



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Tecnológico Nacional de México

**Centro Nacional de Investigación
y Desarrollo Tecnológico**

Tesis de Maestría

**Pretratamiento de la biomasa para producir
bioetanol de segunda generación**

presentada por

Ing. Arturo Figueroa Arcos

como requisito para la obtención del grado de

**Maestra en Ciencias en Ingeniería
Electrónica**

Directora de tesis

Dr. Víctor Manuel Alvarado Martínez

Codirector de tesis

Dra. Ma. Guadalupe López López

Cuernavaca, Morelos, México. Junio de 2023.

Cuernavaca, Mor., **09/junio/2023**
No. de Oficio: **DIE/054/2023**
Asunto: **Aceptación de documentos de tesis**

DR. CARLOS MANUEL ASTORGA ZARAGOZA
SUBDIRECTOR ACADÉMICO
PRESENTE

Por este conducto, los integrantes de Comité Tutorial del C. Ing. Arturo Figueroa Arcos, con número de control M21CE032 de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Electrónica, le informamos que hemos revisado el trabajo de tesis profesional titulado "Pretratamiento de la Biomasa para producir Bioetanol de segunda generación" y hemos encontrado que se han realizado todas las correcciones y observaciones que se le indicaron, por lo que hemos acordado aceptar el documento de tesis y le solicitamos la autorización de impresión definitiva.


DIRECTOR DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Alvarado Martínez
Doctor en Ciencias en Ingeniería
Electrónica
Cédula profesional 8031070

CODIRECTOR DE TESIS 

Dra. Ma. Guadalupe López López
Doctora en Ciencias en Ingeniería
Química
Cédula profesional 7980045


REVISOR 1

Dr. Manuel Adam Medina
Doctora en Ciencias en Ingeniería
Electrónica
Cédula profesional 5992003

REVISOR 2



Dr. José Francisco Gómez Aguilar
Doctor en Física
Cédula profesional 9124781

C.p. M.T.I. María Elena Cómez Torres, Jefa del Departamento de Servicios Escolares
Estudiante
JGM/kmqh



Cuernavaca, Mor.,
No. De Oficio:
Asunto:

13/junio/2023
SAC/112/2023
Autorización de
impresión de tesis

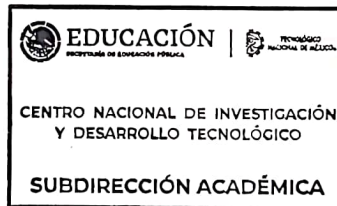
ARTURO FIGUEROA ARCOS
CANDIDATO AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA ELECTRÓNICA
P R E S E N T E

Por este conducto, tengo el agrado de comunicarle que el Comité Tutorial asignado a su trabajo de tesis titulado **“Pretratamiento de la Biomasa para producir Bioetanol de segunda generación”**, ha informado a esta Subdirección Académica, que están de acuerdo con el trabajo presentado. Por lo anterior, se le autoriza a que proceda con la impresión definitiva de su trabajo de tesis.

Esperando que el logro del mismo sea acorde con sus aspiraciones profesionales, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

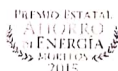
Excelencia en Educación Tecnológica®
“Conocimiento y tecnología al servicio de México”



CARLOS MANUEL ASTORGA ZARAGOZA
SUBDIRECTOR ACADÉMICO

C. c. p. Departamento de Ingeniería Electrónica
Departamento de Servicios Escolares

CMAZ/LMZ



Dedicatoria

Dedicado a mis padres y hermano que fueron de gran apoyo durante la realización de esta tesis y a mi novia por animarme a superarme estudiando un posgrado.

Muchas gracias.

Agradecimientos

Al centro Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CENIDET) y los docentes que gracias a sus conocimientos y enseñanzas me llevaron a este logro de cursar un posgrado en Ciencias en Ingeniería Electrónica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado por medio de una beca de posgrado, que me facilitó dedicarme a tiempo completo a la maestría.

A mis directores de tesis: Dr. Víctor Manuel Alvarado Martínez y Dra. Ma. Guadalupe López López, por su apoyo, paciencia, conocimientos, confianza y compromiso que me brindaron en el desarrollo de este trabajo de tesis y que sirvió para tomar el camino correcto con las mejores decisiones.

A mis revisores: Dr. Manuel Adam Medina y Dr. Jose Francisco Gómez Aguilar por su tiempo, disponibilidad, comentarios y aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A mi asesor y amigo Dr. Eden Ocegüera Contreras por brindarme su tiempo, conocimientos, material, atenciones y su amistad durante mi estancia en CuValles.

A mi compañera y amiga de laboratorio Emily por brindarme ayuda y buenos momentos durante mi estancia.

A mis compañeros y amigos de generación de maestría: Janeth, Miguel, Ricardo G. y Ricardo R. por los momentos que vivimos y apoyo que nos dimos durante nuestro posgrado.

A mis padres y hermano de los cuales recibí su apoyo en los momentos que lo necesite, gracias a su ayuda esto no hubiera sido posible.

A mi novia, por su motivación durante la maestría, por animarme a probar nuevos retos y confiando en mis habilidades. Gracias por tu apoyo.

Resumen

En este trabajo se presenta el proceso de producción de bioetanol de segunda generación. Se hace un estudio de las diferentes etapas que intervienen, desde el pretratamiento de la biomasa hasta la fermentación para obtener etanol como producto final, la biomasa utilizada como caso de estudio fue el bagazo de caña de azúcar debido a la disponibilidad dentro del estado de Morelos.

El enfoque principal es experimentalmente plantear las condiciones de operación en cada etapa a nivel laboratorio con el fin de ubicar las principales variables y como la manipulación de estas afectan los resultados. La biomasa se sometió a tres pretratamientos distintos para evaluar su efectividad y se probaron dos configuraciones de sistema de producción, la primera por etapas separadas y la segunda por etapas simultáneas.

Se analizó el impacto de las variables en diferentes escenarios utilizando un diseño de experimentos con el objetivo de determinar los lazos de control y la instrumentación adecuada que permita obtener un mayor aprovechamiento en la producción.

Abstract

In this work, the second generation bioethanol production process was presented. A study is made of the different stages involved, from biomass pretreatment to fermentation to obtain ethanol as the final product. The biomass used as a case study was sugarcane bagasse due to its availability in the state of Morelos.

The main approach is to experimentally pose the operating conditions at each stage at laboratory level in order to locate the main variables and how the manipulation of these affect the results. The biomass was subjected to three different pretreatments to evaluate their effectiveness and two production system configurations were tested, the first by separate stages and the second by simultaneous stages.

The impact of the variables in different scenarios was analyzed using a design of experiments with the objective of determining the control loops and the appropriate instrumentation to obtain a higher production yield.

Índice general

| | |
|--|-----------|
| Índice general | XI |
| Índice de figuras | XIII |
| Índice de tablas | XV |
| Nomenclatura | XVI |
| 1. Introducción | 18 |
| 1.1. Planteamiento del problema | 19 |
| 1.2. Objetivos | 19 |
| 1.2.1. General | 19 |
| 1.2.2. Específicos | 20 |
| 1.3. Metas | 20 |
| 1.4. Alcances | 20 |
| 1.5. Limitaciones | 21 |
| 1.6. Estado del arte | 21 |
| 1.6.1. Conclusión del estado del arte | 23 |
| 1.7. Hipótesis | 24 |
| 1.8. Metodología | 24 |
| 2. Marco Teórico | 26 |
| 2.1. Bioetanol | 26 |
| 2.2. Clasificación de bioetanol | 26 |
| 2.2.1. Bioetanol de primera generación | 26 |
| 2.2.2. Bioetanol de segunda generación | 27 |
| 2.2.3. Bioetanol de tercera generación | 27 |
| 2.3. Biomasa de segunda generación | 27 |
| 2.4. Producción de bioetanol de segunda generación | 29 |
| 2.5. Pretratamiento de biomasa | 29 |
| 2.5.1. Pretratamiento mecánico | 30 |
| 2.5.2. Pretratamiento biológico | 31 |
| 2.5.3. Pretratamiento químico | 31 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.5.4. | Pretratamiento fisicoquímico | 31 |
| 2.6. | Hidrólisis enzimática | 32 |
| 2.7. | Fermentación alcohólica | 32 |
| 2.8. | Configuraciones de producción | 33 |
| 2.8.1. | Hidrólisis y Fermentación Secuenciales (HFS) | 34 |
| 2.8.2. | Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS) | 34 |
| 2.8.3. | Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (SCFS) | 34 |
| 2.8.4. | Bioproceso Consolidado (BPC) | 35 |
| 2.9. | Conclusiones del capítulo | 35 |
| 3. | Caso de estudio | 36 |
| 3.1. | Materia prima | 36 |
| 3.2. | Pretratamientos propuestos | 38 |
| 3.2.1. | Pretratamiento mecánico | 38 |
| 3.2.2. | Pretratamientos químico y biológico | 38 |
| 3.3. | Configuraciones de bloques en el proceso | 39 |
| 3.3.1. | Hidrólisis y Fermentación Separadas (HFS) | 39 |
| 3.3.2. | Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS) | 41 |
| 3.4. | Cultivo de levaduras | 42 |
| 3.5. | Conclusiones del capítulo | 43 |
| 4. | Pruebas experimentales | 44 |
| 4.1. | Acondicionamiento de biomasa | 44 |
| 4.2. | Pretratamiento de biomasa | 44 |
| 4.2.1. | Pretratamiento mecánico | 45 |
| 4.2.2. | Pretratamiento ácido | 46 |
| 4.2.3. | Pretratamiento álcali | 49 |
| 4.2.4. | Pretratamiento biológico | 52 |
| 4.3. | Separación de fracciones | 54 |
| 4.4. | Enjuagado de fracción sólida | 55 |
| 4.5. | Secado | 57 |
| 4.6. | Hidrólisis enzimática | 57 |
| 4.6.1. | Hidrólisis con acondicionamiento sin buffer | 59 |
| 4.6.2. | Hidrólisis con acondicionamiento con buffer. | 61 |
| 4.7. | Fermentación alcohólica | 63 |
| 4.8. | Configuración SFS | 65 |
| 4.9. | Lectura de producto final | 68 |
| 4.9.1. | Conclusiones del capítulo | 69 |

| | |
|--|-----------|
| 5. Resultados | 70 |
| 5.1. Etanol obtenido por pretratamiento | 70 |
| 5.1.1. Configuración HFS | 70 |
| 5.1.2. Configuración SFS | 71 |
| 5.2. Manipulación de variables en etapas separadas | 72 |
| 5.2.1. Temperatura en pretratamiento | 72 |
| 5.2.2. Efecto del pH durante la hidrólisis enzimática | 73 |
| 5.3. Manipulación de variables en etapas simultáneas | 74 |
| 5.4. Variables en etapas del proceso | 76 |
| 5.4.1. Etapas separadas | 76 |
| 5.4.2. Etapas simultáneas | 77 |
| 5.4.3. Objetivos de control | 78 |
| 5.5. Evaluación de costo del proceso experimental | 80 |
| 5.5.1. Costo total de reactivos en pretratamiento | 80 |
| 5.5.2. Costo total de reactivos en hidrólisis enzimática | 80 |
| 5.5.3. Costo total de reactivos en fermentación alcohólica | 81 |
| 5.5.4. Costo total por pretratamiento | 81 |
| | |
| 6. Conclusiones | 83 |
| 6.1. Conclusiones generales | 83 |
| 6.2. Aportaciones | 84 |
| 6.3. Trabajos futuros | 85 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| 2.1. Clasificación de biomasa de segunda generación. | 27 |
| 2.2. Estructura de la biomasa lignocelulósica. | 28 |
| 2.3. Etapas generales en el proceso de producción de bioetanol. | 29 |
| 2.4. Efecto del pretratamiento sobre la biomasa de segunda generación. | 30 |
| 2.5. Clasificación de pretratamientos para la biomasa lignocelulósica. | 30 |
| 2.6. Configuraciones para realizar procesos simultáneos en etapas de hidrólisis y fermentación | 33 |
| 3.1. Producción agrícola México 2021 | 36 |
| 3.2. Producción agrícola en el estado de Morelos y en Ameca, Jalisco. | 37 |
| 3.3. Bloques del proceso en configuración HFS | 40 |
| 3.4. Proceso en configuración SFS | 42 |
| 4.1. Secado de biomasa en horno de aire caliente. | 44 |
| 4.2. Secuencia de etapas en el proceso de pretratamiento de BLC. | 45 |
| 4.3. Molienda y tamizado de bagazo seco. | 45 |
| 4.4. Preparación de solución con H ₂ SO ₄ al 5 % (v/v). | 47 |
| 4.5. Solución en agitador magnético y lectura de temperatura. | 48 |
| 4.6. Incorporación de carga de bagazo al 4 % (p/v). | 48 |
| 4.7. Pretratamiento ácido diluido. | 49 |
| 4.8. Preparación de solución con NaOH al 2 % (p/v). | 50 |
| 4.9. NaOH disuelto en agitador magnético e incremento de temperatura en solución álcali. | 50 |
| 4.10. Incorporación de carga de bagazo al 4 % (p/v). | 51 |
| 4.11. Pretratamiento álcali diluido. | 51 |
| 4.12. Humus de lombriz de tierras lixiviadas. | 52 |
| 4.13. Acondicionamiento de medio anaerobio. | 53 |
| 4.14. Pretratamiento biológico en cámara de incubación. | 53 |
| 4.15. Pretratamiento biológico en cámara de incubación. | 54 |
| 4.16. Filtración de biomasa proveniente de pretratamiento a) álcali, b) ácido y c) biológico. | 55 |
| 4.17. Enjuagado de bagazo posterior a la separación de fracciones. | 56 |
| 4.18. Filtrado de bagazo posterior al enjuagado. | 56 |

| | |
|--|----|
| 4.19. Bagazo filtrado y enjuagado después de pretratamiento a) álcali, b) ácido y c) biológico. | 56 |
| 4.20. Secado de biomasa en horno de aire caliente. | 57 |
| 4.21. Secuencia de etapas del proceso hasta la hidrólisis enzimática. | 57 |
| 4.22. Enzimas celulasas y hemicelulasas Cellic Ctec 2. | 58 |
| 4.23. Medición de pH antes de hidrólisis. | 59 |
| 4.24. Ajuste de pH sin solución buffer. | 59 |
| 4.25. Toma de carga enzimática usando micropipeta. | 60 |
| 4.26. Incorporación de carga enzimática. | 60 |
| 4.27. Incorporación de carga enzimática. | 61 |
| 4.28. Solución buffer. | 61 |
| 4.29. Medición de pH usando buffer. | 62 |
| 4.30. Medición de pH usando buffer. | 62 |
| 4.31. Secuencia de etapas hasta la fermentación alcohólica. | 63 |
| 4.32. Toma de muestra de hidrolizado con probeta. | 64 |
| 4.33. Inoculación de levaduras en hidrolizado. | 64 |
| 4.34. Acondicionamiento de medio anaerobio con trampa de aire. | 64 |
| 4.35. Proceso de fermentación en incubadora. | 65 |
| 4.36. Etapas en configuración SFS. | 65 |
| 4.37. Acondicionamiento de pH para proceso SFS. | 67 |
| 4.38. Acondicionamiento de medio anaerobio en proceso SFS. | 67 |
| 4.39. Proceso de SFS en cámara de incubación. | 67 |
| 4.40. Refractómetro para medir volumen de alcohol. | 68 |
| 4.41. Uso de refractómetro para medir el volumen de alcohol. | 68 |
| 5.1. Producción de etanol por pretratamiento y uso de solución buffer. | 71 |
| 5.2. Producción de etanol por pretratamiento usando una configuración SFS. | 71 |
| 5.3. Producción de etanol por pretratamiento usando una configuración SFS. | 73 |
| 5.4. Efecto del pH durante la hidrólisis enzimática. | 74 |
| 5.5. Efecto de la temperatura durante la configuración de sacarificación y fermentación simultáneas. | 75 |
| 5.6. Variables en proceso HFS. | 76 |
| 5.7. Variables en proceso SFS | 77 |
| 5.8. Variables en reactor batch. | 78 |
| 5.9. Diagrama de control de temperatura en biorreactor. | 79 |
| 5.10. Diagrama de control de pH en biorreactor. | 79 |

Índice de tablas

| | | |
|------|---|------|
| 1. | Símbolos | XVI |
| 2. | Siglas, acrónimos y fórmulas químicas | XVII |
| 3.1. | Composición promedio de la BLC derivada de la caña de azúcar (% en peso seco) | 37 |
| 3.2. | Pretratamiento mecánico para reducción de biomasa | 38 |
| 3.3. | Parámetros utilizados por los autores en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar | 39 |
| 3.4. | Parámetros propuestos en hidrólisis enzimática haciendo uso de Cellic Ctec 2 | 40 |
| 3.5. | Parámetros propuestos en fermentación alcohólica usando levadura | 41 |
| 3.6. | Parámetros propuestos en hidrólisis y fermentación simultánea usando Cellic Ctec2 | 41 |
| 3.7. | Composición de medio YPD para cultivo de levaduras | 42 |
| 4.1. | Selección de tamaño de partícula en relación con la agitación en el proceso | 46 |
| 4.2. | Selección de la carga de bagazo durante los pretratamientos químicos | 47 |
| 4.3. | Condiciones experimentales de pretratamiento ácido diluido | 49 |
| 4.4. | Condiciones experimentales de pretratamiento álcali diluido | 51 |
| 4.5. | Condiciones experimentales de pretratamiento biológico | 54 |
| 4.6. | Condiciones experimentales en hidrólisis sin uso de solución buffer | 61 |
| 4.7. | Condiciones experimentales en hidrólisis usando solución buffer | 62 |
| 4.8. | Condiciones experimentales de fermentación alcohólica | 65 |
| 4.9. | Condiciones experimentales de configuración SFS | 68 |
| 5.1. | Pretratamiento con NaOH utilizando tres niveles de temperatura | 72 |
| 5.2. | Hidrólisis bajo dos cargas enzimáticas en biomasa pretratada con NaOH a diferentes temperaturas | 72 |
| 5.3. | Manipulación de pH en hidrólisis enzimática | 73 |
| 5.4. | Manipulación de temperatura en configuración SFS | 75 |
| 5.5. | Rango de condiciones obtenidas experimentalmente en proceso HFS | 76 |
| 5.6. | Rango de condiciones obtenidas experimentalmente en proceso SFS | 77 |
| 5.7. | Costo de reactivos utilizados en pretratamiento | 80 |
| 5.8. | Costo de reactivos usados por pretratamiento en un volumen de 1 L | 80 |

| | |
|---|----|
| 5.9. Costo de reactivos utilizados en hidrólisis enzimática | 80 |
| 5.10. Costo de reactivos en la hidrólisis enzimática usando un volumen de 600 ml . | 81 |
| 5.11. Costo de reactivos utilizados en fermentación alcohólica | 81 |
| 5.12. Costo total de reactivos usados en el proceso de fermentación usando un volumen total de 600 ml | 81 |
| 5.13. Costo total de reactivos utilizados en la producción por cada pretratamiento | 81 |

Nomenclatura

Tabla 1: Símbolos

| Símbolo | Descripción | Unidades |
|------------------|---|----------|
| $\% v/v$ | Relación en porcentaje entre el volumen de soluto y volumen de solución | ml |
| $\% p/v$ | Relación en porcentaje entre el peso de soluto y volumen de solución | g |
| ρ | Densidad | m/v |
| VR_{acido} | Volumen de reactivo ácido | ml |
| C_{acido} | Concentración de reactivo ácido | % |
| V_{total} | Volumen total de solución | ml |
| $C_{biomasa}$ | Carga de biomasa | g |
| $C_{porcentaje}$ | Concentración de carga de biomasa | % |
| $V_{solucion}$ | Volumen total de solución | ml |
| PR_{alcali} | Peso de reactivo alcalino | g |
| C_{alcali} | Concentración de reactivo alcalino | % |
| P_{humus} | Peso de sustrato biológico | g |
| CP_{humus} | Concentración de sustrato biológico | % |

Tabla 2: Siglas, acrónimos y fórmulas químicas

| Siglas | Descripción |
|--|--|
| BLC | Biomasa Lignocelulósica |
| SAGARPA | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural |
| HFS | Hidrólisis y Fermentación Separada |
| SFS | Sacarificación y Fermentación Simultáneas |
| SCFS | Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas |
| BPC | Bio-Procesamiento Consolidado |
| UPF | Unidades Papel Filtro |
| CUCBA | Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias |
| CUValles | Centro Universitario de los Valles |
| YPD | Extracto de levadura Peptona Dextrosa (Yeast Extract Peptone Dextrose) |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| HCL | Ácido clorhídrico |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| C ₆ H ₈ O ₇ | Ácido cítrico |

Capítulo 1

Introducción

Actualmente, se tiene una preocupación por resolver la crisis energética, así como reducir el impacto ambiental causado por los combustibles fósiles que cubren el 90 % de la demanda mundial, es por esto que durante los últimos años se han enfocado la investigación en el desarrollo de energías renovables y sostenibles, como los biocombustibles líquidos (etanol, biodiésel, etc.)

