azúcares reductores de $121 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (bajo los parámetros del experimento), por lo tanto, si una sacarificación simple logra una concentración de $102 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ al final de las 48 horas de hidrólisis (lo que equivale a un porcentaje de sacarificación del 78.46%), entonces la sacarificación y fermentación simultáneas logró aumentar la eficiencia de la sacarificación de la biomasa pretratada de sorgo dulce en un 14.76%. Éste aumento se puede deber a que la β -glucosidasa fue menos inhibida por el aumento en la concentración de glucosa ya que esta última fue consumida por las levaduras a medida que fue producida, lo que propicia una hidrólisis más eficiente [78, 109].

Por otro lado, de la fermentación se puede deducir que si en la SFS se liberaron azúcares reductores equivalentes a una concentración de $121 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, y a éstos les restamos los carbohidratos remanentes en el medio al final de las 48 horas de reacción ($16.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), obtenemos que la glucosa consumida por *Saccharomyces cerevisiae* fue equivalente a $104.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Esta cantidad de azúcares reductores tiene un potencial teórico de producción de etanol de $53.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Sin embargo sólo se produjo un máximo de $27.97 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que evidencia que la eficiencia de la fermentación fue de 52.52%. Esta disminución puede deberse a que las levaduras nunca están expuestas a altas concentraciones de azúcares fermentables que propicien el efecto “Crabtree” y que se promueva el metabolismo fermentativo de las levaduras y no la respiración aerobia [106].

En la figura 39 podemos observar la comparación entre la producción de etanol de los dos sistemas siendo evidente que en todos los puntos de muestreo la SFS permite una mayor concentración de etanol.

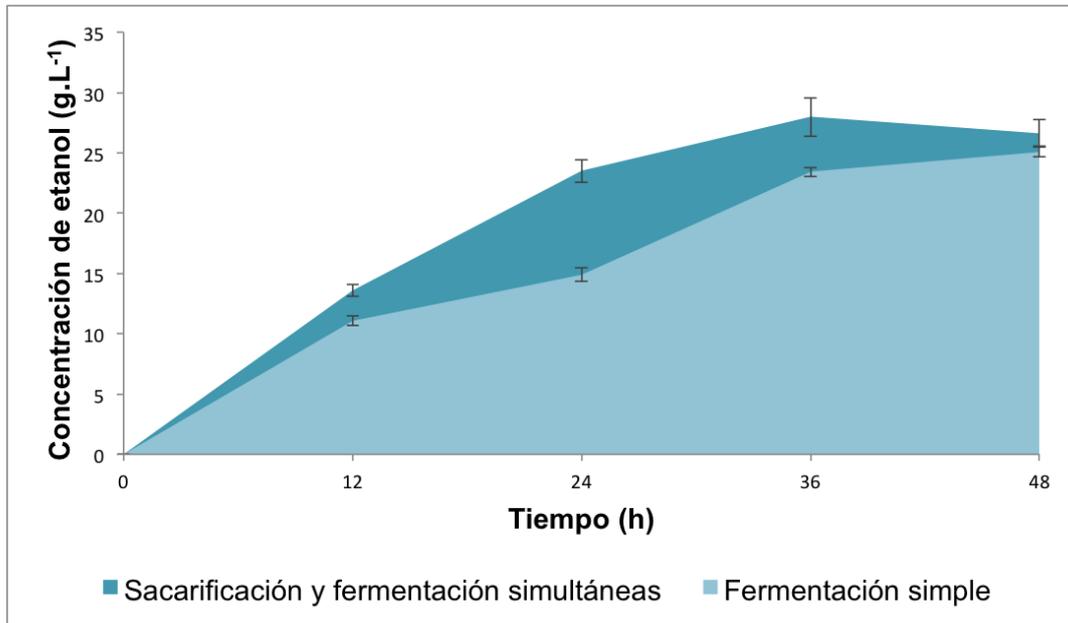


Figura 39. Concentración de etanol de los dos sistemas, sacarificación y fermentación en etapas separadas y sacarificación y fermentación simultáneas.

Con la sacarificación y fermentación por etapas separadas se estima que es posible producir 93.24 litros de etanol por cada tonelada de bagazo crudo, seco, en 72 horas (24 h de sacarificación, más 48 h de la fermentación) y usando 2 diferentes reactores, mientras que con la sacarificación y fermentación simultáneas es posible producir un estimado de 104.03 litros de etanol por cada tonelada de bagazo crudo, seco, en 48 horas y usando sólo un reactor.

Basados en los datos antes presentados, se puede afirmar que la técnica de sacarificación y fermentación simultáneas tiene las siguientes ventajas:

- Aumenta la eficiencia de la hidrólisis enzimática
- Resulta en una mayor producción de etanol
- Tiene un menor tiempo de proceso
- Disminuye los reactores necesarios para llevarse a cabo

La desventaja del proceso de SFS es que disminuye la eficiencia de la fermentación en un 34.81% comparada con el proceso por etapas separadas, bajo los parámetros descritos en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos en este trabajo van en concordancia con los descritos por otros autores que también utilizan el bagazo de sorgo dulce como materia prima para la producción de etanol como *Shen et al.* [100] quienes realizaron procesos tanto por etapas separadas como por sacarificación y fermentación simultáneas. Ellos utilizaron un pretratamiento de explosión de vapor, con lo cual lograron producir etanol equivalente a una concentración final de 23.3 g·L⁻¹ en SFS y 21.2 g·L⁻¹ por etapas separadas.

Cao et al. [90] estudiaron 5 diferentes pretratamientos para el bagazo de sorgo dulce y encontraron que el pretratamiento básico-oxidativo es el que permite un mayor porcentaje de sacarificación y por lo tanto una mayor concentración final de glucosa, la cual fue 9.8 veces más alta que su control (biomasa sin pretratar). En el presente trabajo el pretratamiento con mejores resultados permite una concentración de glucosa 10.28 veces más alta que el control. También realizaron la producción de etanol por etapas separadas y obtuvieron una concentración de etanol de 6.12 g·L⁻¹, muy por debajo de la obtenida en este trabajo, lo que se debe a que la concentración de glucosa que utilizaron en su fermentación era igualmente baja, resultado de una sacarificación con una carga de sustrato de sólo el 2%.

Wang et al. [110] lograron optimizar el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas utilizando métodos estadísticos como el análisis de superficies de respuesta, con lo que han llegado a producir lo equivalente a una concentración de 39 g·L⁻¹ de etanol usando bagazo de sorgo dulce como materia prima. Otros autores también han hecho uso de esta técnica para aumentar sus rendimientos de etanol en la SFS, como *Zhang et al.* [111] quienes usando un pretratamiento alcalino sobre paja de trigo han logrado a obtener una concentración de etanol de 37.84 g·L⁻¹.

CONCLUSIONES

El pretratamiento termoquímico básico-oxidativo a base de NaOH y H₂O₂, cumple con los requisitos descritos en la literatura para ser considerado como un buen pretratamiento para el bagazo de sorgo dulce ya que es capaz de remover eficazmente la lignina y la hemicelulosa que lo constituyen. De igual forma este pretratamiento proporciona una conformación estructural que aumenta la superficie de contacto entre la biomasa y las enzimas celulolíticas.

El pretratamiento que usó una concentración de NaOH de 6% y 10% de H₂O₂ fue el seleccionado, ya que además de estar entre los mejores resultados, también es el que requiere la menor cantidad de reactivos.

La comparación entre los procesos de sacarificación y fermentación por etapas separadas y del proceso simultáneo, sugiere que las celulasas presentes en la formulación del complejo enzimático Accellerase 1500[®] pueden ser inhibidas por la concentración de productos (celobiosa y glucosa) y que el proceso simultáneo reduce ésta inhibición favoreciendo la hidrólisis más eficiente de la biomasa.