Una solución a la sobre explotación de combustibles convencionales es el bioetanol, debido a sus características no presenta un impacto en la modificación de la infraestructura de transportes. En al menos 65 países se ha impulsado la producción y consumo de bioetanol destinado para el sector transporte, con el objetivo de descarbonización del medio ambiente, la gasolina es mezclada en diferentes proporciones, lo que logra una reducción de las emisiones de CO₂. El volumen de etanol que se adiciona en la gasolina puede variar del 5 al 100 % dependiendo del país, por lo que se ha hecho un estimado que el uso generalizado de bioetanol al 10 %, podría reducir de 12 al 19 % las emisiones de gases de efecto invernadero comparado con el uso de gasolina sin mezclar (Zabed et al., 2017)(Gronchi et al., 2019).

La demanda de bioetanol incrementa cada año, por lo que se requiere el uso de materias primas alternativas para reducir el consumo de los principales cultivos frecuentemente usados, los cuales son la caña de azúcar y maíz, que representan más del 96 % de la producción total de etanol en 2020. Esta materia prima se considera de primera generación, por provenir de cultivos alimenticios, lo cual genera una fuerte competencia en el suministro de alimentos y la producción de etanol (Robak and Balcerek, 2020).

Los avances en la producción de biocombustibles de segunda generación producidos a partir de biomasa lignocelulósica, como residuos de cultivos, o pastos energéticos, han cobrado importancia debido a que la biomasa de segunda generación (bagazo de caña, paja de arroz, mazorca de maíz, paja de trigo, etc.) es una buena alternativa, ya que este tipo de biomasa es abundante, renovable y relativamente accesible (Sharma et al., 2020).

Para la producción de estos biocombustibles se necesitan tres etapas esenciales que son la rotura de la estructura rígida de la biomasa por medio de un pretratamiento, la conversión a azúcares fermentables a través de una hidrólisis y por último la fermentación de este producto, al tratarse de procesos químicos se necesita tener un conocimiento de las etapas que lo conforman así como también las condiciones de operación adecuadas en el proceso y como un cambio fuera de rango o mínimo sobre estas, puede afectar la eficiencia en el producto final.

En este documento se hace una revisión bibliográfica del proceso de conversión de bioetanol de segunda generación, desde la etapa de pretratamiento hasta la fermentación, así como las distintas configuraciones que se pueden aplicar en las etapas que lo conforman, para poder aportar una idea más clara de la metodología usada en la aplicación experimental de esta investigación.

1.1. Planteamiento del problema

Desde el punto de vista de la aplicación, el compromiso es impulsar la producción de bioetanol de segunda generación, por medio de la evaluación experimental y documentación del proceso desde la etapa de pretratamiento hasta la etapa de fermentación.

El problema de investigación es proponer los pretratamientos adecuados y condiciones de operación para el aprovechamiento de residuos agrícolas provenientes de alguno de los diferentes cultivos como el maíz, caña de azúcar, grano de sorgo, etc. Posteriormente del estudio y comprensión del proceso de producción, proponer las configuraciones aplicables para probarse de manera experimental e identificar la producción de etanol y la influencia de las variables en el proceso debido a la presencia de dos microorganismos en un mismo proceso.

Al tratarse de procesos químicos y biológicos, se requiere analizar las variables del proceso e identificar los lazos de control necesarios con el objetivo de obtener el máximo aprovechamiento de los insumos empleados.

1.2. Objetivos

1.2.1. General

- Analizar diferentes secuencias de pretratamiento de biomasa para la producción de bioetanol, especificando las condiciones de operación y los objetivos de control de un proceso de producción hasta la etapa de fermentación.

1.2.2. Específicos

- Seleccionar la biomasa y el sistema de pretratamiento para producir etanol 2G.
- Experimentalmente, obtener las características del proceso.
- Diseñar la secuencia de pretratamiento y configurar los bloques del proceso.

1.3. Metas

- Seleccionar la biomasa lignocelulósica (BLC) en la que se aplicaran uno o más pretratamientos.
- Obtener los pretratamientos que se aplicaran experimentalmente a la BLC seleccionada y determinar las condiciones de operación a nivel laboratorio.
- Establecer las configuraciones a emplear posterior a cada pretratamiento para realizar procesos separados o simultáneos durante la hidrólisis enzimática y fermentación.
- Realizar un protocolo experimental para plantear las condiciones propuestas en cada etapa del proceso (materiales, reactivos, medidas, temperaturas, etc.).
- Obtener experimentalmente a nivel laboratorio las condiciones de operación durante las etapas (pretratamiento, hidrólisis y fermentación) que presenten mejores resultados en la producción de etanol y hacer una documentación detallada del proceso.
- Realizar un diseño de experimentos a partir de los resultados obtenidos, en las variables que presentan mayor impacto sobre el proceso, con el fin de observar el efecto que se tiene en el producto final.

1.4. Alcances

En este trabajo se pretende hacer una evaluación experimental del proceso de producción de bioetanol de segunda generación e identificar las etapas del proceso. El propósito es obtener un proceso paso a paso, entender y analizar las variables que intervienen, para así poder plantear las condiciones de operación necesarias que puedan favorecer la producción final, así como también el impacto de las variables para plantear los objetivos de control.

1.5. Limitaciones

Las pruebas experimentales se realizaron a nivel laboratorio, con instrumentación, reactivos y equipo disponibles, debido a que los equipos como biorreactores son costosos y no se tiene acceso a todo lo necesario.

1.6. Estado del arte

En la literatura, se ha encontrado diversas opciones sobre el uso de pretratamientos en la biomasa de segunda generación, así como también, diferentes condiciones de operación de acuerdo con la instrumentación utilizada. En Aditiya et al. (2016) se muestra un estudio completo de los métodos de pretratamiento en materiales lignocelulósicos señalando sus principales ventajas y desventajas. Los pretratamientos químicos se señalan como los más adecuados para aplicación a escala comercial, debido a que las sustancias químicas son más baratas, fáciles de obtener, con menos problemas de almacenamiento si se hace adecuadamente y no se ven afectados por el desarrollo tecnológico. Las sustancias químicas requieren menor cantidad de energía (calorífica) para la degradación de la lignocelulosa debido a las reacciones químicas.

En Robak and Balcerek (2020) se hace una revisión profunda de los aspectos bioquímicos en la producción de bioetanol de segunda generación, centrado en las tecnologías de pretratamiento más utilizadas. Los pretratamientos utilizando álcali y en mezcla con otros agentes químicos como el H_2O_2 , son eficaces para la remoción de lignina sin afectar la celulosa, así como con el uso de organosolventes y líquidos iónicos han sido explorados a fondo con resultados favorables y eficientes. También se muestran los resultados de la influencia de la carga de sólidos, carga enzimática y velocidad de agitación durante la hidrólisis enzimática, con los cuales se obtienen rendimientos superiores al 70 % en la conversión de glucosa.

Baruah et al. (2018) muestra las condiciones de operación para los distintos pretratamientos, así como instrumentación con la que se pueden alcanzar la temperatura, presión, agitación, carga de reactivos, carga de sólidos y ambiente deseados, con el propósito de convertir lignocelulosa en productos de valor agregado, entre ellos el etanol.

De misma manera, en Alvira et al. (2010) muestra como las barreras de la composición biológica de biomasa lignocelulósica interfieren durante la etapa de hidrólisis enzimática, la cual es una etapa crucial debido a la liberación de azúcares, es por ello que se proponen diferentes técnicas de pretratamiento basadas en la descomposición efectiva de la lignina.

Suárez et al. (2019) realiza un estudio sobre el bagazo de caña de azúcar en el aprovechamiento de los residuos en la industria azucarera, debido a su estructura compleja, el pretratamiento alcalino demostró ser el más indicado para la biomasa con alto contenido de

lignina, se evaluó el uso de hidróxido de sodio e hidróxido de potasio en concentraciones de 0.5 a 1 % p/v con los que se obtuvo la máxima reducción de lignina del 36.5 %.

Por otro lado, en Espinosa Negrín et al. (2021) se describen los principales pretratamientos empleados por diferentes autores para distintos tipos de biomasa, donde destaca el uso de ácidos y explosión de vapor por su baja formación de inhibidores y condiciones de temperatura bajas con las que se obtienen buenos rendimientos de etanol.

En el trabajo de Sarto et al. (2019) se realizó una investigación del efecto del pretratamiento ácido usando H_2O_2 a diferentes cargas de reactivo y tiempos de residencia, los resultados indicaron que usando una concentración del 5 % v/v durante 65 minutos, se tuvo la máxima concentración de celulosa para este pretratamiento, usando tiempos de residencia cortos y carga de reactivo baja a una temperatura de 121 °C.

Oceguera-Contreras et al. (2019) muestra una propuesta interesante para degradar la biomasa lignocelulósica utilizando un pretratamiento biológico a partir de un sustrato que contiene microorganismos de lombrices lixiviadas y después una fermentación enfocada a la producción de biohidrógeno, los resultados señalaron una alta degradación del bagazo de caña de azúcar utilizando condiciones de operación cercanas a temperatura ambiente, lo cual lo hace una alternativa al uso de métodos que requieren grandes cantidades de energía y reactivos como ácidos y sales.

Zhang et al. (2020) realiza dos aportaciones interesantes, una es el efecto de pretratamiento organosolv usando etanol catalizado con NaOH y a diferentes cargas de biomasa, la otra es en la parte de hidrólisis enzimática con el complejo enzimático Cellic Ctec 2, donde se usa un aditivo llamado tween 80, con el que se redujo el tiempo de reacción de 72 a 24 horas con las concentraciones similares de glucosa finales de cuando no se usó el aditivo.

En el trabajo de Baral et al. (2020) se hace una propuesta interesante con el uso de la mezcla enzimática Cellic Ctec 2, en la que la biomasa se somete al proceso de hidrólisis y se realiza un reciclado de las enzimas para efectuar una segunda hidrólisis secuencial, obteniendo rendimientos de etanol del 80 % y reduciendo la carga enzimática necesaria.

Uno de los principales retos en la producción de biocombustibles de segunda generación es la viabilidad económica del proceso debido a que cuenta con las etapas de pretratamiento, hidrólisis y fermentación, es por ello que se muestran técnicas en las cuales la producción se puede efectuar de manera simultánea llamados procesos consolidados, que ayudan en la reducción de tiempo y etapas necesarias para obtener etanol, en el trabajo de Parisutham et al. (2014) se discute el potencial de estas configuraciones con el uso de microorganismos adecuados para la conversión de materiales lignocelulósicos en bioetanol de segunda generación.

Como ya se mencionó los procesos consolidados permiten realizar etapas simultáneas en un mismo proceso, en Olofsson et al. (2008) muestra un estudio de la configuración de sacarificación y fermentación simultáneas utilizando distintos tipos de biomasa, donde los principales retos son la temperatura y pH es por ello que se utilizan temperaturas inferiores a los 37 °C para evitar la inactivación de la levadura. Aun con esas limitaciones el costo de inversión disminuye considerablemente y se tiene una menor contaminación e inhibición del medio.

Como parte de la búsqueda que el etanol de segunda generación sea económicamente competitivo, la integración de procesos es prometedor que contempla una reducción de costos importantes, como lo muestra Gronchi et al. (2019) donde se logró producir 118 g/L de etanol en un proceso de sacarificación y fermentación simultánea utilizando la levadura *S. Cerevisiae* L20, esta levadura se considera sobresaliente para un proceso de escala industrial por lo que es una base para el diseño de nuevas cepas con capacidad fermentativa en procesos consolidados y con motivo de escalamiento.

Centrándose en el uso del complejo enzimático Cellic Ctec 2, en Sinche Arias et al. (2022) se muestra propone las condiciones de operación para una fermentación e hidrólisis simultánea, así como también se utilizan cuatro cargas enzimáticas y se estudia cuando se alcanza la máxima conversión de celulosa. Este proceso simultáneo se realiza con la levadura aislada *S. cerevisiae* YCS2, que fue cultivada en un medio compuesto por extracto de levadura, peptona y glucosa.

En el trabajo de Olguin (2020) propone el uso del hongo *Trametes hisurta* Bm-2 para un bioproceso consolidado (BPC) usando semillas de ramón. Este hongo presentó la capacidad de producción de enzimas en el medio con las semillas trituradas, logrando una hidrólisis, así como también la fermentación de estos azúcares, en un mismo proceso de una sola etapa, lo cual presenta una ventaja significativa por las condiciones de operación suaves y los bajos costos de instrumentación.

1.6.1. Conclusión del estado del arte

A partir de la revisión bibliográfica se muestra información importante, acerca de la producción de bioetanol de segunda generación, ya que involucra aspectos de los distintos tipos de biomasa, técnicas de pretratamiento adecuados para cada biomasa de acuerdo a su composición, procesos consolidados, tipos de microorganismos capaces de llevarse a procesos simultáneos y las distintas condiciones de temperatura, presión, pH, agitación que mejoran el rendimiento de etanol obtenido. Basándose en la información de la literatura se concluye que existe una gran variedad de métodos de tratamiento para los distintos tipos de biomasa y se sigue en la investigación para introducir los biocombustibles de segunda generación en la producción industrial debido al incremento de la demanda del etanol.

Para poder desarrollar un método experimental, primeramente se debe enfocar en la selección de la biomasa. Debido a que cada materia prima tiene una composición de lignina, hemicelulosa y celulosa distinta, y la técnica de pretratamiento puede ser insuficiente para la degradación y posteriormente causar un bajo rendimiento de etanol.

La mezcla enzimática Cellic Ctec 2 ha sido frecuentemente utilizada en la etapa de hidrólisis enzimática, obteniendo resultados favorables en la conversión de celulosa en azúcares fermentables y en la búsqueda es de las más accesibles en México, lo que la hace una buena opción por su obtención y resultados en la producción de biocombustible.

En las configuraciones es preferible comprender primeramente una producción por etapas separadas debido a que es más fácil observar y posteriormente determinar las condiciones de operación más favorables para el proceso, para después cambiar a una configuración de etapas simultáneas teniendo los conocimientos de como actúan los reactivos, microorganismos y condiciones de operación en el producto final.

1.7. Hipótesis

Al aplicar una evaluación física del proceso de bioetanol de segunda generación se logrará tener un mayor conocimiento del proceso y se tendrá un punto de partida para analizar las variables que intervienen y como afectan en el producto final, para posteriormente hacer un análisis de la dinámica que presenta este tipo de proceso bioquímico.

1.8. Metodología

Los pasos que se muestran a continuación son algunas de las actividades que se realizaron para lograr el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo:

- Se realizó un estudio de las técnicas de pretratamientos y sus condiciones de operación para el tipo de biomasa bagazo de caña de azúcar.
- Se obtuvieron las etapas necesarias que intervienen desde el proceso de pretratamiento hasta la fermentación y a partir del análisis de los trabajos relacionados se hizo la selección de los insumos, instrumentación y condiciones a utilizar en las pruebas experimentales.
- Se propusieron las configuraciones de etapas separadas y simultáneas para realizar una comparación de resultados, ya que se presentan condiciones de tiempos de residencia, temperatura, pH y agitación más favorables en procesos simultáneos.

- Se desarrollaron pruebas experimentales con el fin de conocer el proceso y posteriormente adaptar las condiciones de operación a la instrumentación utilizada.
- Se realizó un diseño de experimentos para evaluar el proceso cambiando los valores de las principales variables y observar el impacto, así como la sensibilidad que presenta.
- Determinar los lazos de control de acuerdo con las variables ubicadas importantes en las etapas de pretratamiento, hidrólisis y fermentación.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Bioetanol

El bioetanol o alcohol etílico, es un biocombustible obtenido de diferentes tipos de materia orgánica, frecuentemente producido por medio de la fermentación de los azúcares obtenidos de plantas como la caña de azúcar o remolacha, este tipo de combustible es de los más importantes dentro del grupo de energías renovables, debido a que es renovable y un buen potenciador de los combustibles fósiles.

La producción de bioetanol está enfocada en la búsqueda de alternativas para los combustibles fósiles como el petróleo, debido a que se consideran de menor impacto ambiental debido a bajas emisiones de gases de efecto invernadero y consumo menos limitado.

2.2. Clasificación de bioetanol

La producción de bioetanol se ha desarrollado durante los años en la constante búsqueda de la materia prima adecuada para su producción, actualmente se cuenta con una clasificación de tres generaciones diferentes que atienden al tipo de materia prima usada (Cortés-Sánchez et al., 2019).

2.2.1. Bioetanol de primera generación

El bioetanol de primera generación se centra en la utilización de materia prima alimentaria, la caña de azúcar y el maíz son de los principales cultivos destinados a biocombustibles comercializados con mayor éxito. La desventaja principal del bioetanol de primera generación es que se utiliza biomasa con valor alimenticio para ser transformada en etanol, esto impacta directamente en el suministro alimenticio, causando un incremento en el costo de obtención (Liu et al., 2019).

2.2.2. Bioetanol de segunda generación

El bioetanol de segunda generación se produce a partir de biomasa lignocelulósica (BLC), este tipo de biomasa comprende a los residuos forestales, residuos agrícolas, desechos urbanos y cultivos energéticos. El componente principal de biomasa es la celulosa, también contiene otros compuestos que son la lignina y hemicelulosa (Riaño, 2010).

Esta vía de producción de etanol de segunda generación es más estudiada actualmente para cubrir la desventaja del etanol de primera generación y se siguen desarrollando investigaciones para hacer económicamente viable el proceso debido a que es atractiva para una producción industrial.

2.2.3. Bioetanol de tercera generación

El bioetanol de tercera generación es a partir de algas para su producción, su uso supone la utilización de una fuente renovable con una rápida generación de biomasa en tiempos relativamente cortos y su cultivo no requiere utilizar tierras destinadas a los vegetales comestibles (Alfonsín et al., 2019).

La vía de producción de tercera generación está diseñada para cubrir las desventajas de la segunda generación, pero uno de los inconvenientes es que los estudios de esta vía son relativamente nuevos y se necesita hacer una investigación más profunda en esta técnica de producción de etanol.

2.3. Biomasa de segunda generación

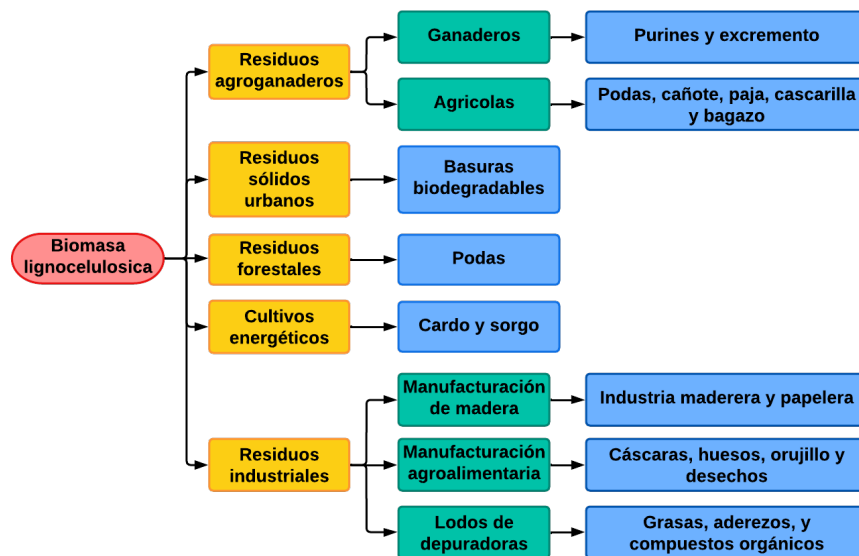


Figura 2.1: Clasificación de biomasa de segunda generación.

La biomasa de segunda generación (biomasa lignocelulósica) se clasifica en: Residuos agroganaderos, residuos sólidos urbanos, residuos forestales, residuos energéticos y residuos industriales (Figura 2.1). La lignocelulosa de esta materia prima almacena energía en sus componentes, que la hacen un compuesto con un gran potencial biotecnológico (Llano Burticá et al., 2020).

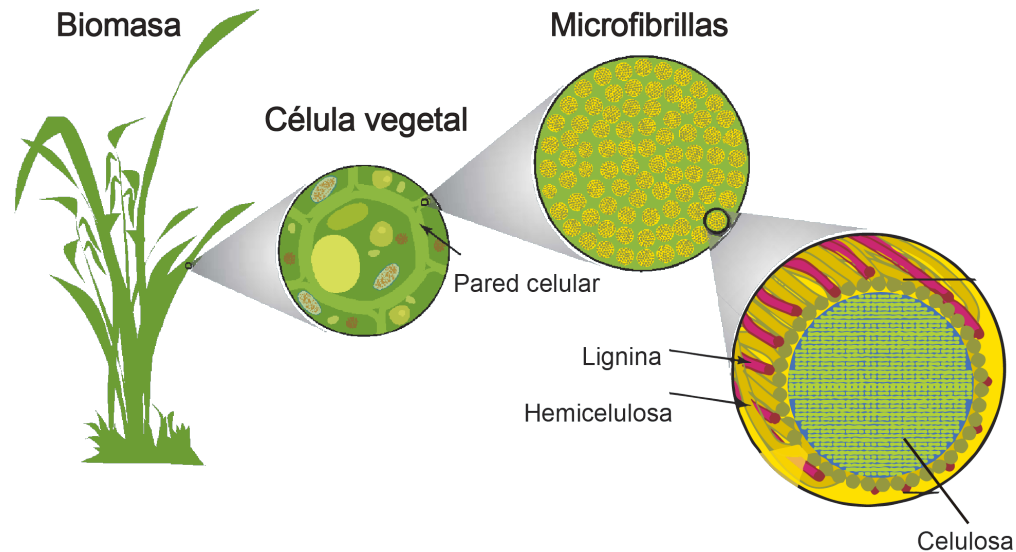


Figura 2.2: Estructura de la biomasa lignocelulósica.