Se realizó la producción de etanol por sacarificación y fermentación en etapas separadas, en la cual la fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C y pH 5, con lo que se obtuvo un rendimiento de etanol de 87.33% del máximo teórico, un valor aceptable pese a que las condiciones de fermentación no fueron las óptimas para la levadura.

En la sacarificación y fermentación simultáneas se logró aumentar la eficiencia de sacarificación en un 14.76% comparado con la SFES, lo que resultó en un mayor rendimiento final de etanol.

En la sacarificación y fermentación simultáneas la eficiencia de la fermentación fue de 52.52% del máximo teórico a las 48 horas, valor más bajo que el obtenido en SFES (87.33%), aun así, la producción final de etanol fue mayor debido al aumento en los azúcares disponibles liberados por la hidrólisis enzimática de la biomasa.

El bagazo de sorgo dulce puede ser considerado como materia prima para la producción de bioetanol de segunda generación.

PERSPECTIVAS

Para poder utilizar el sorgo dulce como materia prima para la producción de etanol celulósico mediante la técnica de sacarificación y fermentación simultáneas es importante optimizar el proceso, para lo cual se propone:

- Optimizar el tiempo de pretratamiento termoquímico del bagazo.
- Estudiar la composición de los residuos del pretratamiento para determinar si pueden ser usados en algún otro proceso para darles valor agregado.
- Realizar micrografías utilizando un microscopio electrónico de barrido para obtener detalles de la estructura del bagazo después de cada etapa y poder explicar el mecanismo de acción de los reactivos involucrados en el pretratamiento y de las enzimas en la sacarificación.
- Determinar la composición del bagazo de sorgo después del pretratamiento para medir la remoción de lignina.
- Comparar entre diferentes tipos de preparados enzimáticos comerciales para determinar si Accellerase 1500[®] es la mejor opción para ser usado en conjunto con un pretratamiento básico-oxidativo y bagazo de sorgo dulce.
- Diseñar una técnica que permita aumentar la carga de sustrato por arriba del 13% en el proceso de sacarificación enzimática.
- Utilizar una cepa de un microorganismo fermentativo que sea capaz de llevar a cabo fermentaciones eficientes a temperaturas lo más cercanas a los 50 °C.
- Optimizar los parámetros utilizados en la sacarificación y fermentación simultáneas para incrementar la eficiencia en la fermentación.

BIBLIOGRAFÍA

1. R. Sharpe, *Technical options for fossil fuel based road transport; EU transport GHG: Routes to 2050?* Londres: European Commission Directorate-General Environment, AEA, Technology plc. 2010.
2. Secretaria de Medioambiente y Recursos Naturales and Instituto Nacional de Ecología, *Inventario nacional de emisiones México DF*: Semarnat, INE. 2002.
3. S. Solomon, Intergovernmental Panel on Climate Change., and Intergovernmental Panel on Climate Change. Working Group I., *Climate change 2007 : the physical science basis : contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press. 2007; Vol. viii, 996.
4. IEA, *Transport, Energy and CO2: Moving toward Sustainability*. First edition ed. Paris: International Energy Agency. 2009; Vol. 1.
5. R.A. Kerr and R.F. Service, What can replace cheap oil--and when? *Science*, **309**(5731): p. 101. 2005.
6. A. Demirbas, Competitive liquid biofuels from biomass. *Applied Energy*, **88**(1): p. 17-28. 2011.
7. R. Luque, J. Campelo, and J. Clark, *Handbook of Biofuels Production - Processes and Technologies*: Woodhead Publishing. 2011.
8. G. Knothe, J. Krahl, and J.H. Van Gerpen, *The biodiesel handbook*. 2nd ed. Urbana, Ill.: AOCS Press. 2010; xiii, 501 p.
9. J.D. Kinder and T. Rahmes, *Evaluation of Bio-Derived Synthetic Paraffinic Kerosene (Bio-SPK)*. Chicago: The Boeing Company. 2009.
10. B. Hahn-Hagerdal, M. Galbe, M.F. Gorwa-Grauslund, G. Liden, and G. Zacchi, Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol*, **24**(12): p. 549-556. 2006.
11. Y. Lin and S. Tanaka, Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, **69**(6): p. 627-642. 2006.
12. O.J. Sanchez and C.A. Cardona, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol*, **99**(13): p. 5270-5295. 2008.
13. M.S. Graboski, *Fossil Energy Use in the Manufacture of Corn Ethanol*. Colorado: Colorado School of Mines. 2002.
14. J. Zaldivar, J. Nielsen, and L. Olsson, Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol*, **56**(1-2): p. 17-34. 2001.
15. A.E. Farrell, R.J. Plevin, B.T. Turner, A.D. Jones, M. O'Hare, and D.M. Kammen, Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. *Science*, **311**(5760): p. 506-508. 2006.
16. A. Saballos, *Development and Utilization of Sorghum as a Bioenergy Crop*, in *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*, W. Vermeir, Editor 2008, Springer New York. p. 211-248.
17. F.J. Davila-Gomez, C. Chuck-Hernandez, E. Perez-Carrillo, W.L. Rooney, and S.O. Serna-Saldivar, Evaluation of bioethanol production from five different varieties of sweet and forage sorghums (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Industrial Crops and Products*, **33**(3): p. 611-616. 2011.
18. T. Tew, R. Cobill, and E. Richard, Evaluation of Sweet Sorghum and Sorghum x Sudangrass Hybrids as Feedstocks for Ethanol Production. *BioEnergy Research*, **1**(2): p. 147-152. 2008.
19. R.W. Bentley, Global oil & gas depletion: an overview. *Energy Policy*, **30**(3): p. 189-205. 2002.

20. OECD and IEA, *World Energy Outlook 2010*. Paris: International Energy Agency. 2010.
21. C.J. Van der Veen, *Oil's history of booms and busts: towards the ultimate downturn*. BPRC Report No. 21. Columbus, Ohio: Byrd Polar Research Center. 2006; 46.
22. J. Terradas, T. Franquesa, M. Parés, and L. Chaparro, *Ecología Urbana. Investigación y ciencia*, **422**: p. 52-60. 2011.
23. OECD and IEA, *World Energy Outlook 2011*. Paris: International Energy Agency. 2011; 666.
24. A. André, *Oil and Population, Peak oil Primer*. 2010.
25. BP, *Statistical Review of World Energy 2012*. UK: bp. 2012.
26. Energy Information Administration, *Annual Average Imported Crude Oil Price*. junio 2013 ed. Estados Unidos de Norte América: EIA. 2013.
27. M. Tsoskounoglou, G. Ayerides, and E. Tritopoulou, The end of cheap oil: Current status and prospects. *Energy Policy*, **36**(10): p. 3797-3806. 2008.
28. Estados Unidos Mexicanos and Secretaria de Energía, *Lista de combustibles que se considerarán para identificar a los usuarios con un patrón de alto consumo, así como sus factores para determinar las equivalencias en términos de barriles equivalentes de petróleo*. México DF: Diario Oficial de la Federación. 2010; 23-27.
29. M.K. Hubbert, Energy from fossil fuels. *Science*, **109**: p. 103-109. 1949.
30. K.S. Deffeyes, *Hubbert's peak : the impending world oil shortage*. [New ed.]. ed. Princeton, N.J.: Princeton University Press. 2009.
31. I.S. Nashawi, A. Malallah, and M. Al-Bisharah, Forecasting World Crude Oil Production Using Multicyclic Hubbert Model. *Energy & Fuels*, **24**(3): p. 1788-1800. 2010.
32. P. Tans and R. Keeling, *Mauna Loa monthly mean data*. julio 2013 ed. Hawaii: Earth System Research Laboratory. 2013.
33. Semarnat and INE, *Inventario nacional de emisiones 2002*, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales; Instituto Nacional de Ecología: México DF.
34. Environmental Protection Agency. *Environmental protection agency, glossary of climate change terms*. 2011 [cited 2012 04 Junio]; Available from: <http://www.epa.gov/climatechange/glossary.html> - weather.
35. M.E. Hofmann, J. Hinkel, and M. Wrobel, Classifying knowledge on climate change impacts, adaptation, and vulnerability in Europe for informing adaptation research and decision-making: A conceptual meta-analysis. *Global Environmental Change*: p. 1106-1116. 2011.
36. E. Palazuelos, The role of transnational companies as oil suppliers to the United States. *Energy Policy*: p. 4064-4075 2010.
37. Öko-Institut and IFEU, *Sustainable Bioenergy: Current Status and Outlook*. Darmstadt, Heidelberg: THE FEDERAL ENVIRONMENT AGENCY. 2009.
38. Comisión Intersecretarial de Cambio Climático, *Quinta comunicación nacional ante la convención marco de las naciones unidas sobre el cambio climático*. primera ed. México DF: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 2012; Vol. 1, 189-246.
39. G. Sandoval, *Biocombustibles avanzados en México estado actual y perspectivas*. 2010 ed. Cuadernos temáticos sobre Bioenergía, ed. O.M. Cerutti. Morelia: Red Mexicana de Bioenergía. 2010; 36.
40. R.E.H. Sims, A. Hastings, B. Schlamadinger, G. Taylor, and P. Smith, Energy crops: current status and future prospects. *Global Change Biology*, **12**(11): p. 2054-2076. 2006.
41. L.M. Delserone, Sorghum. *Journal of Agricultural & Food Information*, **8**(1): p. 9-14. 2007.