En la Figura 2.2 se observa la estructura en las paredes vegetales de la BLC que está conformada a nivel molecular por tres componentes principales, las cuales son la hemicelulosa, lignina y celulosa, el porcentaje presente varía según el tipo, especie, clima, ubicación geográfica, entre otros (Rubin, 2008).

La celulosa es un biopolímero que se encuentra en las paredes celulares de las plantas, madera y fibras naturales, y se puede considerar como la parte fibrosa de la biomasa. Su composición es de subunidades de glucosa, que se encuentran unidas por cadenas de celulosa, cuando estas son rotas mediante la acción química de enzimas o ácidos se obtienen azúcares fermentables.

La hemicelulosa es una estructura compleja de carbohidratos que consiste en diferentes polímeros (pentosas, hexosas y ácidos urónicos) insolubles en agua, por sus características es más accesible y fácil de hidrolizar que la celulosa.

La lignina es la parte rígida y constituye entre un 15% y un 20% del peso total de la biomasa, su función es el transporte de agua, nutrientes y metabolitos, ya que se encarga de formar la estructura debido a su alta capacidad de entrecruzamiento, lo que brinda protección a los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica.

2.4. Producción de bioetanol de segunda generación

El bioetanol de segunda generación o bioetanol 2G es producido utilizando BLC, sus etapas de producción están conformadas por: I) Reducción de tamaño, si es necesario, II) pretratamiento de la biomasa, III) hidrólisis de hemicelulosa y celulosa, IV) fermentación de azúcares y V) destilación de etanol (Merino and Cherry, 2007).

En la Figura 2.3 se muestran las etapas que conforman el proceso, estas pueden llevarse a cabo mediante diferentes configuraciones las cuales permiten múltiples alternativas en cada una de ellas.

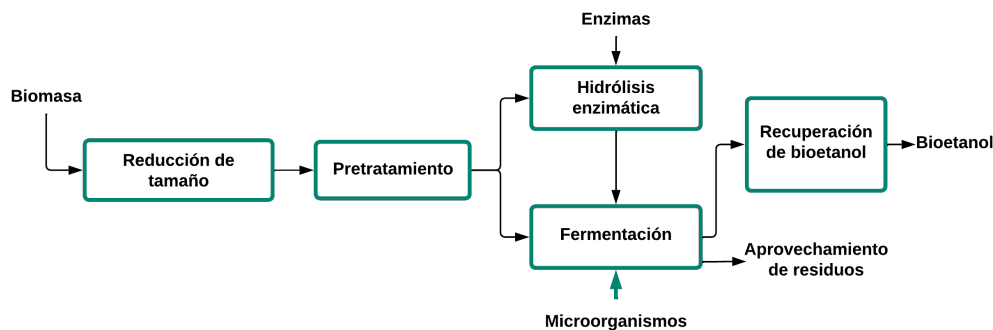


Figura 2.3: Etapas generales en el proceso de producción de bioetanol.

2.5. Pretratamiento de biomasa

La etapa de pretratamiento es una etapa importante en la que se modifican las propiedades físicas y fisicoquímicas de la lignocelulosa, enfocado en el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa. El principal objetivo que se busca, es romper el escudo de lignina que interfiere en la accesibilidad de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa, así mismo alterar el tamaño y estructura para facilitar la hidrólisis rápida y eficiente (Balat, 2009).

La eficiencia del pretratamiento es medida de acuerdo a la degradación de la lignina y la hemicelulosa, composición y características de la biomasa, y la disminución de la cristalinidad y aumento de la porosidad de la celulosa. En la Figura 2.4 se muestra el efecto del pretratamiento sobre la BLC.

Existen diferentes procesos para el pretratamiento de BLC, en la Figura 2.5 se pueden observar la clasificación de pretratamientos y sub-pretratamientos existentes (Kumari and Singh, 2018).

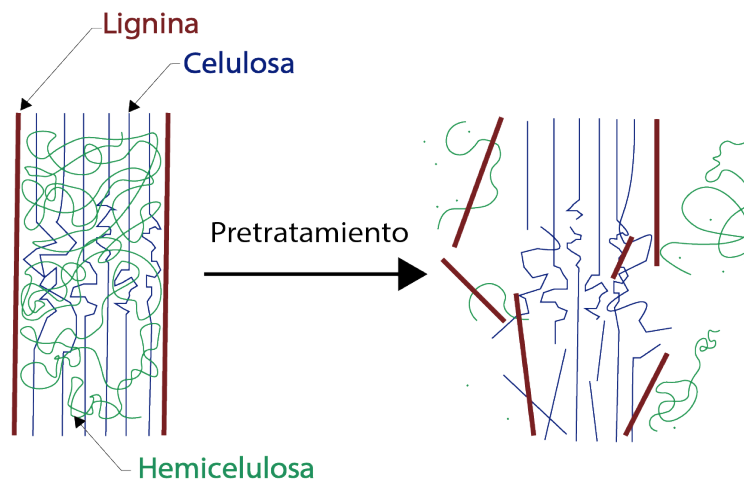


Figura 2.4: Efecto del pretratamiento sobre la biomasa de segunda generación.

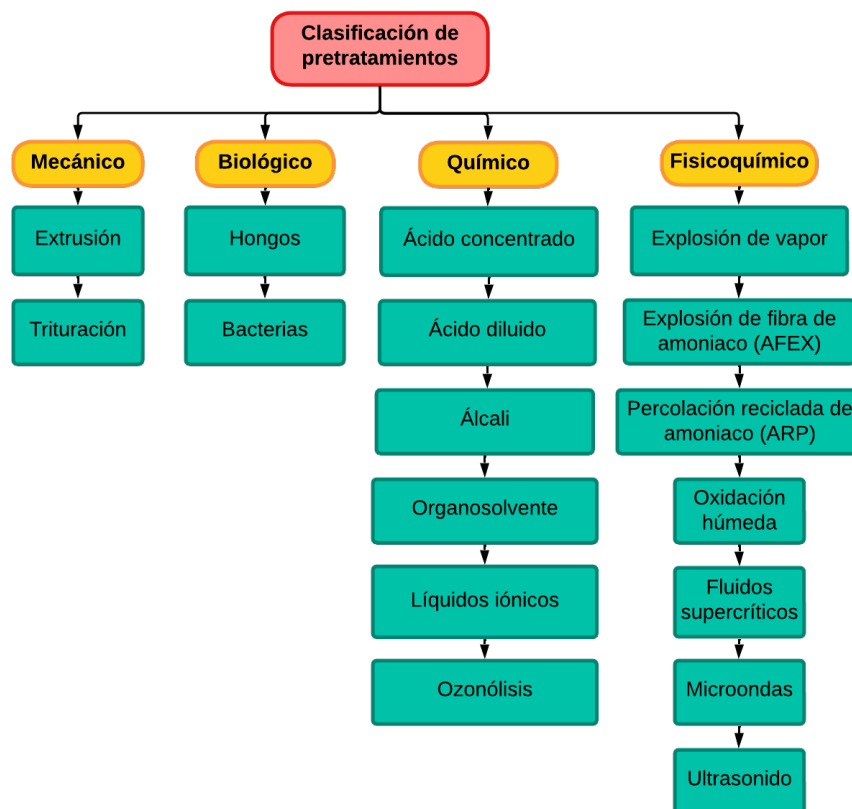


Figura 2.5: Clasificación de pretratamientos para la biomasa lignocelulósica.

2.5.1. Pretratamiento mecánico

El pretratamiento mecánico se realiza principalmente para reducir físicamente la biomasa por métodos de corte, troceado o rotura de material. Al igual que cualquier otro método, se busca degradar la cristalinidad, para mejorar el resto de los procesos posteriores en la producción de bioetanol (Sun and Cheng, 2002).

La reducción de tamaño físico convencionalmente se puede realizar mediante molienda de martillos, molienda de rodillos, molienda de compresión y molienda de discos húmedos. Este tipo de pretratamiento demostró una mejora del 5 al 25 % durante la hidrólisis, dependiendo de la técnica de molienda.

2.5.2. Pretratamiento biológico

El pretratamiento biológico hace uso de microorganismos con la capacidad de degradar los componentes lignocelulósicos de la materia prima a una forma amorfa que permita la hidrólisis. Los microorganismos principalmente usados para descomponer la estructura lignocelulósica son los hongos de podredumbre, su capacidad de degradación radica en la producción de hidrolasas, para liberar los polisacáridos y romper la estructura de la lignina (Prasad et al., 2007).

Este pretratamiento es sostenible ambientalmente, debido a que se requieren condiciones suaves, lo que significa que no se necesita utilizar sustancias químicas adicionales y la energía necesaria es muy baja; sin embargo, son procesos lentos y de estancias largas.

2.5.3. Pretratamiento químico

El pretratamiento químico hace uso de reactivos, con el mismo propósito de degradar las paredes de la lignocelulosa y la cadena de carbohidratos complejos por medio de una reacción química. Es considerado como un pretratamiento accesible debido a su simpatía, refiriéndose a que algunas sustancias químicas son de fácil acceso y de menor costo, el uso de estas sustancias conlleva a un menor uso de energía calorífica y tiempos de reacción menores, dependiendo de las concentraciones de los reactivos empleados (Mosier et al., 2005).

2.5.4. Pretratamiento fisicoquímico

Este pretratamiento recibe su nombre por sus características mecánicas y químicas fusionadas. Mecánicamente, se golpea la biomasa con vapor que provoca separación de las fibras. Mientras que químicamente, se realiza autohidrólisis con el ácido acético formado, debido a las altas temperaturas a la que se somete la lignocelulosa. La combinación de la hidrólisis y solubilización parcial de la hemicelulosa, la lignina se redistribuye y de esta manera se elimina o reduce. Por otra parte, la celulosa es expuesta y aumenta la accesibilidad de las enzimas en la etapa de hidrólisis (Alvira et al., 2010).

2.6. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es la acción que realizan algunos microorganismos, como las bacterias y hongos, que son capaces de producir enzimas extracelulares que pueden hidrolizar la celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables, el complejo enzimático más utilizado se compone de celulasas y hemicelulasas (xilanasas). Es un proceso de transformación efectivo, en el cual se tienen parámetros óptimos como la temperatura que se realiza entre 45 °C y 50 °C y el pH de acuerdo al tipo de complejo enzimático comercial utilizado. El objetivo de este proceso es romper los enlaces que mantienen unidos a los aminoácidos que constituyen a las proteínas para segmentar la celulosa, debido a las β -1-3 exo celobiohidrolasas, β -1-4 glucasidas, β -1-3 glucan hidrolasas y las β -1-4 endoglucanasa (Salcedo et al., 2012).

La presencia de porcentajes altos de lignina durante la hidrólisis enzimática produce una menor calidad de azúcares fermentables, debido a que la lignina actúa como una barrera física que limita el acceso de las enzimas en el material celulósico, es por ello que se debe eliminar por medio de un pretratamiento efectivo para conseguir para aumentar la eficiencia de la hidrólisis (Lu et al., 2002).

2.7. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso anaerobio que se logra por la actividad de microorganismos, principalmente levaduras y algunas bacterias, que procesan los azúcares fermentables como el almidón, la fructosa y glucosa, para generar alcohol (etanol) y CO₂.

El propósito de la fermentación es proporcionar energía en ausencia de oxígeno a los microorganismos, en el caso de la generación de bioetanol a través de materiales lignocelulósicos después del hidrolizado de la biomasa, los azúcares que fueron liberados son fermentados con la ayuda de levaduras y transformados a etanol, la última etapa es la separación y purificación del producto realizando una destilación (Zabed et al., 2017).

Microorganismos fermentativos

En la actualidad se conocen microorganismos etanológicos que son las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* que son reconocidas por su capacidad de procesar azúcares con seis átomos de carbono (hexosas), pero consiguen utilizar la xilosa como fuente productora de etanol. Las bacterias como la *Pichia* y *Candida* son especies que logran utilizar los azúcares con cinco átomos de carbono (pentosas), pero no tienen una productividad tan elevada como la de las levaduras *S. cerevisiae*, además de necesitar oxígeno en cantidades reguladas, son sensibles a inhibidores (Karagoz et al., 2019).

2.8. Configuraciones de producción

La producción de etanol se ha enfocado actualmente en la mejora del proceso, la reducción de tiempos e incremento del rendimiento de etanol obtenido utilizando herramientas tecnológicas. Las configuraciones se enfocan en la integración de etapas del proceso, con el objetivo de incrementar las concentraciones finales de producto y la reducción del costo de capital, con un menor consumo de energía, tiempo y equipo, por lo tanto, se consigue una producción de biocombustibles más eficiente y económicamente viable. En la Figura 2.6 se muestran las configuraciones que se identifican actualmente en la literatura que permiten la integración de las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación (Aditiya et al., 2016).

Los procesos de conversión de las hexosas y pentosas a bioetanol se pueden realizar en etapas secuenciales o simultáneas, las que se distinguen en los procesos de bioetanol son:

- Hidrólisis y Fermentación Separadas (HFS).
- Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS)
- Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (SCFS).
- Bio-Procesamiento Consolidado (BPC).

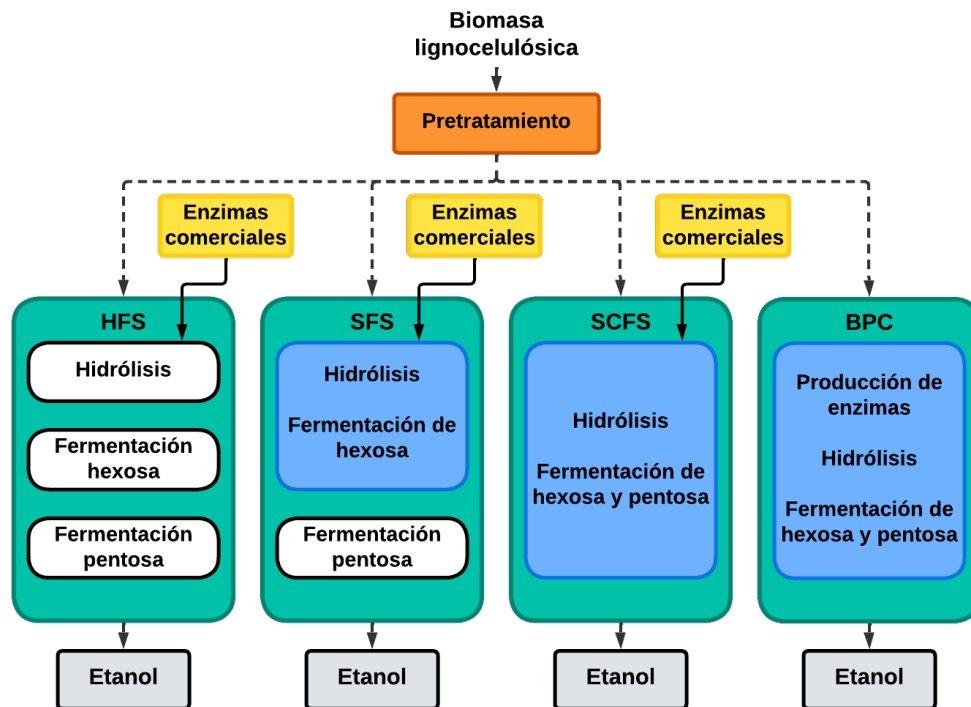


Figura 2.6: Configuraciones para realizar procesos simultáneos en etapas de hidrólisis y fermentación

2.8.1. Hidrólisis y Fermentación Secuenciales (HFS)

En esta configuración la hidrólisis y fermentación se realizan en dos etapas separadas y secuenciales, como primer paso la biomasa pretratada se hidroliza a glucosa usando enzimas comerciales. Después, la glucosa liberada (azúcares de hexosas y pentosas), se somete a un proceso de fermentación, convirtiéndose en etanol.

Las ventajas del proceso de etapas separadas, es que las dos etapas se llevan a cabo bajo las condiciones óptimas de operación de cada microorganismo. Por otro lado, el inconveniente radica en la acumulación de azúcares durante la hidrólisis que pueden inhibir a las enzimas, que puede afectar el rendimiento del etanol (Paulova et al., 2015).

2.8.2. Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS)

En esta configuración la sacarificación (hidrólisis) y la fermentación se realizan simultáneamente en una etapa, la biomasa pretratada se somete a la acción de enzimas, la glucosa liberada enseguida entra en fermentación debido a la presencia de los microorganismos (levaduras o bacterias). Al ser una etapa simultánea se considera un método más eficiente y viable, debido a que se elimina o logra reducir la inhibición de las enzimas, es más económico al reducir el equipo, tiempo e insumos necesarios, así como por la presencia de etanol durante el proceso ayuda a reducir la contaminación durante el proceso (Jahnavi et al., 2017).

Uno de los principales retos son las condiciones de operación óptimas de las enzimas y microorganismos fermentadores, ya que las enzimas se desempeñan mejor en temperaturas de alrededor de los 50 °C, mientras que en la fermentación se usan entre 28 a 37 °C (Hasunuma and Kondo, 2012).

2.8.3. Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (SCFS)

Esta configuración es similar a la SFS, pero se enfoca en la asimilación completa de todos los azúcares, compuestos por hexosas y pentosas, esto se realiza con el uso de un conjunto de microorganismos capaces de fermentar, por una parte, las hexosas y por otra las pentosas, o un solo microorganismo que sea capaz de fermentar ambos azúcares (Sanchez and Cardona, 2008).

Actualmente, no se tiene una selección clara de los microorganismos con capacidad de fermentar las pentosas y hexosas. Con esta configuración se presentan ventajas como tiempos cortos de operación, menor coste, bajo riesgo de contaminación y menor inhibición de enzimas, por lo que se está en constante investigación y desarrollo de un microorganismo capaz de hacer una fermentación completa (Rastogi and Shrivastava, 2017).

2.8.4. Bioproceso Consolidado (BPC)

Esta configuración hace utilización de un único microorganismo, que en una solo paso se realizan tres etapas para el proceso de conversión de BLC, las cuales son producción de enzimas celulasas y hemicelulasas, hidrólisis y fermentación.

Sus principales ventajas son que se realiza la producción de enzimas y se puede evitar el costo de adquirir o fabricarlas, por otra parte, se pueden tener bajos rendimientos de etanol, debido por la formación de subproductos, así como también la tolerancia que pueda presentar el microorganismo al etanol y el crecimiento limitado de los hidrolizados (Althuri and Mohan, 2020).

2.9. Conclusiones del capítulo

En este capítulo se presentan algunos conceptos básicos relacionados con la producción de etanol, así como también una revisión de los tipos de biocombustibles. Después se enfoca en la biomasa de segunda generación para entender su clasificación y posteriormente la composición de los materiales lignocelulósicos para adentrar al lector a las etapas de producción.

En la etapa de pretratamiento se muestra el efecto que se tiene en la biomasa y la clasificación los distintos métodos que se existen. En la etapa de hidrólisis se presenta la acción de las enzimas en la conversión a azúcares fermentables. Por último la acción de los microorganismos de fermentación con el fin de presentar la importancia de cada etapa.

Por último, se presentan las diferentes estructuras en las que se pueden llevar los procesos simultáneos desde la etapa de pretratamiento hasta la fermentación, las cuales tienen como objetivo realizar un proceso simple con un porcentaje alto de etanol.

Capítulo 3

Caso de estudio

3.1. Materia prima

La selección de la materia prima es importante debido a que para las pruebas experimentales se debe conocer la composición y los pretratamientos adecuados para este tipo de biomasa. De acuerdo con los datos de la SAGARPA (2022) los principales cultivos generados en el país son el grano de maíz, frijol, grano de sorgo y la caña de azúcar, de los cuales se generan una cantidad importante de desechos agrícolas (Figura 3.1).

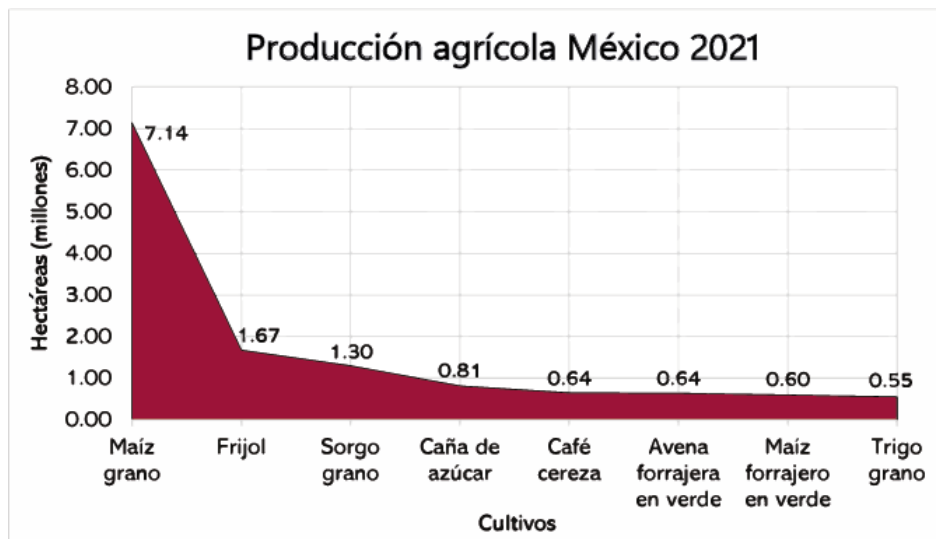


Figura 3.1: Producción agrícola México 2021

Para la selección, se ubicaron de manera general los principales cultivos que se producen en el país, posteriormente en el interior, más puntualmente en los estados de Morelos y Ameca, Jalisco, este último donde se llevaron a cabo los experimentos necesarios, con el propósito de utilizar la materia residual de las cosechas, buscando que fuera accesible económicamente y por cercanía.

En la Figura 3.2 se observa que los principales dos cultivos que se producen en común en estas ubicaciones son el maíz en grano y la caña de azúcar, la propuesta de biomasa fue el bagazo de caña de azúcar debido a que se tiene una mayor accesibilidad con una inversión baja o nula.

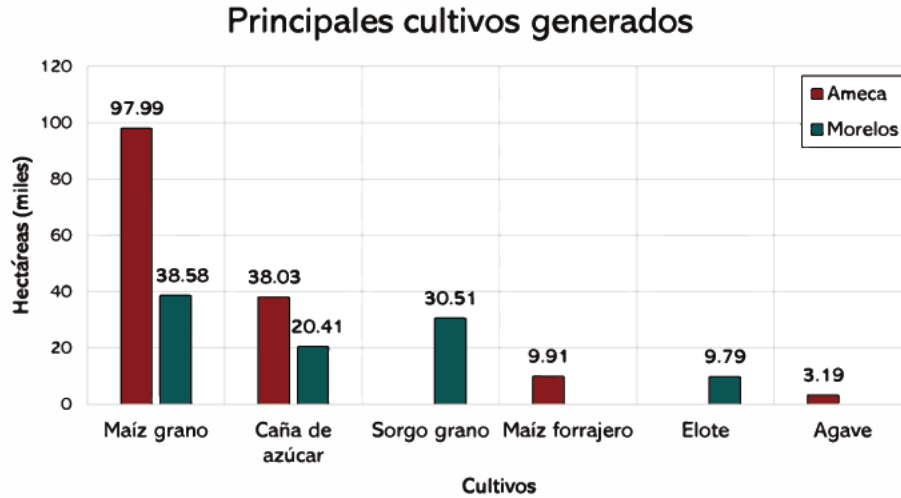


Figura 3.2: Producción agrícola en el estado de Morelos y en Ameca, Jalisco.

El bagazo utilizado en este trabajo experimental fue proporcionado por el Ingenio de San Francisco, ubicado en Ameca, Jalisco. La biomasa, después del proceso de producción de azúcar en esta institución, no cuenta con un uso adicional, por lo que se considera un desecho sometiéndola a un proceso de incineración.

Posteriormente, en la selección de la biomasa se tiene que conocer su composición con el fin de ubicar él o los pretratamientos más adecuados, que garanticen una conversión eficiente. En Robak and Balcerek (2020) se muestra la caracterización de diferentes tipos de BLC que son frecuentemente usadas en la producción de bioetanol.

En la Tabla 3.1 se puede observar la composición (celulosa, hemicelulosa y lignina) promedio del bagazo de caña de azúcar en relación con el peso de la biomasa seca.

Tabla 3.1: Composición promedio de la BLC derivada de la caña de azúcar (% en peso seco)

| Cultivo | Residuo | Contenido de celulosa | Contenido de hemicelulosa | Contenido de lignina |
|----------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|
| Caña de azúcar | Bagazo de caña de azúcar | 34.8 % | 25 % | 24.6 % |

3.2. Pretratamientos propuestos

3.2.1. Pretratamiento mecánico

Este pretratamiento está enfocado principalmente en la reducción de tamaño de la biomasa en partículas, con él se puede incrementar el área superficial para un posterior tratamiento efectivo. En la Tabla 3.2 se muestra el tamaño contemplado de partícula utilizando método de molienda y posterior tamizado reportado en Sarto et al. (2019).

Tabla 3.2: Pretratamiento mecánico para reducción de biomasa

| Pretratamiento | Método | Tamaño de partícula |
|----------------|----------|---------------------|
| Mecánico | Molienda | 0.5 cm |

3.2.2. Pretratamientos químico y biológico

En esta etapa de pretratamiento, la selección se realizó basándonos en lo reportado en la literatura, considerando el más adecuado para el tipo de biomasa, de misma manera tomando en cuenta que sean alcanzables y no se contemple un costo elevado en la adquisición de sustancias o materiales. Los pretratamientos que corresponden a la categoría de procesos químicos, como el hidróxido de sodio diluido (NaOH), que pertenece a la subcategoría de los alcalinos, y el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido (H_2SO_4) que pertenece a los ácidos, son una opción viable debido a las bajas concentraciones de reactivos y condiciones de operación moderadas (Krylova et al., 2008)(Balat, 2009).

Un pretratamiento que se contempla es del tipo biológico que se reporta en Ocegüera-Contreras et al. (2019). Este método se realiza utilizando el consorcio bacteriano de lombriz lixiviada, encontrado en el fertilizante orgánico, el cual cuál tiene una capacidad de degradación de la biomasa utilizando temperaturas relativamente bajas, cercanas al ambiente de entre 32 - 40 °C, además de propiciar una estructura para el acoplamiento enzimático durante la hidrólisis.

En la Tabla 3.3 se muestran los parámetros que se han utilizado como protocolo experimental, provenientes de trabajos que usan el bagazo de caña de azúcar como biomasa y se obtienen rendimientos favorables de celulosa, además de presentar condiciones accesibles.

Tabla 3.3: Parámetros utilizados por los autores en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar

| Tipo de pretratamiento | Carga de biomasa | Condiciones de pretratamiento | Fuente |
|------------------------|-----------------------|--|-----------------------------------|
| Álcali diluido | Bagazo al 4-5 % (p/v) | NaOH al 2 % (p/v) a 121 °C durante 90 min. | (Suárez et al., 2019) |
| Ácido diluido | Bagazo al 4-5 % (p/v) | H ₂ SO ₄ al 5 % (v/v) a 121 °C durante 60-70 min. | (Espinosa Negrín et al., 2021) |
| Biológico | Bagazo al 5 % (p/v) | Humus de lombriz lixiviada al 5 % (p/v) a 32-40 °C durante 14 días, en medio anaerobio | (Oceguera-Contreras et al., 2019) |

3.3. Configuraciones de bloques en el proceso

Se seleccionaron dos configuraciones en la etapa de conversión de etanol, la primera es usando una configuración de etapas separadas (HFS) y etapas simultáneas (SSF). La configuración SHF es un proceso usado típicamente en la producción de bioetanol, debido a que se tiene una mayor compresión de las etapas unitarias y las condiciones de operación, del cómo intervienen en el producto final.

Después de comprender y analizar el proceso por etapas separadas, se continuó con la configuración SSF con el fin de analizar la interacción de dos microorganismos en una misma etapa y como afectan las condiciones de operación en el producto final, así como la importancia de mantenerlas con la menor variación posible.

3.3.1. Hidrólisis y Fermentación Separadas (HFS)

Después de un pretratamiento de biomasa, se hace la separación de las fracciones (líquida - sólida), posteriormente la fracción sólida es sometida a un proceso de hidrolizado usando enzimas comerciales. Las condiciones típicas de estos microorganismos que se reportan son temperaturas de 40 - 50 °C durante el tratamiento. Al término de la etapa de hidrolizado se añaden levaduras para comenzar a fermentar los azúcares que fueron liberados durante la hidrólisis enzimática, las condiciones usadas durante la fermentación con levaduras son de 30 - 37 °C (Manzanares, 2010).

En la Figura 3.3 se observa las etapas de producción de la configuración HFS, la biomasa es sometida a un proceso de pretratamiento para hacer un proceso secuencial de hidrólisis y fermentación.

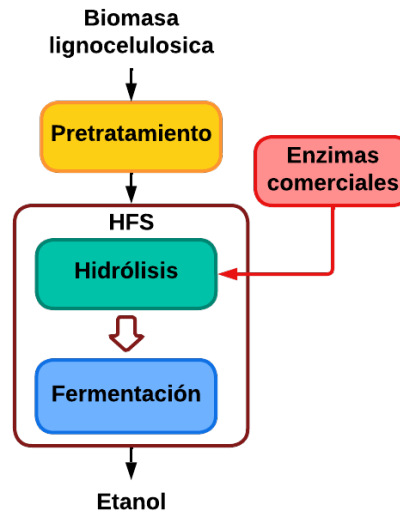


Figura 3.3: Bloques del proceso en configuración HFS

Hidrólisis enzimática

Las enzimas comerciales adquiridas Cellic Ctec 2 son una mezcla enzimática de celulasas y hemicelulasas, diseñadas para la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, las cuales han reportado rendimientos de glucosa obtenida durante la hidrólisis enzimática por encima del 80 % (Baral et al., 2020)(Zhang et al., 2020).

En la Tabla 3.4 se observan las cargas enzimáticas, temperaturas, pH y tiempos de residencia propuestos durante la etapa de hidrólisis. Los cuales se usaron de punto de partida para implementar durante los experimentos.

Tabla 3.4: Parámetros propuestos en hidrólisis enzimática haciendo uso de Cellic Ctec 2

| Proceso | Carga de biomasa | Parámetros durante hidrólisis enzimática | Fuente |
|-----------------------|------------------------|--|----------------------|
| Hidrólisis enzimática | Bagazo al 5-10 % (p/v) | Cellic Ctec 2 20 UPF/g de biomasa a 45-50 °C y pH 5, durante 72 horas. | (Zhang et al., 2020) |
| | Bagazo al 5-10 % (p/v) | Cellic Ctec 2 25 mg/g de biomasa a 45-50 °C y pH 5, durante 72 horas. | (Baral et al., 2020) |

Para la carga enzimática reportada en UPF (Unidades Papel Filtro) se debe realizar la conversión a mililitros (ml) por medio de la ecuación 3.1.

$$carga\ enzimática\ (ml) = \frac{0.37}{UPF} \quad (3.1)$$

Y para la carga reportada en miligramos (mg), se usa la ecuación 3.2, donde la densidad de las enzimas ρ tomando los datos de la hoja técnica es de $1.15\ g \cdot cm^{-3}$.

$$\text{carga enzimática (ml)} = \frac{mg}{\rho \cdot 1000} \quad (3.2)$$

Fermentación alcohólica

El hidrolizado proveniente de la hidrólisis enzimática es sometido a un proceso de fermentación con la ayuda de levaduras. Las levaduras usadas en esta etapa son de la familia *Saccharomyces*, habitualmente empleadas en el proceso de fermentación en la industria panadera y cervecera.

El espécimen utilizado durante los experimentos es *saccharomyces cerevisiae* 3C, donado por el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), y en la Tabla 3.5 se pueden observar las condiciones de operación durante esta etapa según lo reportado.

Tabla 3.5: Parámetros propuestos en fermentación alcohólica usando levadura

| Proceso | Carga de hidrolizado | Parámetros propuestos en la etapa de fermentación | Fuente |
|-------------------------|----------------------|---|-------------------------|
| Fermentación alcohólica | 90 ml | 10 % (v/v) de levadura inoculada en medio anaerobio a 30 °C durante 7 días y agitación 200 rpm. | (Alvarado Ludeña, 2021) |

3.3.2. Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS)

Para un análisis más completo se propone utilizar una configuración con etapas simultáneas. La configuración SFS contempla las mismas etapas de hidrólisis enzimática y fermentación (Figura 3.4), con la excepción de que se realizan de manera simultánea, es decir, la carga enzimática se agrega junto con las levaduras sobre la biomasa pretratada, esto ayuda a reducir la posibilidad de contaminación, tener un proceso más simple y con menor tiempo de residencia (Olofsson et al., 2008).

Los principales inconvenientes son las condiciones como la temperatura y pH, al tratarse de dos microorganismos en un mismo proceso, no se pueden utilizar las condiciones óptimas de las enzimas sin repercutir en la función de las levaduras (Kumneadklang et al., 2015).

Tabla 3.6: Parámetros propuestos en hidrólisis y fermentación simultánea usando Cellic Ctec2

| Proceso | Carga de biomasa | Parámetros en SFS | Fuente |
|--------------------------------------|---------------------|--|-----------------------------|
| Hidrólisis y fermentación simultánea | Bagazo al 5 % (p/v) | Cellic Ctec 2 20 UPF/g de biomasa y 10 % (v/v) de levadura inoculada a 37 °C y pH 5, durante 48 h con agitación de 200 rpm horas | (Sinche Arias et al., 2022) |

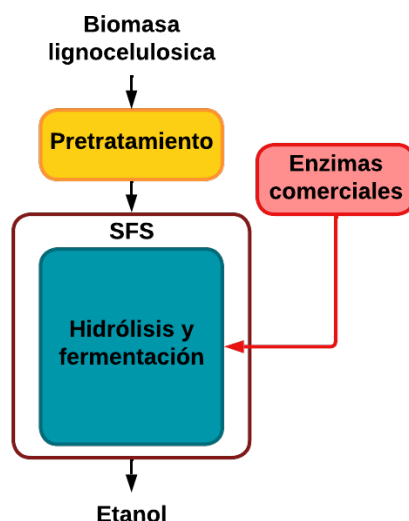


Figura 3.4: Proceso en configuración SFS

De acuerdo con lo reportado por Sinche Arias et al. (2022) en la Tabla 3.6 se muestran las condiciones propuestas utilizando el complejo enzimático Cellic Ctec 2 y levaduras de la familia *saccharomyces*, que se toman como punto de partida para los experimentos realizados.

3.4. Cultivo de levaduras

Las levaduras *S. cerevisiae* 3C fueron transferidas de un agar (medio de cultivo sólido) a medio de cultivo YPD (Yeast extract Peptone Dextrose). Este medio de cultivo está compuesto por extracto de levadura, glucosa y peptona, debido a su composición es ideal para el crecimiento y proliferación de levaduras (Sinche Arias et al., 2022).

Tabla 3.7: Composición de medio YPD para cultivo de levaduras

| | Compuesto | Medida |
|------------------|----------------------|--------------------|
| Medio YPD | Extracto de levadura | 10 gramos / litro. |
| | Peptona | 20 gramos / litro. |
| | Glucosa | 20 gramos / litro. |

En la Tabla 3.7 se muestran las cantidades por litro a utilizar, para realizar el medio de crecimiento. El método de preparación del medio y posterior cultivo de microorganismos es el siguiente:

1. Pesar las cantidades en relación con el volumen que se ocupará.

2. Los compuestos se añaden a un matraz con el volumen necesario.
3. Se agrega agua destilada, agitando ocasionalmente hasta disolver los compuestos y que no se observe ningún rastro sólido o turbidez (clarificar).
4. Colocar un tapón de algodón en la boquilla del matraz y sellar con papel aluminio para evitar contaminación.
5. El matraz se coloca en autoclave para esterilización del medio de cultivo, a temperatura de 121 °C durante 20 minutos.
6. Enfriar el contenido del matraz hasta alcanzar la temperatura ambiente.
7. Se toma una muestra de levadura del agar y se deposita en el medio de cultivo YPD esterilizado.
8. El matraz se mantiene durante 24 horas en agitación constante y temperatura de 30 °C para garantizar la proliferación de los microorganismos en el medio.

3.5. Conclusiones del capítulo

En este capítulo se presentó el caso de estudio que se necesitó aislar para un tipo de biomasa para las pruebas experimentales, por lo que se consideró de acuerdo a la producción agrícola en los estados donde se estuvo trabajando que fueron Morelos y Jalisco, esto con el fin de ubicar el residuo agrícola más accesible para este y futuros trabajos relacionados.

Posteriormente, debido a que la información es demasiado extensa sobre las técnicas de pretratamiento, se centró en los más adecuados de acuerdo a la composición de la biomasa y los que presentaran condiciones de operación alcanzables a nivel laboratorio debido a que es un primer acercamiento en este tipo de experimentos. Los pretratamientos a base de ácidos y sales, fueron los más adecuados, ya que presentan una mayor descomposición de la lignina, utilizando bajas concentraciones de reactivo y temperaturas sin necesidad de involucrar presión durante la reacción.

Por último, se muestran las configuraciones utilizadas en los experimentos, así como también las condiciones propuestas que sirvieron como punto de partida, tanto en la configuración de etapas separadas y simultáneas se contempló el uso de la mezcla enzimática Cellic Ctec 2. Estas configuraciones tienen sus ventajas y desventajas que serán más visibles en la parte experimental.

Capítulo 4

Pruebas experimentales

4.1. Acondicionamiento de biomasa

Antes de comenzar con algún tipo de pretratamiento, la biomasa se acondicionó, por lo que se realizó un lavado para eliminar rastros de tierra o residuos de algún otro material orgánico que acompañe a la biomasa en caso de necesitarlo, o hacer una limpieza manual.

Posteriormente, se debe eliminar toda humedad presente en la biomasa, esto se realizó en un horno de secado con aire caliente, con una temperatura de trabajo de 40 °C durante 12 horas (Figura 4.1). Se logró observar que a una temperatura más alta, se produce un sobre secado, llegando a quemar el bagazo, lo que altera la composición de la biomasa.



Figura 4.1: Secado de biomasa en horno de aire caliente.

4.2. Pretratamiento de biomasa

Para la etapa de pretratamiento se realizaron dos etapas secuenciales en la que primero se aplicó una reducción de tamaño en la biomasa (pretratamiento por método de molienda)

y después el tratamiento para la degradación de lignina y hemicelulosa (tratamiento alcalino, ácido y biológico) como se muestra en la Figura 4.2.

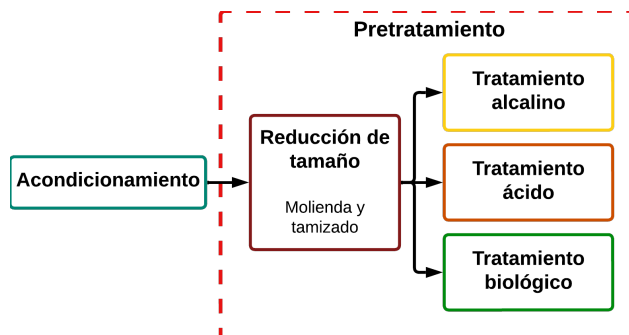


Figura 4.2: Secuencia de etapas en el proceso de pretratamiento de BLC.

4.2.1. Pretratamiento mecánico

La reducción de tamaño se hizo sobre el bagazo seco con la ayuda de un molino manual y posteriormente un tamizado de las partículas.

Materiales

- Molino manual
- Malla para tamizado

Procedimiento

El bagazo se colocó en el molino con el cual se logró reducir gran parte del tamaño y posteriormente se utilizó una malla para hacer una separación de las partículas con el fin de obtener una medida uniforme (Figura 4.3).



Figura 4.3: Molienda y tamizado de bagazo seco.

El tamaño de partícula de biomasa fue de 5 mm, es la que demostró mejores resultados en cuanto la agitación, ya que no se presentó interrupción durante los pretratamientos químicos

y biológico, mientras que partículas mayores, no favorecen la agitación durante las distintas etapas del proceso. Como se muestra en la Tabla 4.1 se utilizaron tres tamaños de partícula distintos para hacer una selección que permitiera realizar un tratamiento de biomasa con agitación constante.

Tabla 4.1: Selección de tamaño de partícula en relación con la agitación en el proceso

| | Tamaño de partícula | Tipo de agitación en etapas posteriores |
|----------------------------|---------------------|--|
| Molienda y tamizado | 5 mm | Buena, sin interrupciones en el proceso, facilita la manipulación de biomasa |
| | 10 mm | Agitación intermitente, causa interrupción por absorción, se deben utilizar cargas pequeñas de biomasa |
| | 15 mm | Se requiere instrumentación adecuada para garantizar una buena agitación debido a interrupción en volúmenes inferiores a 1000 ml |

4.2.2. Pretratamiento ácido

Para el pretratamiento ácido se usó H_2SO_4 al 5% (v/v), se usó un volumen de 600 ml y determinó una carga de biomasa tamizada del 4% (p/v), con la cual se garantiza una agitación constante y sin interrupciones.