42. M. Kim and D. Day, Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **38**(7): p. 803-807. 2011.
43. B.R. Reddy, S.; Reddy, P. S; Ramaiah, B; Salimath, P M; Rajashekar, Kachapur; , Sweet Sorghum – A Potential Alternate Raw Material for Bio-ethanol and Bio- energy. *Journal of SAT Agricultural Research*, **Vol. 1**: p. 79-86. 2005.
44. Food Security Department, *SORGHUM: Post-harvest Operations*, ed. Danilo Mejia and Beverly Lewis. Kent, England: Natural Resources Institute. 1999; 1-3.
45. S. Chohnan, M. Nakane, M.H. Rahman, Y. Nitta, T. Yoshiura, H. Ohta, and Y. Kurusu, Fuel ethanol production from sweet sorghum using repeated-batch fermentation. *J Biosci Bioeng*, **111**(4): p. 433-436. 2011.
46. S. Haghighi Mood, A. Hossein Golfeshan, M. Tabatabaei, G. Salehi Jouzani, G.H. Najafi, M. Gholami, and M. Ardjmand, Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **27**(0): p. 77-93. 2013.
47. E. Billa, D.P. Koullas, B. Monties, and E.G. Koukios, Structure and composition of sweet sorghum stalk components. *Industrial Crops and Products*, **6**(3–4): p. 297-302. 1997.
48. c.v. Seshaiyah, Evaluation of Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) moench) Bagasse by Chemical, in sacco and in vivo Techniques in Graded Murrah Buffalo Bulls. *J. Vet. Adv.*, **2**(8): p. 418-423. 2012.
49. Y.L. Zhao, Y. Steinberger, M. Shi, L.P. Han, and G.H. Xie, Changes in stem composition and harvested produce of sweet sorghum during the period from maturity to a sequence of delayed harvest dates. *Biomass and Bioenergy*, **39**(0): p. 261-273. 2012.
50. E.M. Rubin, Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, **454**(7206): p. 841-845. 2008.
51. C.T. Brett and K.W. Waldron, *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*: Springer. 1996.
52. M. Barroso, Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. Undergraduate thesis, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 2010.
53. R.M. Brown, Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **42**(3): p. 487-495. 2004.
54. B.B. Buchanan and W.G.R.L.J. B. B. Buchanan, *Biochemistry And Molecular Biology Of Plants*: I.K. International Publishing House Pvt. Limited. 2007.
55. N. Lavoine, I. Desloges, A. Dufresne, and J. Bras, Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*, **90**(2): p. 735-764. 2012.
56. L.J. Cuervo, Folch; Rosa, Estela;, Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *BioTecnología*, **13**: p. 11-25. 2009.
57. B. Saha, Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **30**(5): p. 279-291. 2003.
58. P. Harmsen, W. Huijgen, L. Bermudez, and R. Bakker, *Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass*. Report / Wageningen UR, Food & Biobased Research;1184. Wageningen: Wageningen UR, Food & Biobased Research. 2010.
59. W. Vermerris, *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*,. New York: Springer. 2008.
60. Facultad de Química UNAM, *Hoja de seguridad XII etanol*, 2010, UNAM.