Materiales

Reactivos

- Ácido sulfúrico
- Agua destilada

Instrumentación

- Balanza digital
- Probeta plástica de 100 ml
- Vaso de precipitado de 1000 ml
- Agitador magnético
- Sonda de temperatura
- Pala plástica

Procedimiento

Se utilizaron tres cargas distintas como se muestra en la Tabla 4.2 para observar la agitación durante el proceso y poder determinar el porcentaje adecuado.

Tabla 4.2: Selección de la carga de bagazo durante los pretratamientos químicos

| | Carga de bagazo | Observaciones durante la agitación en etapas de producción |
|--|-----------------|--|
| Agitación contra carga de biomasa | 4% (p/v) | Agitación constante durante el proceso de producción de etanol |
| | 6% (p/v) | Se cuenta con agitación constante al inicio del proceso, con interrupción intermitente debido a la evaporación y absorción |
| | 8% (p/v) | Agitación intermitente-nula se requiere usar un sistema de agitación adecuado |

Utilizando la ecuación 4.1, se obtuvo la medida de reactivo VR_{acido} (en mililitros) correspondiente en relación con el volumen total V_{total} de reacción utilizado en mililitros y la concentración en volumen C_{acido} expresado en porcentaje.

$$VR_{acido} (ml) = C_{acido} \cdot V_{total} \quad (4.1)$$

Preparación de solución ácida

La solución se preparó en un vaso de precipitado en el cual se añadieron 600 ml de agua destilada para posteriormente añadir la carga de ácido sulfúrico correspondiente.

Para la manipulación de reactivos ácidos se debe realizar con precaución y material adecuado, debido a la acción corrosiva que presentan. Para medir el ácido se utilizó una probeta plástica, con la que se tomó el volumen requerido de H_2SO_4 (Figura 4.4), posteriormente fue añadido al vaso de precipitado lentamente y por la orilla del recipiente, debido a la reacción exotérmica que se genera al contacto con el agua.



Figura 4.4: Preparación de solución con H_2SO_4 al 5% (v/v).

La solución se colocó en un agitador magnético con base calefactora (C-MAG HS), en donde se mantuvo en agitación constante e incremento de temperatura. Para verificar la temperatura dentro de la solución, se utilizó una sonda de acero inoxidable (TMP-BTA Vernier), con la que se obtuvieron lecturas en línea, como se observa en la Figura 4.5.

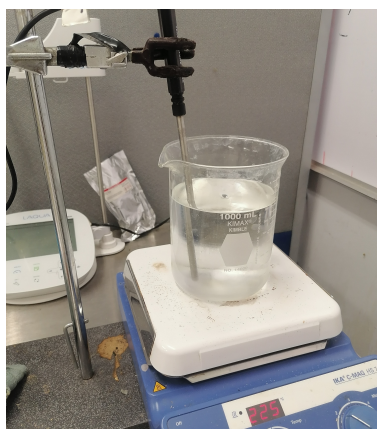


Figura 4.5: Solución en agitador magnético y lectura de temperatura.

Tratamiento ácido diluido

Debido a las limitaciones de la instrumentación se obtuvo una temperatura máxima de 97 °C, en vez de los 121 °C deseados, por lo que se ajustó para trabajar a esta temperatura máxima en los experimentos. Al alcanzar la temperatura de pretratamiento, se añadió la carga de bagazo correspondiente al 4 % (p/v) como se muestra en la Figura 4.6.



Figura 4.6: Incorporación de carga de bagazo al 4 % (p/v).

Para conocer la carga de biomasa $C_{biomasa}$ en gramos, correspondiente al volumen de solución $V_{solucion}$ y con carga expresada en porcentaje $C_{porcentaje}$ de 4 % peso/volumen determinada anteriormente, se puede hacer uso de la ecuación 4.2.

$$C_{biomasa} (g) = C_{porcentaje} \cdot V_{solucion} \quad (4.2)$$

Una vez que se agregó el bagazo y se garantizó una agitación constante, se comenzó a contar el tiempo de estancia de pretratamiento que fue de 60 min como lo establece Espinosa Negrín et al. (2021), En la Figura 4.7 se muestra el tratamiento ácido en la biomasa.

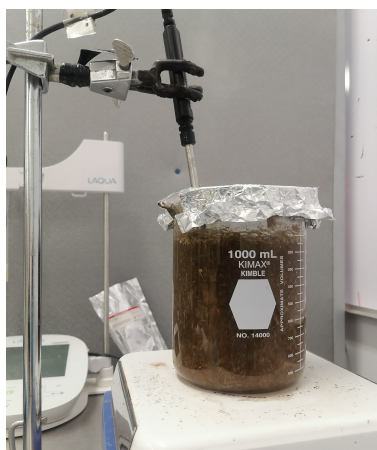


Figura 4.7: Pretratamiento ácido diluido.

En la Tabla 4.3 se pueden observar las condiciones que se establecieron durante el pretratamiento ácido.

Tabla 4.3: Condiciones experimentales de pretratamiento ácido diluido

| Pretratamiento | Tipo | Carga de biomasa | Carga de reactivo | Temperatura | Agitación | Tiempo | Volumen de solución |
|--|---------|------------------|-------------------|-------------|-----------|--------|---------------------|
| H ₂ SO ₄ al 5% (v/v) | Químico | 24 g - 4% (p/v) | 30 ml | 97 °C | 220 rpm | 60 min | 600 ml |

4.2.3. Pretratamiento álcali

En este pretratamiento se hizo uso de NaOH al 2% (p/v), se mantuvieron el volumen de solución de 600 ml y la carga de bagazo del 4% (p/v) como en el pretratamiento ácido debido a que se utilizó la misma instrumentación y pasos a seguir.

Materiales

Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Agua destilada

Instrumentación

- Balanza digital
- Probeta plástica de 100 ml
- Recipiente de vidrio
- Vaso de precipitado de 1000 ml
- Agitador magnético

- Sonda de temperatura
- Pala plástica

Procedimiento

Utilizando la ecuación 4.3 se puede obtener el peso de reactivo PR_{alcali} (en gramos) con relación al volumen de solución V_{total} y la carga en porcentaje de álcali C_{alcali} .

$$PR_{alcali} (g) = C_{alcali} \cdot V_{total} \quad (4.3)$$

Preparación de solución alcalina

La solución se preparó en un vaso de precipitado de 1000 ml de capacidad, se añadieron 600 ml de agua destilada para poder agregar la carga correspondiente de NaOH. La manipulación del NaOH se realizó en un recipiente de vidrio para poder pesar en una báscula y tomar la carga para el pretratamiento (Figura 4.8).

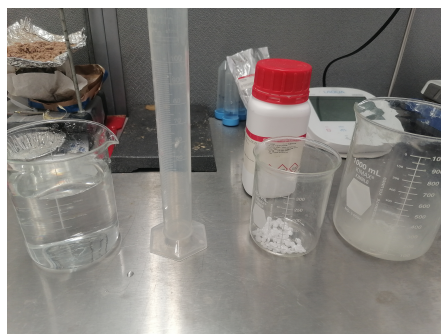


Figura 4.8: Preparación de solución con NaOH al 2% (p/v).

Posteriormente, se añadió el NaOH al vaso de precipitado. La solución se colocó en el agitador magnético con agitación constante para disolver las perlas del reactivo y se aumentó la temperatura hasta alcanzar la deseada (Figura 4.9).

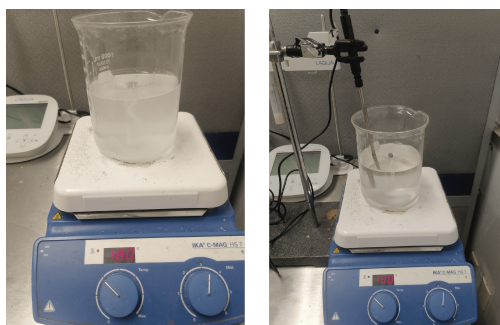


Figura 4.9: NaOH disuelto en agitador magnético e incremento de temperatura en solución álcali.

Tratamiento álcali diluido

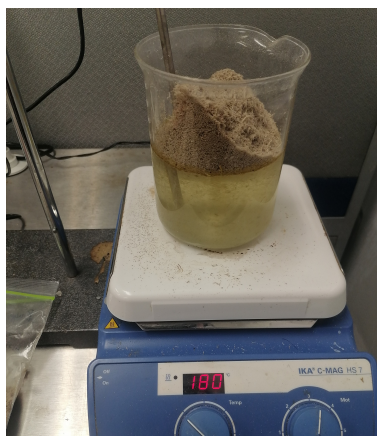


Figura 4.10: Incorporación de carga de bagazo al 4 % (p/v).

La temperatura de pretratamiento se ajustó a 97 °C durante los experimentos, cuando se alcanzó la temperatura deseada, se añadió la carga de bagazo del 4 % (p/v) como se observa en la Figura 4.10.

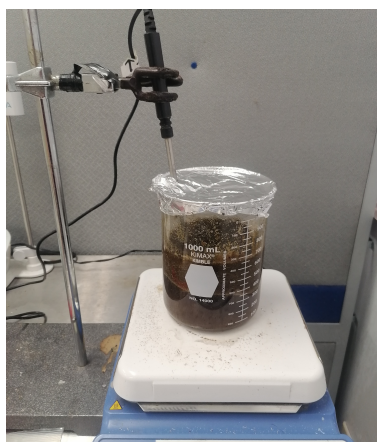


Figura 4.11: Pretratamiento álcali diluido.

El tiempo de estancia se comenzó a tomar al tener una incorporación completa del bagazo (Figura 4.11), el pretratamiento álcali se llevó a cabo durante 90 min como lo muestra Suárez et al. (2019).

Tabla 4.4: Condiciones experimentales de pretratamiento álcali diluido

| Pretratamiento | Tipo | Carga de biomasa | Carga de reactivo | Temperatura | Agitación | Tiempo | Volumen de solución |
|-------------------|---------|------------------|-------------------|-------------|-----------|--------|---------------------|
| NaOH al 2 % (p/v) | Químico | 24 g - 4 % (p/v) | 12 g | 97 °C | 220 rpm | 90 min | 600 ml |

Las condiciones de operación en este pretratamiento, que se obtuvieron experimentalmente, se muestran en la Tabla 4.4.

4.2.4. Pretratamiento biológico

El pretratamiento se realizó con un fertilizante orgánico (Figura 4.12) a base de lombrices de tierra lixiviada (BioFirmus), con una carga del 5% (p/v), en un volumen de 1000 ml y bajo condiciones anaerobias.



Figura 4.12: Humus de lombriz de tierras lixiviadas.

Materiales

Reactivos

- Humus de lombriz
- Agua destilada

Instrumentación

- Probeta plástica de 100 ml
- Matraz Erlenmeyer 1000 ml con tapa
- Incubadora
- Aguja hipodérmica
- Manguera clínica

Procedimiento

Por medio de la ecuación 4.4 se puede obtener la cantidad en gramos de carga de humus P_{humus} , con relación al volumen de solución V_{total} y la carga en porcentaje planteada CP_{humus} .

$$P_{humus} = CP_{humus} \cdot V_{total} \quad (4.4)$$

Preparación de medio con hummus

En el matraz de 1000 ml de capacidad se agregó el agua destilada y la carga de humus para acondicionar el medio de pretratamiento biológico. Por último, se agregó una carga de

bagazo menor a diferencia de los pretratamientos químicos, la carga fue del 3% (p/v) debido al recipiente utilizado (matraz Erlenmeyer) con el que no se lograba realizar una agitación adecuada usando una carga del 4% o superior.

El motivo de utilizar un matraz fue para acondicionar el pretratamiento en un ambiente anaerobio. El matraz se selló con una tapa para adaptar una trampa de aire usando una aguja hipodérmica y manguera con salida a un recipiente con agua, de manera que los gases generados sean expulsados y evitar la entrada de oxígeno (Figura 4.13).

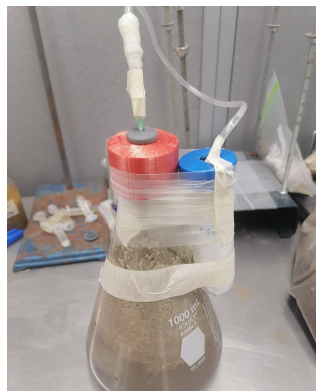


Figura 4.13: Acondicionamiento de medio anaerobio.

Tratamiento biológico

Para el pretratamiento se utilizó una cámara de incubación (agitador incubador Ecotron Infors HT), en donde se mantuvo el matraz en constante agitación y temperatura de 32 °C durante 14 días (Figura 4.14).



Figura 4.14: Pretratamiento biológico en cámara de incubación.

En la Tabla 4.5 se pueden observar las condiciones que se obtuvieron experimentalmente sobre el pretratamiento biológico.

Tabla 4.5: Condiciones experimentales de pretratamiento biológico

| Pretratamiento | Tipo | Carga de biomasa | Carga de humus | Temperatura | Agitación | Tiempo | Volumen de solución |
|-----------------------|-----------|---------------------|----------------|-------------|-----------|---------|---------------------|
| Humus al 5 % (p/v) | Biológico | 30 g - 3 % (p/v) | 50 g | 32 °C | 220 rpm | 14 días | 1000 ml |

4.3. Separación de fracciones

Después de realizar una técnica de pretratamiento se realiza la separación de las fracciones (sólida-líquido), la fracción sólida (biomasa pretratada) es con la que se sigue trabajando, mientras que la líquida contiene concentraciones altas del reactivo utilizado.

Materiales

- Matraz Kitasato de 500 ml
- Embudo büchner
- Bomba de succión
- Papel filtro

Procedimiento

Esta separación se hizo por método de filtrado al vacío utilizando la bomba de succión, embudo büchner, papel filtro y un kitasato como se muestra en la Figura 4.15.



Figura 4.15: Pretratamiento biológico en cámara de incubación.

El contenido proveniente del pretratamiento es vaciado en el embudo mientras se aplica succión, causando que la fracción líquida quede almacenada en el kitasato y el bagazo pretratado quede lo más seco posible Figura4.16.

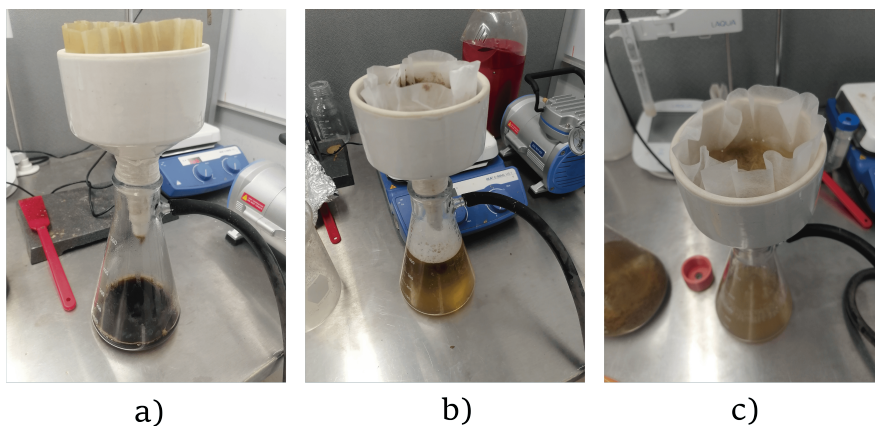


Figura 4.16: Filtración de biomasa proveniente de pretratamiento a) álcali, b) ácido y c) biológico.

4.4. Enjuagado de fracción sólida

El enjuague se realiza para eliminar la mayor parte rastros de reactivo en la biomasa pretratada.

Materiales

Reactivos

- Agua destilada

Instrumentación

- Vaso de precipitado de 1000 ml
- Agitador magnético
- Matraz Kitasato de 500 ml
- Embudo büchner
- Bomba de succión
- Papel filtro

Procedimiento

El bagazo se colocó en un vaso de precipitado con agua destilada y agitación durante 1 minuto aproximadamente, como se observa en la Figura 4.17.

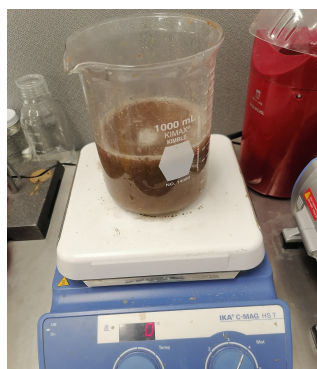


Figura 4.17: Enjuagado de bagazo posterior a la separación de fracciones.

Después de enjuagar el bagazo pretratado, se volvió a repetir la etapa de filtrado al vacío para drenar la mayor cantidad de humedad posible de la parte sólida, como se puede observar en la Figura 4.18, se logra reducir la concentración de reactivo que acompaña al bagazo.

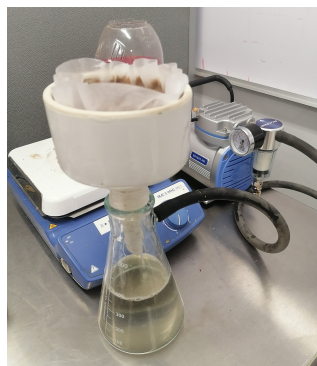


Figura 4.18: Filtrado de bagazo posterior al enjuagado.

El bagazo enjuagado y filtrado se coloca en una bandeja para llevarse a la etapa de secado y utilizarlo en la hidrólisis enzimática (Figura 4.19).

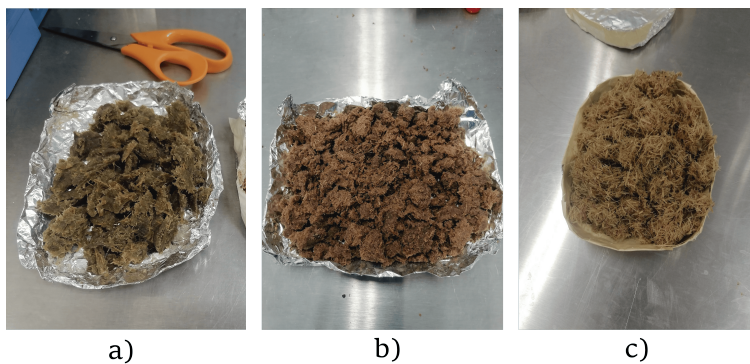


Figura 4.19: Bagazo filtrado y enjuagado después de pretratamiento a) álcali, b) ácido y c) biológico.

4.5. Secado

La etapa de secado se realizó para eliminar la humedad de la biomasa pretratada y poder realizar el proceso de hidrólisis.

Materiales

- Horno de secado con aire
- Recipiente de aluminio

Procedimiento

Al tener la parte sólida pretratada y filtrada, se colocó en un horno de secado con aire caliente (DHG-9030A marca LUZEREN) como se observa en la Figura 4.20, durante las pruebas se pudo observar que a una temperatura de 40 °C durante 12 horas se obtuvo un secado correcto sin llegar a quemar o sobre deshidratar el bagazo pretratado.



Figura 4.20: Secado de biomasa en horno de aire caliente.

4.6. Hidrólisis enzimática

En la etapa de hidrólisis enzimática se hizo uso la biomasa seca proveniente de cada uno de los pretratamientos propuestos, así como se muestra en la Figura 4.21 las etapas secuenciales hasta la hidrólisis.

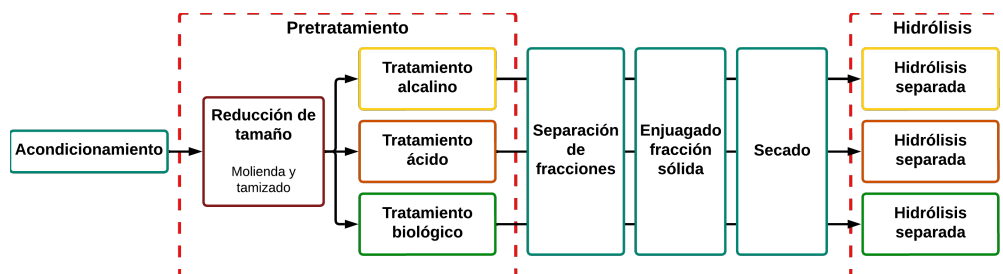


Figura 4.21: Secuencia de etapas del proceso hasta la hidrólisis enzimática.

Materiales

Reactivos

- Enzimas Cellic Ctec 2
- Bagazo seco pretratado
- Agua destilada
- Ácido cítrico
- Hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico

Instrumentación

- Micropipeta
- Puntas de micropipeta
- Pipeta
- Probeta plástica de 100 ml
- Vaso de precipitado de 500 ml
- Potenciómetro para pH
- Agitador magnético
- Matraz de 500 ml
- Incubadora

Procedimiento

En esta etapa se hizo uso de la mezcla enzimática Cellic Ctec2 de Sigma Aldrich (Figura 4.22), inicialmente con las dos cargas enzimáticas que se proponen en la Tabla 3.4.



Figura 4.22: Enzimas celulasas y hemicelulasas Cellic Ctec 2.