61. C.A. Ramírez Triana, Energetics of Brazilian ethanol: Comparison between assessment approaches. *Energy Policy*, **39**(8): p. 4605-4613. 2011.
62. International Energy Agency, *Technology Roadmap, Biofuels for Transport*. Paris: IEA. 2011; 56.
63. ethanolhistory.com. *Ethanol car history 2010 2011* [cited 2012 01 junio 2012]; Available from: <http://www.ethanolhistory.com/>.
64. A. Demirbas, Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, **49**(8): p. 2106-2116. 2008.
65. B. Knight and A. Westwood, World biomass review: Biomass as a global power source. *Refocus*, **5**(6): p. 42-44. 2004.
66. O. De Smidt, J.C. Du Preez, and J. Albertyn, The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS Yeast Research*, **8**(7): p. 967-978. 2008.
67. J. DiPardo, *Outlook for Biomass Ethanol Production and Demand*. U.S: Energy Information Administration 2007; 14.
68. B. Vidal, Jr., B. Dien, K.C. Ting, and V. Singh, Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion—A Review. *Appl Biochem Biotechnol*, **164**(8): p. 1405-1421. 2011.
69. M. Galbe and G. Zacchi, Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, **46**(0): p. 70-78. 2012.
70. 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. *Bioresource Technology*, **101**(13): p. 4851-4861. 2010.
71. R. Chandra, H. Takeuchi, and T. Hasegawa, Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**(3): p. 1462-1476. 2012.
72. X. Yaoyang and W.J. Boeing, Mapping biofuel field: A bibliometric evaluation of research output. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **28**(0): p. 82-91. 2013.
73. A. Pandey, C. Larroche, S. Ricke, C.-G. Dussap, and E. Gnansounou, *Biofuels - Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 2011, Elsevier. p. 229,250.
74. B. Henrissat, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical journal*, **280 (Pt 2)**: p. 309-316. 1991.
75. L. Rosgaard, P. Andric, K. Dam-Johansen, S. Pedersen, and A. Meyer, Effects of Substrate Loading on Enzymatic Hydrolysis and Viscosity of Pretreated Barley Straw. *Appl Biochem Biotechnol*, **143**(1): p. 27-40. 2007.
76. Danisco US Inc, *Accellerase 1500, Cellulase Enzyme Complex for Lignocellulosic Biomass Hydrolysis.*, 2009, GENENCOR: USA. p. 2.
77. T. Kawai, H. Nakazawa, N. Ida, H. Okada, S. Tani, J.-i. Sumitani, T. Kawaguchi, W. Ogasawara, Y. Morikawa, and Y. Kobayashi, Analysis of the saccharification capability of high-functional cellulase JN11 for various pretreated biomasses through a comparison with commercially available counterparts. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **39**(12): p. 1741-1749. 2012.
78. R.A. Copeland, *Enzymes*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2002.
79. A.L. Lehninger, D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Principios de bioquímica Lehninger*, ed. 5: Ediciones Omega, S.A. 2009.
80. J.G.V. Donald Voet and J.G. Voet, *Fundamentos De Bioquímica*. Buenos Aires: Médica panamericana. 2006; Vol. 1.