La carga de bagazo pretratado seco que se utilizó fue del 5% (p/v) con la que se pudo observar una agitación libre de interrupciones aplicando una agitación relativamente suave de 220 rpm. El volumen que se utilizó fue de 200 ml, esto con el fin de poder realizar los

experimentos por duplicado para garantizar confiabilidad en los resultados.

Para el funcionamiento correcto de las enzimas en la conversión de celulosa a glucosa se deben considerar dos variables importantes, las cuales son la temperatura y pH durante el proceso. El pH de operación se debe encontrar en un rango ligeramente ácido de 5 - 5.5, debido a que valores fuera de este rango reduce la actividad enzimática. Para obtener un valor de pH constante o con baja variación durante la hidrólisis se realizó un acondicionamiento previo de la biomasa, la primera técnica se hizo nivelando el pH hasta obtener el valor deseado con agua destilada como solución y la segunda que mostró mejores resultados fue usando una solución amortiguadora de pH (buffer).

4.6.1. Hidrólisis con acondicionamiento sin buffer

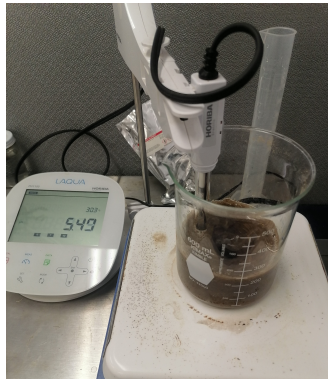


Figura 4.23: Medición de pH antes de hidrólisis.

En un vaso de precipitado de 500 ml se agregó 200 ml de agua destilada y posteriormente la carga de bagazo. El contenido se mantuvo bajo agitación en el agitador magnético durante 15 minutos, realizando la medición del pH con potenciómetro de mesa (Laqua PH1100) como se muestra en la Figura 4.23.

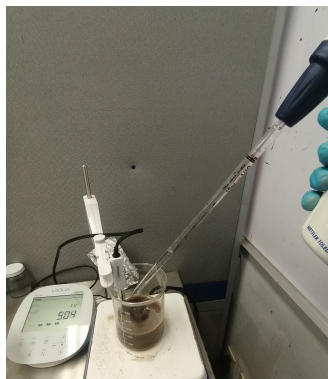


Figura 4.24: Ajuste de pH sin solución buffer.

El pH se ajustó con una solución ácida (HCL) y básica (NaOH). La solución base se usó

para incrementar el pH y la solución ácida para reducirlo según el valor inicial, la solución se suministró por medio de una pipeta por método de goteo (Figura 4.24).



Figura 4.25: Toma de carga enzimática usando micropipeta.

El contenido del vaso de precipitado se transfirió al matraz de 500 ml para el proceso de hidrólisis. Inicialmente, se probaron las dos cargas enzimáticas propuestas en la Tabla 3.4, con una micropipeta se tomaron las muestras correspondientes de la mezcla enzimática (Figura 4.25).



Figura 4.26: Incorporación de carga enzimática.

Enseguida de tomar la carga enzimática se añadió al matraz y se tapó utilizando papel aluminio para evitar contaminación durante el proceso (Figura 4.26).

El proceso se llevó a cabo en la cámara de incubación a temperatura de 50 °C y agitación constante durante 72 horas (Figura 4.27).

En la Tabla 4.6 se pueden observar las condiciones que se pudieron obtener experimentalmente durante la etapa de hidrólisis utilizando las dos cargas enzimáticas.



Figura 4.27: Incorporación de carga enzimática.

Tabla 4.6: Condiciones experimentales en hidrólisis sin uso de solución buffer

| Biomasa | Solución | Carga de biomasa | Carga enzimática | pH | Temperatura | Tiempo | Agitación |
|------------------------|--------------------------|------------------|----------------------------|----|-------------|----------|-----------|
| Bagazo seco pretratado | 200 ml de agua destilada | 10 g | 185 μ l 217 μ l | 5 | 50 °C | 72 horas | 220 rpm |

Al término del proceso se tomaron lecturas del pH y se pudo observar que hubo una variación con valores fuera de rango, por lo que la eficiencia de la hidrólisis fue de al menos un 40 % debido a los valores obtenidos. Derivado de lo observado se decidió utilizar una solución buffer para mantener el valor deseado con la menor variación como se observa enseguida.

4.6.2. Hidrólisis con acondicionamiento con buffer.

La solución buffer se realizó con 9.6 g de ácido cítrico en 500 ml de agua destilada, se mantuvo bajo agitación hasta disolverlo. El pH se ajustó con NaOH tomando los valores con el potenciómetro hasta obtener un valor de 5 en la solución (Figura 4.28).



Figura 4.28: Solución buffer.

Al contar con la solución buffer, en un vaso de precipitado de 500 ml se agregó 200 ml de solución buffer y la carga de bagazo. El vaso se colocó en el agitador magnético durante 15

minutos para observar si había un cambio en el valor de pH.

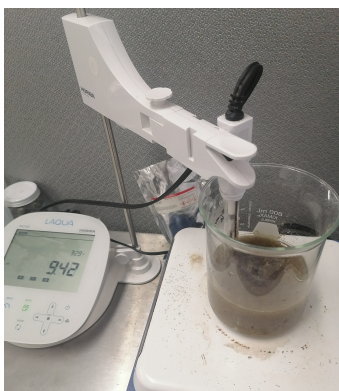


Figura 4.29: Medición de pH usando buffer.

En caso de existir valores fuera del rango requerido, se realiza el paso de ajuste de pH añadiendo la solución ácida o básica utilizando una pipeta como se especificó anteriormente (Figura 4.30).

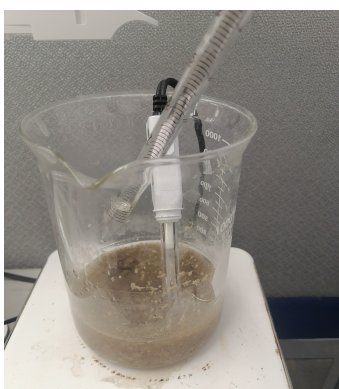


Figura 4.30: Medición de pH usando buffer.

El contenido del vaso de precipitado se traspasó a un matraz de 500 ml para poder agregar la carga enzimática. Para las pruebas usando el buffer se contempló usar la carga enzimática de 25 mg / gramo de bagazo ($21.7 \mu\text{l}$ / gramo de bagazo).

Tabla 4.7: Condiciones experimentales en hidrólisis usando solución buffer

| Biomasa | Solución | Carga de biomasa | Carga enzimática | pH | Temperatura | Tiempo | Agitación |
|------------------------|--------------------------|------------------|-------------------|----|-------------|----------|-----------|
| Bagazo seco pretratado | 200 ml de agua destilada | 10 g | $217 \mu\text{l}$ | 5 | 50 °C | 72 horas | 220 rpm |

Posteriormente, se tomó una muestra de enzimas utilizando una micropipeta y se añadió al matraz, por último se llevó a la cámara de incubación, donde se mantuvieron las condiciones que se muestran en la Tabla 4.7. El procedimiento fue el mismo que en el punto anterior,

el único cambio fue el uso de solución buffer.

La solución buffer permitió obtener una variación relativamente pequeña en el pH durante el proceso, de apenas ± 0.5 del valor requerido de 5, por lo que esta solución se utilizó para los posteriores experimentos en la hidrólisis enzimática para mantener las condiciones más favorables para las enzimas.

4.7. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica se realizó por duplicado directamente sobre el producto de la hidrólisis enzimática (hidrolizado), la secuencia de etapas hasta la fermentación se muestra en la Figura 4.31.

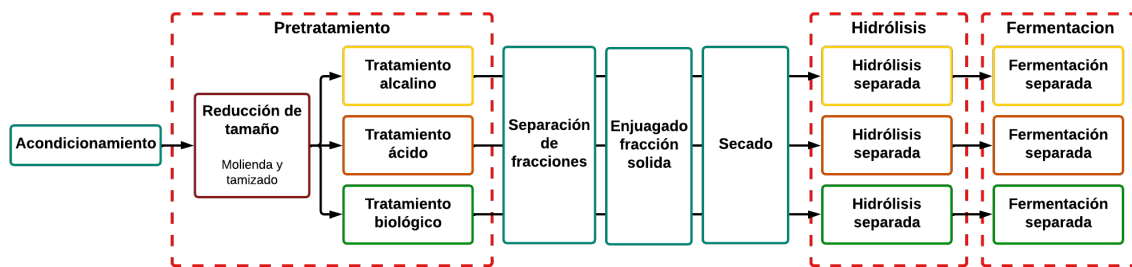


Figura 4.31: Secuencia de etapas hasta la fermentación alcohólica.

Materiales

Reactivos

-Cultivo de levaduras

Instrumentación

- Probeta plástica de 100 ml
- Pipeta
- Frasco de vidrio con tapa plástica
- Aguja hipodérmica y manguera clínica
- Cámara de incubación

Procedimiento

Después de la etapa de hidrólisis se tomó una muestra de 90 ml del hidrolizado utilizando una probeta como se observa en la Figura 4.32.

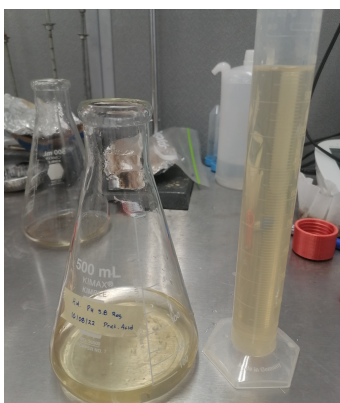


Figura 4.32: Toma de muestra de hidrolizado con probeta.

La muestra se añadió a una botella de vidrio de 150 ml para posteriormente tomar una muestra de 10 ml de levaduras cultivadas e inocularla en el hidrolizado, utilizando una pipeta como se muestra en la Figura 4.33.

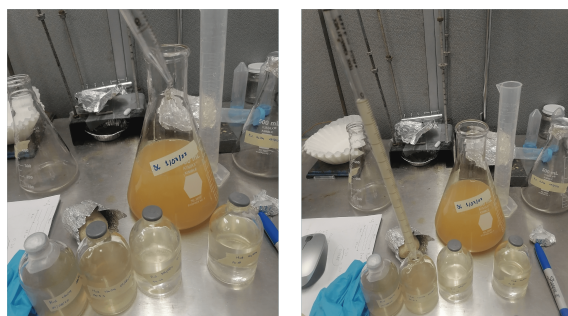


Figura 4.33: Inoculación de levaduras en hidrolizado.

Al utilizar levaduras, la producción de etanol se realiza en un medio anaerobio para garantizar la salida de CO_2 y evitar la entrada de oxígeno, lo cual puede causar contaminación durante la fermentación. Las botellas se sellaron y se les adaptó una trampa de oxígeno similar a la del pretratamiento biológico (Figura 4.34).



Figura 4.34: Acondicionamiento de medio anaerobio con trampa de aire.

La fermentación se realizó en la cámara de incubación a 30 °C con agitación constante como se muestra en la Figura 4.35 y las condiciones obtenidas experimentalmente se muestran en la Tabla 4.8.



Figura 4.35: Proceso de fermentación en incubadora.

Tabla 4.8: Condiciones experimentales de fermentación alcohólica

| Hidrolizado | volumen de hidrolizado | Volumen de inóculo | Temperatura | Tiempo | Condición de operación | Agitación |
|-------------------------|------------------------|----------------------------------|-------------|--------|------------------------|-----------|
| Fracción sólida-líquida | 90 ml | 10 ml (<i>Saccharomyces</i> 3C) | 30 °C | 7 días | Medio anaerobio | 180 rpm |

4.8. Configuración SFS

Después de comprender y analizar un proceso de producción de etanol por etapas separadas, se continuó con la configuración SFS. Las etapas que se lograron ubicar son las mismas, desde el acondicionamiento, pretratamiento, filtrado, enjuagado y secado, con la única diferencia en la hidrólisis y fermentación que se realizan en un mismo proceso, como se muestra en la Figura 4.36.

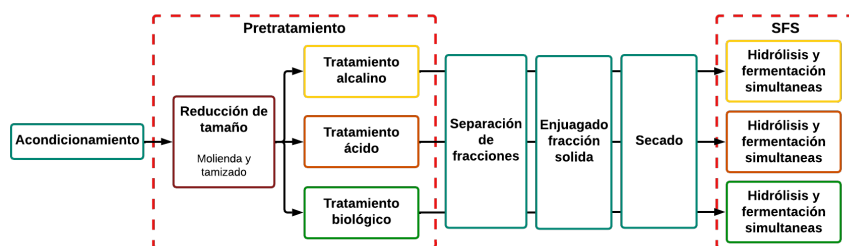


Figura 4.36: Etapas en configuración SFS.

Durante los experimentos con la configuración SFS se efectuó por duplicado utilizando la

biomasa pretratada con NaOH, H₂SO₄ y hummus con las mismas condiciones de operación de pretratamiento que se muestran la sección 4.2.

Materiales

Reactivos

- Enzimas Cellic Ctec 2
- Agua destilada
- Ácido cítrico
- Hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico

Instrumentación

- Micropipeta
- Puntas de micropipeta
- Pipeta
- Probeta plástica de 100 ml
- Vaso de precipitado de 500 ml
- Potenciómetro para pH
- Agitador magnético
- Matraz de 500 ml
- Manguera clínica
- Incubadora

Procedimiento

El volumen que se utilizó para realizar la hidrólisis y fermentación simultáneas fue de 100 ml de solución buffer con una carga de bagazo seco pretratado del 5% (p/v) que demostró buenos resultados en la configuración HFS. Como primer paso se acondicionó la biomasa con solución buffer a un pH 5 debido al uso de enzimas (Figura 4.37).

Al contar con el pH requerido se añadió la carga enzimática de 18.5 μ l / gramo de bagazo seco (20 UPF / gramo de bagazo seco) con ayuda de la micropipeta y posteriormente se inocularon 10 ml de cultivo de levadura usando la pipeta. El proceso se realizó bajo condiciones anaerobias, por lo que se adaptó una trampa de aire en cada experimento (Figura 4.38).

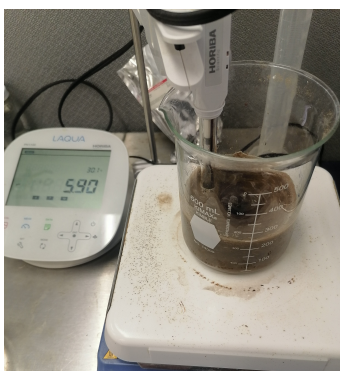


Figura 4.37: Acondicionamiento de pH para proceso SFS.



Figura 4.38: Acondicionamiento de medio anaerobio en proceso SFS.

Por último, el proceso se llevó a cabo en la cámara de incubación a una temperatura de 37 °C y agitación constante durante 48 horas, como se observa en la Figura 4.39.



Figura 4.39: Proceso de SFS en cámara de incubación.

En la Tabla 4.9 se muestran las condiciones que se obtuvieron experimentalmente para la configuración SFS.

Tabla 4.9: Condiciones experimentales de configuración SFS

| Volumen de solución | Biomasa pretratada seca | Carga enzimática | pH | Inóculo | Temperatura | Tiempo | Agitación | Ambiente |
|---------------------|-------------------------|------------------------------------|----|---------|-------------|---------------|-----------|-----------|
| 100 ml de buffer | 5 g | 92.5 μ l (20 UPF/g de biomasa) | 5 | 10 ml | 37 °C | 48 h (2 días) | 180 rpm | Anaerobio |

4.9. Lectura de producto final

La lectura de los resultados de las pruebas experimentales se realizó hasta el término del proceso cuando se obtuvo etanol. La instrumentación utilizada fue un refractómetro con el cual se pueden medir el contenido de alcohol que presenta una solución alcohólica o alcoholes de todo tipo (Figura 4.40).

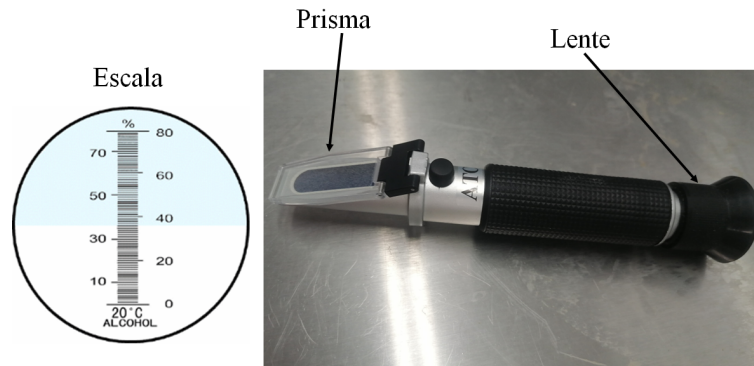


Figura 4.40: Refractómetro para medir volumen de alcohol.

Materiales

- Refractómetro para alcohol
- Pipeta

Procedimiento



Figura 4.41: Uso de refractómetro para medir el volumen de alcohol.

Después del término del proceso se tomó una muestra con ayuda de la pipeta que se colocó en el prisma, al observar por el lente se obtiene una escala del contenido de alcohol en la solución, de esta manera se obtuvo el porcentaje en volumen de alcohol producido y se evaluaron los resultados de las pruebas experimentales (Figura 4.41).

4.9.1. Conclusiones del capítulo

En este capítulo se presentó la parte experimental desde el pretratamiento hasta la fermentación. En la sección de pretratamiento se adaptaron las condiciones de operación como la temperatura, ya que no se alcanzó la planteada y se observa la influencia del tamaño de partícula y carga de biomasa en la agitación para conseguir un pretratamiento uniforme y garantizar fiabilidad de resultados, puesto que se realizó por duplicado la hidrólisis y fermentación utilizando la biomasa pretratada.

Durante la hidrólisis en las primeras pruebas se realizaron lecturas del pH al inicio y final del proceso, se observó que al finalizar el valor se encontraba fuera del rango de 5-5.5 siendo este donde las enzimas desempeñan una máxima conversión de azúcares fermentables. Derivado de la problemática se decidió buscar una solución, la cual fue utilizar una solución amortiguadora de pH, con la que se logró mantener valores dentro del rango requerido.

Como primer acercamiento basándose en la literatura se logró obtener una producción máxima de etanol del 15% una vez que se cada etapa se realizó correctamente y se documentaron los pasos y condiciones de operación que mostraron los mejores resultados.

Capítulo 5

Resultados

A continuación se presentan los resultados de los diferentes pretratamientos realizados, su comparativa de etanol producido, así como también las pruebas realizadas sobre las principales variables ubicadas que pueden afectar el rendimiento final en todo el proceso en las etapas separadas y simultáneas.

Las pruebas se realizaron utilizando el pretratamiento álcali con NaOH, y las principales etapas en donde se planteó el diseño de experimentos fue durante el pretratamiento, hidrólisis en configuración HFS y en la configuración SFS.

5.1. Etanol obtenido por pretratamiento

Cuando se establecieron las condiciones de operación necesarias para cada pretratamiento y las etapas posteriores hasta la fermentación, se realizó la comparativa para identificar el pretratamiento que obtuvo mejores resultados.

5.1.1. Configuración HFS

En la Figura 5.1 se muestra el porcentaje de producción de etanol con cada pretratamiento empleado, de misma manera se observó que en las pruebas, cuando no se usó solución buffer en la hidrólisis, el pH se midió al finalizar esta etapa y se observó que se tenían valores fuera del rango de 5-5.5, por lo que obtuvieron bajos rendimientos en la producción de azúcares producidos y, por lo tanto, en la fermentación bajos rendimientos de etanol. Cuando se hizo uso de una solución buffer se obtuvo un incremento en el rendimiento de etanol por cada pretratamiento.

Se observa que en cuanto a pretratamientos destaca en el que se usó NaOH, eso quiere decir que se logró descomponer la estructura y reducir los porcentajes de lignina del bagazo más eficientemente que con el uso de H_2SO_4 y el hummus.

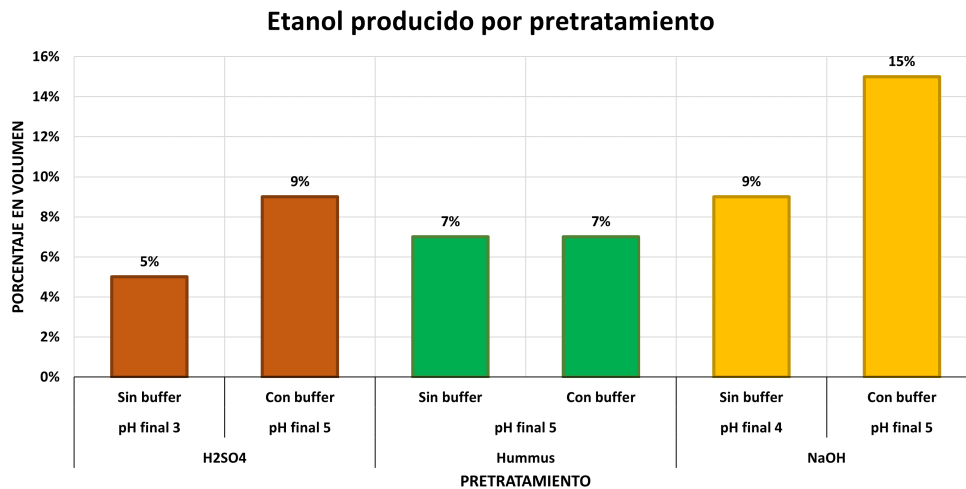


Figura 5.1: Producción de etanol por pretratamiento y uso de solución buffer.

5.1.2. Configuración SFS

Cada pretratamiento se probó utilizando la configuración SFS para observar los porcentajes de etanol producidos como se muestra en la Figura 5.2, las pruebas experimentales se centraron en analizar los resultados con las condiciones de operación establecidas y comparar los porcentajes contra la producción por etapas separadas.

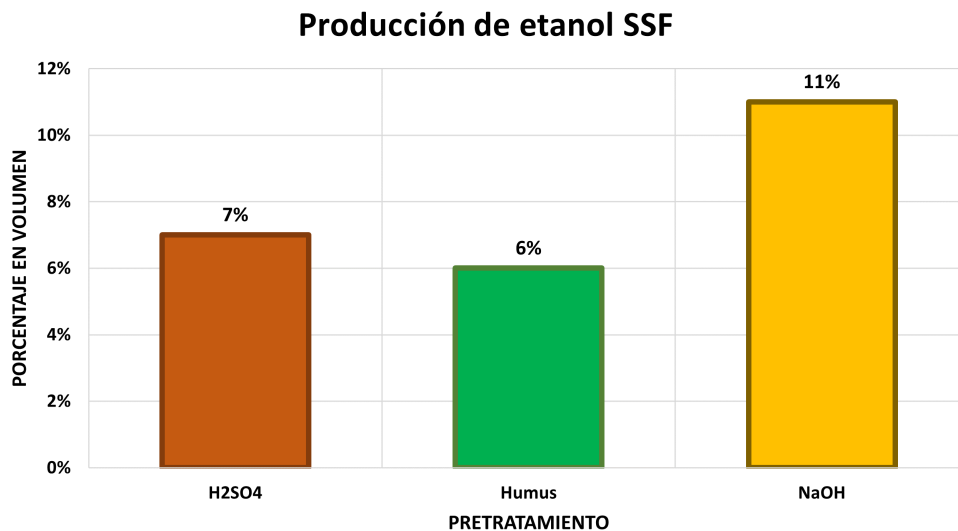


Figura 5.2: Producción de etanol por pretratamiento usando una configuración SFS.

Se muestra que de misma manera el pretratamiento usando NaOH tiene mayores porcentajes de etanol obtenido al final del proceso, pero a diferencia con un proceso de etapas separadas se obtuvieron menores porcentajes de etanol, debido a las condiciones de operación en las etapas simultáneas que fue una temperatura de 37 °C, ya que se busca un balance entre la temperatura óptima de las enzimas que es de 50 °C y la de las levaduras de 30 °C.

5.2. Manipulación de variables en etapas separadas

En esta sección se muestra la manipulación de las variables experimental de las principales variables en el proceso de producción, las cuales son la temperatura y pH. El diseño de experimentos se realizó en las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática.

5.2.1. Temperatura en pretratamiento

Se trabajó con el pretratamiento con NaOH, que fue con el que se obtuvieron mejores resultados en producción de etanol. En la Tabla 5.1 se muestra la manipulación de la temperatura en la etapa de pretratamiento, manteniendo las demás condiciones para observar si existe un cambio de resultados positivo o negativo utilizando tres temperaturas, las cuales fueron 50, 97 y 121 °C.

Tabla 5.1: Pretratamiento con NaOH utilizando tres niveles de temperatura

| Pretratamiento | Volumen de solución | Carga de reactivo | Carga de bagazo | Temperatura | Tiempo | Agitación | Equipo |
|------------------|---------------------|-------------------|-----------------|-------------|--------|-----------|--------------------|
| NaOH al 2% (p/v) | 600 ml | 12 g | 24 g | 97 °C | 90 min | 220 rpm | Agitador magnético |
| | 600 ml | 12 g | 24 g | 50 °C | 90 min | 220 rpm | Agitador magnético |
| | 600 ml | 12 g | 24 g | 121 °C | 90 min | NA | Autoclave |

Después de cada pretratamiento, la biomasa se hidrolizó por duplicado utilizando dos cargas enzimáticas, la utilizada inicialmente de 21.7 μ l/gramo de bagazo y una carga mayor de 37 μ l/gramo de bagazo, con el fin de analizar si se tenía un incremento de rendimiento en el producto final. En la Tabla 5.2 se muestran las condiciones de operación durante la hidrólisis.

Tabla 5.2: Hidrólisis bajo dos cargas enzimáticas en biomasa pretratada con NaOH a diferentes temperaturas

| Biomasa pretratada | Volumen de solución | Carga de bagazo | Carga enzimática | Temperatura | pH | Tiempo | Agitación |
|----------------------------|---------------------|-----------------|----------------------------|-------------|----|--------|-----------|
| Bagazo pretratado a 97 °C | 200 ml | 10 g | 217 μ l 370 μ l | 50 °C | 5 | 72 h | 220 rpm |
| Bagazo pretratado a 50 °C | 200 ml | 10 g | 217 μ l 370 μ l | 50 °C | 5 | 72 h | 220 rpm |
| Bagazo pretratado a 121 °C | 200 ml | 10 g | 217 μ l 370 μ l | 50 °C | 5 | 72 h | 220 rpm |

La fermentación se realizó con las condiciones establecidas anteriormente en la Tabla 4.8, al término del proceso se realizaron las mediciones de etanol obtenido. Como se observa en la

Figura 5.3 la temperatura de pretratamiento de 50 °C muestra una reducción en el rendimiento final, mientras que al usar la temperatura de 97 °C que se determinó experimentalmente se tiene un mayor aprovechamiento, por otra parte, se observa que a una temperatura de 121 °C no se logra superar el porcentaje de conversión esto debido a que para alcanzar esta temperatura deseada se utilizó de equipo un autoclave en donde no se contó con algún tipo de agitación durante la etapa limitando la conversión de la biomasa.

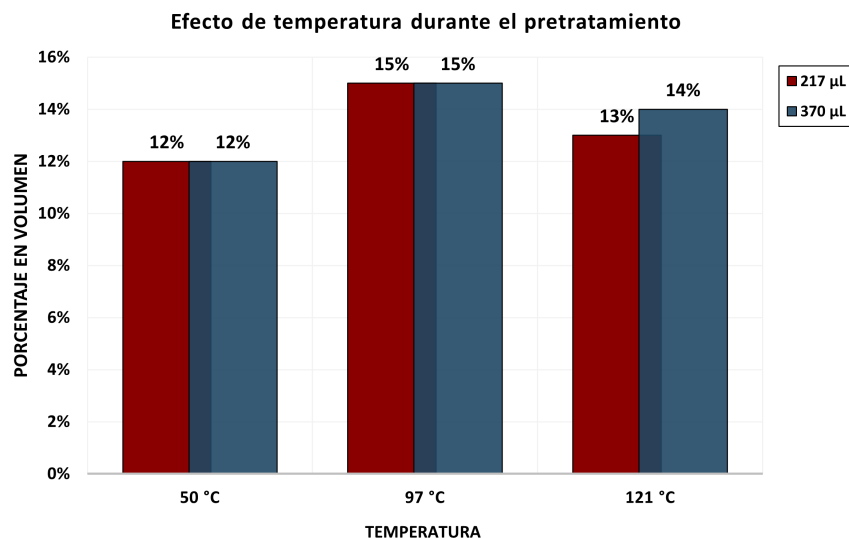


Figura 5.3: Producción de etanol por pretratamiento usando una configuración SFS.

Se observó que al incrementar la carga enzimática en un 70.5% no se obtuvo un incremento en la conversión a etanol, únicamente con biomasa pretratada a 121 °C, obteniendo un incremento no tan significativo.

5.2.2. Efecto del pH durante la hidrólisis enzimática

Durante la etapa de hidrólisis se observó el impacto del pH al no tener control sobre la variable debido a su sensibilidad, por lo que para hacer una evaluación más completa sobre su impacto y comportamiento, se efectuó la etapa de hidrólisis a diferentes pH para observar el efecto en el producto final.

Tabla 5.3: Manipulación de pH en hidrólisis enzimática

| Biomasa | Volumen | Carga de biomasa | Carga enzimática | pH | Temperatura | Tiempo | Agitación |
|---------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|----|-------------|----------|-----------|
| Bagazo seco pretratado con NaOH | 200 ml de solución buffer | 10 g | 217 µl | 3 | 50 °C | 72 horas | 220 rpm |
| | | | | 4 | | | |
| | | | | 5 | | | |
| | | | | 6 | | | |
| | | | | 7 | | | |

La biomasa se pretrató con NaOH con las condiciones establecidas experimentalmente en la Tabla 4.4. El pH se modificó en el paso de acondicionamiento, donde se utilizaron los valores que se muestran en la Tabla 5.3 haciendo uso de solución buffer para mantenerlo durante todo el proceso de hidrólisis.

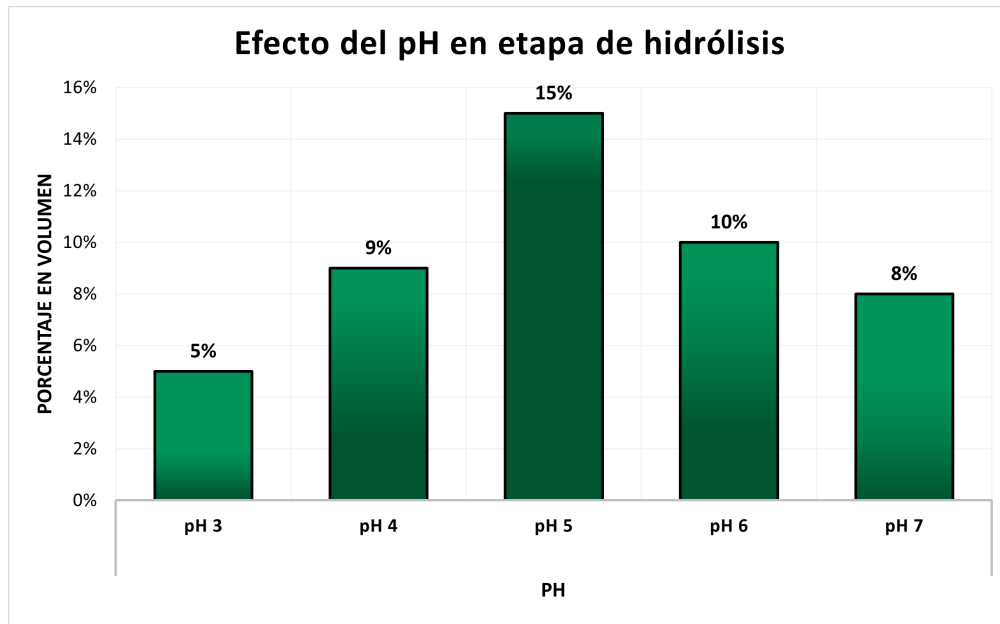


Figura 5.4: Efecto del pH durante la hidrólisis enzimática.

En la Figura 5.4 se muestra el resultado de la hidrólisis enzimática a diferentes valores de pH, al alejarse del valor óptimo se muestra una reducción importante del rendimiento de etanol, al estar un valor hacia un pH básico o ácido se reduce de un 15 % a 10 % el etanol obtenido y al alejarse más del pH óptimo, se reduce drásticamente el aprovechamiento durante la hidrólisis enzimática.

5.3. Manipulación de variables en etapas simultáneas

Durante la configuración SFS, unos de los principales retos en el proceso es la temperatura de operación, mientras que el pH no afecta a las levaduras, ya que toleran rangos amplios y se desarrollan de mejor manera en ambientes ligeramente ácidos.

Se realizó un diseño de experimentos por duplicado sobre la temperatura de operación para observar el impacto en la producción de etanol. En la Tabla 5.4 se muestran las condiciones de operación utilizando dos cargas enzimáticas a tres temperaturas distintas de 31, 37 y 43 °C, la biomasa pretratada se realizó como en la sección 4.2.3 con NaOH.

Tabla 5.4: Manipulación de temperatura en configuración SFS

| Biomasa | Volumen | Carga de biomasa | Carga enzimática | Inoculo | pH | Temperatura | Tiempo | Agitación |
|---------------------------------|--------------------------|------------------|------------------|---------|----|-------------|---------------|-----------|
| Bagazo seco pretratado con NaOH | 100 ml de buffer citrato | 5 g | 93 μ l | 10 ml | 5 | 31 °C | 48 h (2 días) | 220 rpm |
| | | | | | | 37 °C | | |
| | | | | | | 43 °C | | |
| Bagazo seco pretratado con NaOH | 100 ml de buffer citrato | 5 g | 109 μ l | 10 ml | 5 | 31 °C | 48 h (2 días) | 220 rpm |
| | | | | | | 37 °C | | |
| | | | | | | 43 °C | | |

En la Figura 5.5 se observa el comportamiento de la producción de etanol a las distintas temperaturas, a 43 °C se muestra un incremento considerable porcentaje de producto obtenido debido a que se encuentra más cerca de la temperatura óptima de las enzimas, mientras que las levaduras demostraron una tolerancia bajo estas condiciones. Por otra parte, a 31 °C se redujo el aprovechamiento por parte de las enzimas e impactando en el producto final.

Las distintas cargas no demostraron una variación considerable en los resultados, por lo que se observó que no es necesario incrementar la carga enzimática debido a que no se tiene una producción mayor de etanol, lo que puede repercutir en el incremento de costos de operación con el mismo rendimiento de etanol.

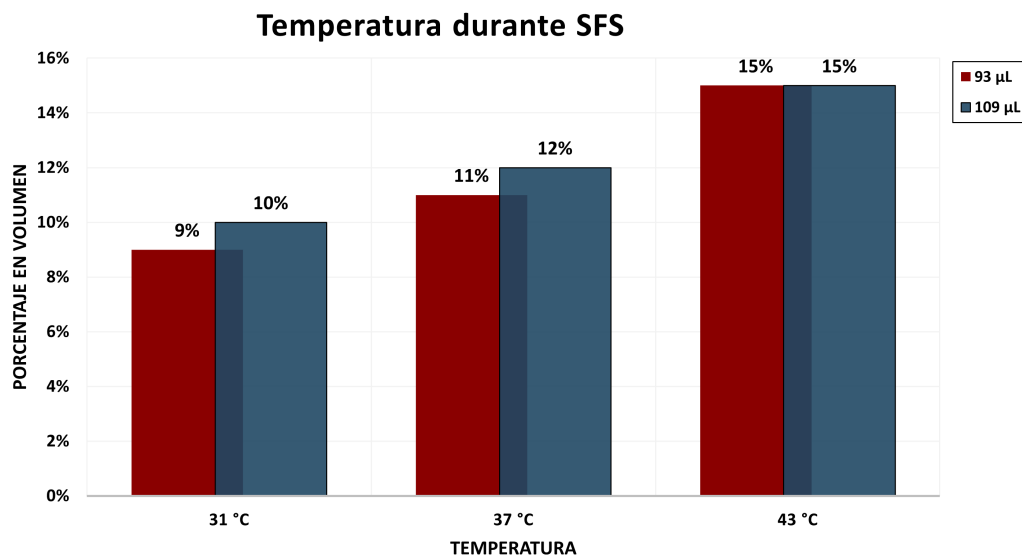


Figura 5.5: Efecto de la temperatura durante la configuración de sacarificación y fermentación simultáneas.

5.4. Variables en etapas del proceso

5.4.1. Etapas separadas

Durante las pruebas experimentales se pudieron establecer las principales condiciones que pueden limitar el proceso de producción de bioetanol, se determinó que la temperatura y la velocidad que provoca la agitación son variables que están presentes durante las etapas de pretratamiento, hidrólisis y fermentación, por lo que son una parte clave y se deben mantener durante el proceso con la menor variación posible.

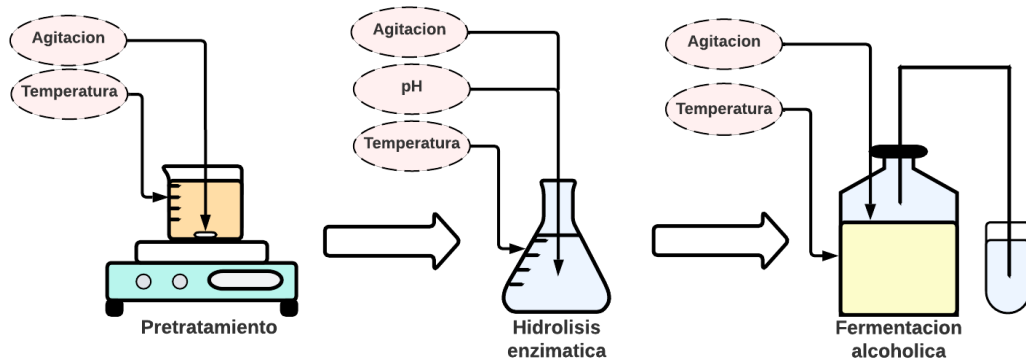


Figura 5.6: Variables en proceso HFS.

En la Figura 5.6 se muestran las etapas en donde intervienen las variables principales, la temperatura y agitación se encuentran en todo el proceso, mientras que el pH presenta mayor importancia durante la etapa de hidrólisis debido a las condiciones óptimas de las enzimas, mientras que en la fermentación se tiene un rango amplio de operación por lo que su impacto es mínimo.

Tabla 5.5: Rango de condiciones obtenidas experimentalmente en proceso HFS

| Variables | | Pretratamiento | Hidrólisis | Fermentación |
|-------------------|-------------|--|--------------------|------------------------|
| Configuración HFS | Agitación | Partícula ≤ 5 mm y carga de biomasa 4 - 5 % (p/v) | Carga de 5 % (p/v) | 90 % (v/v) hidrolizado |
| | pH | - | 5 - 5.5 | 4.5 - 6.5 |
| | Temperatura | Químico 97 °C, biológico 32 °C | 45 - 50 °C | 30 - 33 °C |

En la Tabla 5.5 se muestran los rangos en las variables principales por cada etapa en el proceso de obtención de bioetanol a escala laboratorio, con el que se presentaron los mejores resultados, utilizando la configuración por etapas separadas.

5.4.2. Etapas simultáneas

En la configuración de etapas simultáneas se elimina una etapa, por lo que se reduce el tiempo de operación, instrumentación y energía, experimentalmente se ubican las variables de agitación, temperatura y pH durante las dos fases que tiene esta configuración y se muestra en la Figura 5.7.

La diferencia con las etapas separadas es que se tiene que la hidrólisis y fermentación simultánea presenta importancia en las condiciones óptimas de pH y temperatura, debido al uso de los dos microorganismos en un solo proceso y se debe efectuar sin afectar el comportamiento de alguno de estos. Mantener la temperatura en un rango de operación es crucial para evitar la inactivación de las levaduras o enzimas debido a su sensibilidad térmica, y al igual que en la configuración de etapas separadas, el pH afecta directamente sobre las enzimas.

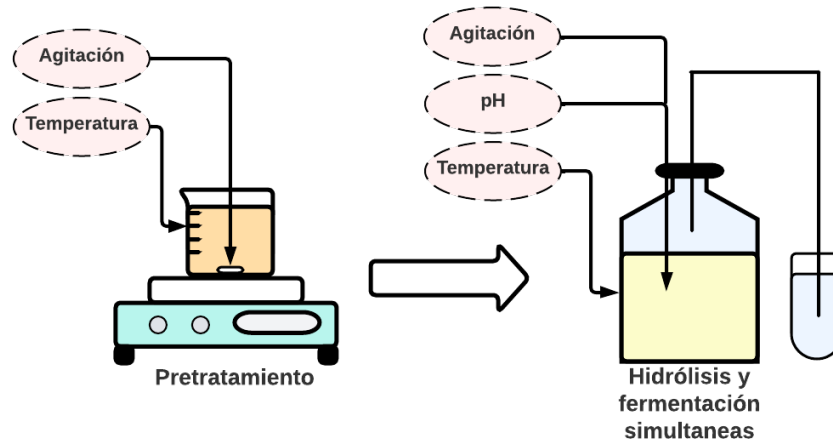


Figura 5.7: Variables en proceso SFS

En la Tabla 5.6 se muestran los rangos en las variables principales por cada etapa en el proceso de obtención de bioetanol a escala laboratorio, donde se obtuvieron los mejores resultados, utilizando la configuración de etapas simultáneas.