81. H. Azevedo, D. Bishop, and A. Cavaco-Paulo, Possibilities for recycling cellulases after use in cotton processing. *Appl Biochem Biotechnol*, **101**(1): p. 61-75. 2002.
82. K. Olofsson, M. Bertilsson, and G. Liden, A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels*, **1**(1): p. 7. 2008.
83. N. Dowe and J. McMillan, *SSF Experimental Protocols — Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation*, 2008, National Renewable Energy Laboratory: Colorado. p. 19.
84. H. Chen, Y. Han, and J. Xu, Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochemistry*, **43**(12): p. 1462-1466. 2008.
85. A. Wingren, M. Galbe, and G. Zacchi, Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology progress*, **19**(4): p. 1109-1117. 2003.
86. TAPPI, T 264 cm-07 Preparation of wood for chemical analysis. *TAPPI standards methods*: p. 4. 2007.
87. TAPPI, T 222 om-06 Acid-insoluble lignin in wood and pulp. *TAPPI standards methods*: p. 5. 2006.
88. R.L. Whistler, M.L. Wolfrom, and J.N. BeMiller, *Methods in Carbohydrate Chemistry: Cellulose*: Academic Press. 1963.
89. TAPPI, T 203 cm-99 Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp. *TAPPI standards methods*: p. 5. 1999.
90. W. Cao, C. Sun, R. Liu, R. Yin, and X. Wu, Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technology*, **111**(0): p. 215-221. 2012.
91. G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, **31**(3): p. 426-428. 1959.
92. M.B. Williams and H.D. Reese, Colorimetric Determination of Ethyl Alcohol. *Analytical Chemistry*, **22**(12): p. 1556-1561. 1950.
93. B. Hahn-Hägerdal, Ethanol fermentation of lignocellulose hydrolysates. *Appl Biochem Biotechnol*, **57-58**(1): p. 195-199. 1996.
94. F. Uicab, Pretratamiento ácido y sacarificación enzimática del bagazo de henequen, estudio de los azúcares liberados en el proceso. Master thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, 2011.
95. M. Cáceres-Farfán, P. Lappe, A. Larqué-Saavedra, A. Magdub-Méndez, and L. Barahona-Pérez, Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) juice and molasses by a mixture of two yeasts. *Bioresource Technology*, **99**(18): p. 9036-9039. 2008.
96. P. Villegas, Evaluación del rendimiento de etanol producido por *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* a partir de hidrolizados ácidos y enzimáticos de jugo de hojas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Master Thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, Mérida, 2011.
97. C. Webb and S.P. Kamat, Improving fermentation consistency through better inoculum preparation. *World J Microbiol Biotechnol*, **9**(3): p. 308-312. 1993.
98. K. Hoyer, M. Galbe, and G. Zacchi, Effects of enzyme feeding strategy on ethanol yield in fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce at high dry matter. *Biotechnology for Biofuels*, **3**(1): p. 14. 2010.
99. V. Lezinou, P. Christakopoulos, D. Kekos, and B.J. Macris, Simultaneous saccharification and fermentation of sweet sorghum carbohydrates to ethanol in a fed-batch process. *Biotechnol Lett*, **16**(9): p. 983-988. 1994.

100. F. Shen, J. Hu, Y. Zhong, M.L.Y. Liu, J.N. Saddler, and R. Liu, Ethanol production from steam-pretreated sweet sorghum bagasse with high substrate consistency enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, **41**(0): p. 157-164. 2012.
101. W.J. Polglase, *Polysaccharides Associated with Wood Cellulose*, in *Advances in Carbohydrate Chemistry*, L.W. Melville, Editor 1955, Academic Press. p. 283-333.
102. Z. Wang, D.R. Keshwani, A.P. Redding, and J.J. Cheng, Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Biological Systems Engineering: Papers and Publications.*, **143**: p. 3. 2010.
103. S.P. Parker, *McGraw-Hill dictionary of scientific and technical terms*: McGraw-Hill. 2003.
104. Z. Ying, M. Bas, C. Leon, and J.P. Peter, Inhibitory Compounds in Lignocellulosic Biomass Hydrolysates during Hydrolysate Fermentation Processes. *Bioprocessing and Biotechniques*, **2**(1): p. 11. 2012.
105. R.H. De Deken, The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of general microbiology*, **44**(2): p. 149-156. 1966.
106. G.M. Walker, *Yeast Physiology and Biotechnology*: Wiley. 1998.
107. J. Arrizon and A. Gschaedler, Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**(11): p. 965-970. 2002.
108. C. Hatzis, C. Riley, and G. Philippidis, Detailed material balance and ethanol yield calculations for the biomass-to-ethanol conversion process. *Appl Biochem Biotechnol*, **57-58**(1): p. 443-459. 1996.
109. A.A. Modenbach and S.E. Nokes, Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. *Biomass and Bioenergy*, **56**(0): p. 526-544. 2013.
110. L. Wang, Z. Luo, and A. Shahbazi, Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) bagasse using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, **42**(0): p. 280-291. 2013.
111. W. Zhang, Y. Lin, Q. Zhang, X. Wang, D. Wu, and H. Kong, Optimisation of simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw for ethanol production. *Fuel*, **112**(0): p. 331-337. 2013.

ANEXO 1

Determinación de Azúcares Reductores

La curva de calibración de azúcares reductores se obtuvo graficando el promedio de las absorbancias (de tres repeticiones) y las concentraciones probadas. Se utilizó glucosa como estándar.

Preparación del reactivo de DNS y determinación de azúcares reductores.

Reactivo de DNS

Se requieren los siguientes reactivos en su orden respectivo:

- Tartrato de sodio y potasio $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Fenol $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Meta bisulfito de sodio $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Hidróxido de sodio $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Disolver los reactivos en 600 mL de agua destilada, al final agregar el DNS poco a poco hasta lograr una completa disolución, aforar a un litro.

Para determinar los azúcares reductores se añaden 1.5 mL de la solución DNS a 0.5 mL de la solución problema (jugo crudo homogenizado o jugo hidrolizado), se agita y se coloca en un baño María a punto de ebullición durante 15 minutos, se enfría a temperatura ambiente y se agregan 8 mL de agua destilada, se agita y se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Esto se realiza por triplicado. La cantidad de azúcares reductores se obtiene al comparar la el promedio de las lecturas absorbancia obtenidas con una curva de calibración. Curva de calibración de dextrosa: Se obtiene al graficar la absorbancia de soluciones de dextrosa con un rango de concentración 0.1 a $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ contra concentración.

Determinación de Etanol

La curva de calibración de etanol se obtuvo graficando el promedio de las absorbancias (de tres repeticiones) y las concentraciones probadas. Se utilizó etanol anhidro como estándar.

Preparación del reactivo de dicromato de potasio y determinación de etanol.

Reactivos

- Dicromato de potasio $36.76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Ácido sulfúrico 325 mL

Se diluye el ácido sulfúrico en 400 mL de agua destilada, se deja enfriar y se agrega el dicromato diluido en 200 mL de agua destilada, se afora a un litro.

A 1 mL de muestra se agregan 2 mL de solución de dicromato de potasio y se agita, se deja reposar durante 10 minutos, se agregan 5 mL de agua destilada, se agita y se lee en espectrofotómetro a 585 nm (por triplicado).

La cantidad de etanol presente en la muestra se obtiene al comparar el promedio de las lecturas absorbancia obtenidas con una curva de calibración de etano. Curva de calibración de etanol: Se obtiene al graficar la absorbancia de soluciones de etanol con un rango de concentración 2 a $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ contra concentración. La densidad del etanol es de $0.789 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$.