Tabla 5.6: Rango de condiciones obtenidas experimentalmente en proceso SFS

| Variables | Pretratamiento | Hidrólisis y fermentación |
|-------------------|----------------|---|
| Configuración SFS | Agitación | Partícula ≤ 5 mm y carga de biomasa 4 - 5% (p/v) |
| | pH | Carga de 5% (p/v) 5 - 5.5 |
| | Temperatura | Químico 97 °C, biológico 32 °C |

5.4.3. Objetivos de control

Durante el proceso de conversión de biomasa a bioetanol de segunda generación, el recipiente más adecuado es un reactor por lotes (batch), como se observó durante la etapa de pretratamiento, al requerir temperaturas más altas se necesita un equipo que lo pueda garantizar al soportar mayor presión y al ser un sistema cerrado ayuda a la preservación de temperatura durante la reacción. Así mismo, para mejorar la agitación se utiliza un sistema de palas o turbinas durante las etapas, lo que garantiza una mayor permeabilidad y conversión de la biomasa.

Las etapas de hidrólisis y fermentación son las que presentan mayor sensibilidad a la temperatura, y con tiempos de residencia de días, por lo que estas etapas no son compatibles para un sistema de reactores continuos, debido a que los reactores por lotes permiten un mantener condiciones de operación con la menor variación por tiempos prolongados, aparte de proporcionar un beneficio en la reducción de contaminación del producto final.

En términos de escalamiento del proceso no es posible utilizar la misma instrumentación que a nivel laboratorio, al aumentar el volumen de trabajo es importante tener un buen sistema de agitación y recipiente que permita obtener mayor temperatura y, por lo tanto, presión, así como un ambiente con condiciones controladas sin riesgo de contaminación. En la Figura 5.8 se muestra el diagrama de un reactor batch y la instrumentación requerida durante las etapas (pretratamiento, hidrólisis y fermentación), también se observan las variables controlables que se establecieron como cruciales.

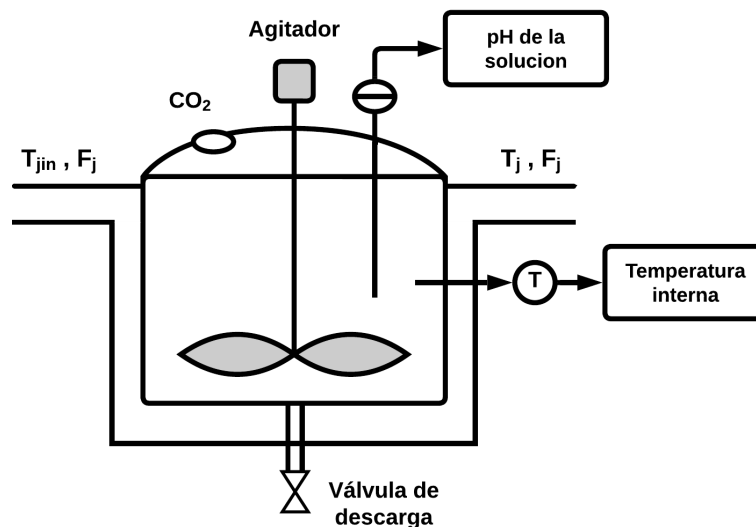


Figura 5.8: Variables en reactor batch.

Durante las etapas de pretratamiento, hidrólisis y fermentación, se requiere que los cambios en las variables sean graduales, evitando dinámicas con cambios repentinos que puedan

interrumpir el proceso por muerte de los microorganismos empleados y se puedan mantener las condiciones con la menor variación posible, al tratarse de procesos biológicos y químicos.

Utilizando el diagrama del reactor, se propone un controlador en la temperatura interna T_{ir} del reactor (Figura 5.9), la temperatura interna es medida con sensor de temperatura, donde se compara con la temperatura deseada y el controlador manipula el flujo de agua F_j y la temperatura de este flujo T_{jin} en el subsistema chaqueta que cubre al reactor, para hacer una transferencia de calor hacia el sistema reactor. Adicional se considera una perturbación en el interior del reactor debido a que se tienen reacciones exotérmicas por el uso de reactivos ácidos y base, que pueden modificar dicha variable durante el proceso.

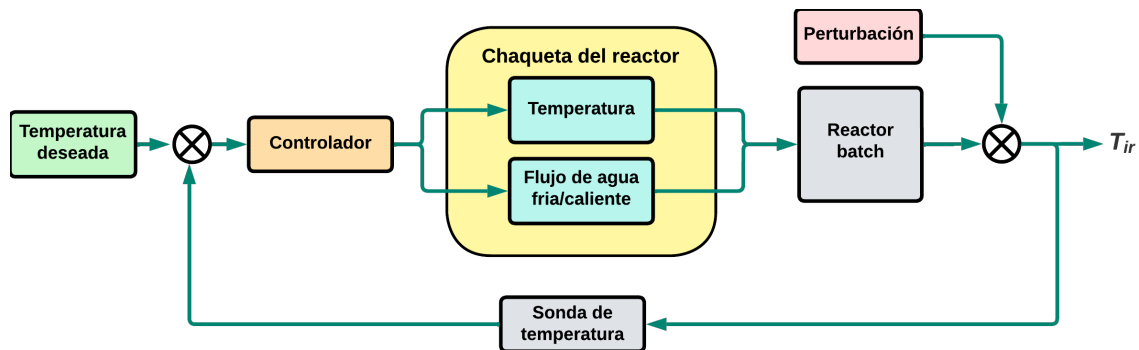


Figura 5.9: Diagrama de control de temperatura en biorreactor.

Posteriormente, se considera un controlador en el pH de la solución P_{sol} (Figura 5.10). Durante las pruebas experimentales sobre la variable se pudo observar que no se tenía una relación con los cambios efectuados en la temperatura, por lo que se puede contemplar en el proceso como un controlador independiente en el rango de temperatura que se estuvo trabajando durante la etapa de hidrólisis enzimática y fermentación.

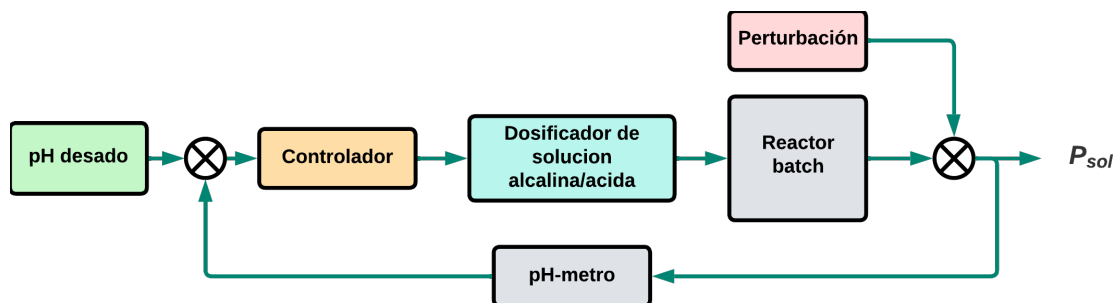


Figura 5.10: Diagrama de control de pH en biorreactor.

El diagrama del controlador se compone por un pH-metro que censa P_{sol} y lo compara con el valor requerido de pH, el controlador manipula el flujo de un subsistema que se encarga de dosificar solución alcalina y/o ácida respectivamente en la solución del reactor para mantener un pH con la menor variación posible. Se considera una perturbación dentro del reactor debido a que durante la etapa de hidrólisis y fermentación se tiene liberación de subproductos, que modifican la solución hacia un pH ácido o alcalino.

5.5. Evaluación de costo del proceso experimental

La evaluación de costos se realizó de acuerdo con los reactivos utilizados a nivel laboratorio y las cantidades propuestas en cada etapa.

5.5.1. Costo total de reactivos en pretratamiento

Se realizó un estimado del costo total de reactivos utilizados durante el proceso de producción de bioetanol. En la Tabla 5.7 se muestran los reactivos utilizados durante los tres tipos de pretratamientos, así como también sus cantidades y costos correspondientes.

Tabla 5.7: Costo de reactivos utilizados en pretratamiento

| Reactivo | Contenido | Costo |
|--------------------|-----------|----------|
| Hummus | 40 Kg | \$ 250 |
| Ácido sulfúrico | 1 L | \$ 1,919 |
| Hidróxido de sodio | 500 g | \$ 1,419 |
| Agua destilada | 20 L | \$ 160 |

A partir de los datos anteriores se propuso un volumen de pretratamiento igual para los tres tipos de 1 litro y su carga correspondiente de reactivo, con el que se estimó el costo por pretratamiento como se muestra en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8: Costo de reactivos usados por pretratamiento en un volumen de 1 L

| Pretratamiento | Volumen | Concentración de reactivo | Costo total de pretratamiento |
|--------------------------|---------|---------------------------|-------------------------------|
| Pretratamiento biológico | 1 L | 5 % (p/v) | \$ 8.3 |
| Pretratamiento ácido | | 5 % (v/v) | \$ 104 |
| Pretratamiento álcali | | 2 % (p/v) | \$ 64 |

5.5.2. Costo total de reactivos en hidrólisis enzimática

Para la estimación del costo total de reactivos utilizados durante la hidrólisis enzimática en la Tabla 5.9 se muestran los costos y cantidades de cada reactivo utilizado.

Tabla 5.9: Costo de reactivos utilizados en hidrólisis enzimática

| Reactivo | Contenido | Costo |
|---------------------------------|-----------|----------|
| Mezcla enzimática Cellic Ctec 2 | 50 ml | \$ 3,047 |
| Ácido cítrico | 1 Kg | \$ 175 |
| Agua destilada | 20 L | \$ 160 |
| Hidróxido de sodio | 500 g | \$ 1,419 |

Para la estimación del costo de la hidrólisis enzimática se utilizó un volumen de 600 ml debido a que después del pretratamiento se tiene una disminución de biomasa de aproximadamente del 25 %, en la Tabla 5.10 se muestra el costo total de la etapa.

Tabla 5.10: Costo de reactivos en la hidrólisis enzimática usando un volumen de 600 ml

| Volumen de solución buffer | Costo aprox. solución | Carga de biomasa | Carga enzimática | Costo total de hidrólisis |
|----------------------------|-----------------------|------------------|----------------------------------|---------------------------|
| 600 ml | \$ 63.9 | 5 % (p/v) | 651 μ L (25 mg/g de biomasa) | \$ 103.5 |

5.5.3. Costo total de reactivos en fermentación alcohólica

Para la estimación del costo total de reactivos utilizados durante la fermentación alcohólica se tomaron los costos y cantidades correspondientes como se muestra en la Tabla 5.11.

Tabla 5.11: Costo de reactivos utilizados en fermentación alcohólica

| Reactivo | Contenido | Costo |
|----------------------|-----------|----------|
| Agua destilada | 20 L | \$ 160 |
| Extracto de levadura | 450 g | \$ 995 |
| Peptona | 450 g | \$ 1,000 |
| Glucosa | 500 g | \$ 1,000 |

En la Tabla 5.12 se muestra el costo total de la etapa de fermentación utilizando el volumen total de 600 ml del hidrolizado a fermentar con él inóculo de levadura.

Tabla 5.12: Costo total de reactivos usados en el proceso de fermentación usando un volumen total de 600 ml

| Volumen total | Hidrolizado | Volumen de inóculo | Costo total de fermentación |
|---------------|-------------|--------------------|-----------------------------|
| 600 mL | 540 mL | 60 mL | \$ 6.9 |

5.5.4. Costo total por pretratamiento

En la Tabla 5.13 se muestra el costo total del proceso de producción de etanol por cada pretratamiento hasta la etapa de fermentación, contemplando los costos de reactivos utilizados durante las pruebas experimentales a nivel laboratorio.

Tabla 5.13: Costo total de reactivos utilizados en la producción por cada pretratamiento

| Pretratamiento | Costo total de producción |
|--------------------------|---------------------------|
| Pretratamiento biológico | \$ 112.9 |
| Pretratamiento ácido | \$ 208.5 |
| Pretratamiento álcali | \$ 169.4 |

Como se puede observar, el proceso utilizando el pretratamiento biológico tiene el menor costo de aplicación, pero con menor porcentaje de etanol obtenido, mientras que usando

pretratamiento álcali se tienen los mejores resultados y tiene un costo menor que usando el pretratamiento ácido.

Los costos planteados son con relación a reactivos usados a nivel laboratorio, por lo cual se puede incrementar el valor de producción y para una producción en una escala mayor se debe determinar un análisis más completo de la instrumentación, reactivos y energía requerida.

Capítulo 6

Conclusiones

6.1. Conclusiones generales

En este trabajo se realizó un acercamiento al proceso de producción de bioetanol usando biomasa de segunda generación, como caso de estudio se presentó el bagazo de caña de azúcar con el fin de enfocar el aprovechamiento de residuos agroindustriales y analizar de manera experimental las etapas que intervienen en un proceso desde las etapas principales que son el pretratamiento, hidrólisis y fermentación, y los procesos que existen intermedios a estos. Así mismo, utilizar una configuración donde se puedan consolidar las etapas y entender los pasos a efectuar para obtener las características del proceso y poder probar algunas condiciones de operación de acuerdo a lo reportado.

Se tuvo un primer acercamiento al proceso de producción de biocombustibles de segunda generación y se profundizó experimentalmente realizando tres técnicas de pretratamiento sobre el bagazo de caña de azúcar usado como desperdicio agrícola, la finalidad fue obtener las características del proceso a nivel laboratorio y documentar el proceso de las etapas que intervienen para proponer un proceso que sirva para próximos experimentos relacionados. Después de aplicar las técnicas de pretratamiento se establecieron una secuencia de pasos de acondicionamiento para poder continuar con una etapa de hidrolizado, se estableció una separación de las fracciones pretratadas y enjuagado de la parte sólida que por último se llevó a secar. La biomasa seca se sometió a un hidrolizado en donde se estableció el uso de una solución que amortigüe el cambio de pH para un correcto funcionamiento de las enzimas empleadas. Posteriormente, se realizó una etapa de fermentación utilizando levaduras sobre el hidrolizado en donde se obtuvo etanol como producto final, se midieron las concentraciones en volumen y se realizó una comparativa de los pretratamientos empleados. Después de obtener las características y condiciones de operación del proceso, se utilizó una configuración de etapas secuenciales SFS con la cual se efectuó un proceso con menor tiempo y se compararon los resultados obtenidos por cada pretratamiento. Por último, con un conocimiento completo del proceso, se realizó un diseño de experimentos sobre las variables más importantes ubicadas, con el fin de determinar su impacto y de esta manera proponer los objetivos de control

en un proceso, desde la etapa de pretratamiento hasta la fermentación.

Los resultados obtenidos durante las pruebas experimentales entre los pretratamientos demostró de los pretratamientos químicos tienen un mayor impacto en la degradación de la biomasa, destacando el uso de reactivos alcalinos como el NaOH en bajas concentraciones. Sin embargo, el uso de químicos implica una recuperación del material con el fin de realizar un proceso más sostenible y de bajo impacto en el medio ambiente.

Algunas de las observaciones sobre los resultados sobre los métodos de pretratamientos, configuraciones de proceso y análisis de variables son las siguientes:

- Por medio de la evaluación experimental a nivel laboratorio se logró la documentación del proceso detallado de los pasos a seguir con instrumentación de laboratorio, esto como primer acercamiento a los biocombustibles se establecieron características para implementar cada técnica de pretratamiento y las condiciones de operación que fueran alcanzables con el equipo e instrumentación propuesta.
- Las variables se analizaron con mayor profundidad aplicando un diseño de experimentos con una manipulación en diferentes valores de temperatura y pH en las etapas de pretratamiento, hidrólisis e hidrólisis y fermentación simultáneas. La importancia de estas variables es alta debido a que modifican el rendimiento en el producto final, lo cual sirve como punto de partida para aplicación técnico de control.
- Se proponen dos lazos de control en la temperatura y pH durante todo el proceso debido a la importancia de estas variables y por el tipo de proceso con estancias relativamente largas para garantizar un buen aprovechamiento de la biomasa y rendimiento del producto final, es necesario el uso de un reactor por lotes.
- En la etapa de hidrólisis se utilizó un control pasivo utilizando una solución buffer para mantener el pH con la menor variación, para aplicaciones de control se tendría que estudiar la dinámica de esta variable para incluir un control activo lo cual es un punto de interés.
- Se encontró en la literatura distintos tipos de soluciones buffer que pueden tanto potenciar los resultados como inhibirlos. La solución utilizada fue un buffer citrato por lo que puede contemplarse un diseño de experimentos utilizando diferentes soluciones y observar el efecto en el producto.

6.2. Aportaciones

Las aportaciones de este trabajo son:

- Un manual documentado utilizando tres distintas técnicas de pretratamiento, hasta la etapa de fermentación, estableciendo condiciones como agitación, tamaño de partícula, carga de sustrato, temperatura y pH, para la instrumentación ocupada a nivel laboratorio, con el fin de utilizar los resultados obtenidos como primer acercamiento en el proceso.
- Con el análisis de las variables a nivel laboratorio se proponen los lazos de control necesarios o más relevantes en el proceso, con el fin de aplicación de técnicas de control y estudio de las dinámicas que presentan las variables.
- Se realizó una contribución académica, publicando un artículo en la 9^a Jornada de Ciencia y Tecnológica Aplicada. En donde se describe el proceso de producción y se muestran los resultados de etanol obtenido entre las configuraciones ocupadas usando como pretratamiento NaOH (Anexo A).

6.3. Trabajos futuros

Escalamiento del proceso:

Mejorar el análisis de proceso, por medio de un escalamiento para determinar si las condiciones de operación se pueden mantener según lo planteado o se necesita realizar un re-diseño y como el escalamiento afecta en las variables.

Pruebas faltantes:

En este trabajo se muestra una investigación exploratoria del proceso de producción de bioetanol de segunda generación, por lo que se proponen algunas pruebas faltantes en el desarrollo experimental.

- Para reforzar la importancia de cada etapa y el impacto de cada pretratamiento, se recomienda una expansión en técnicas actuales, de misma manera en las configuraciones durante la hidrólisis y fermentación.

- Como se pudo observar, en la etapa experimental se realizó una manipulación de variables más importantes en algunos rangos alcanzables, por lo que se deberían plantear, tomando de referencia lo observado, un diseño de experimentos centrado en la manipulación y sensibilidad de cada una para obtener una dinámica acertada de un proceso físico.

- Contemplar un diseño de experimentos para determinar si existe una relación entre las variables temperatura y pH, así como también para que rangos de operación.

- Diseño de experimentos en el efecto de soluciones buffer durante la hidrólisis enzimática en configuración separada y simultánea.

- Se observo que el tamaño de partícula influía en la agitación, para un proceso a una escala mayor o con un sistema de agitación mas adecuado, puede observarse el efecto del tamaño de partícula que obtenga los mejores rendimientos de etanol.

Modelado del proceso:

Para realizar un modelo matemático de las etapas de produccion de etanol, primeramente se debe conocer el proceso y después dar un enfoque en los modelos cinéticos de las reacciones.

Aplicación de técnicas de control en etapas del proceso:

De las variables detectadas se destaca el pH debido a su sensibilidad durante el proceso, por lo que es de interés la aplicación de técnicas de control como modelado, identificación y posterior control de la variable para mantener condiciones lo más cercano a las ideales para conseguir un mejor aprovechamiento del producto final.

Bibliografía

- Aditiya, H., Mahlia, T., Chong, W., Nur, H., and Sebayang, A. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 66:631–653.
- Alfonsín, V., Maceiras, R., and Gutiérrez, C. (2019). Bioethanol production from industrial algae waste. *Waste Management*, 87:791–797.
- Althuri, A. and Mohan, S. V. (2020). Sequential and consolidated bioprocessing of biogenic municipal solid waste: a strategic pairing of thermophilic anaerobe and mesophilic microaerobe for ethanol production. *Bioresource technology*, 308:123260.
- Alvarado Ludeña, G. R. (2021). Obtención de bioetanol a partir del bagazo de la caña de azúcar mediante hidrólisis enzimática. B.S. tesis, Universidad Politecnica Salesiana sede Cuenca.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., and Negro, M. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13):4851–4861.
- Balat, M. (2009). New biofuel production technologies. *Energy Educ Sci Technol Part A*, 22(2):147–61.
- Baral, P., Jain, L., Kurmi, A. K., Kumar, V., and Agrawal, D. (2020). Augmented hydrolysis of acid pretreated sugarcane bagasse by peg 6000 addition: a case study of cellic ctec2 with recycling and reuse. *Bioprocess and biosystems engineering*, 43(3):473–482.
- Baruah, J., Nath, B. K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D. C., and Kalita, E. (2018). Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research*, 6:141.
- Cortés-Sánchez, M. D., Gata-Montero, E. M., Pipió-Ternero, A., Rodríguez-Rivas, Á., and Sánchez-Santos, J. (2019). Biocombustibles: tipos y estrategias de producción. *MoleQla: Rev. Cienc. Univ. Pablo Olavide (35)*, pages 20–25.
- Espinosa Negrín, A. M., López González, L. M., and Casdelo Gutiérrez, N. L. (2021). Pretratamiento de biomazas lignocelulósicas: Breve revisión de los principales métodos utilizados. *Centro Azúcar*, 48(3):108–119.

- Gronchi, N., Favaro, L., Cagnin, L., Brojanigo, S., Pizzocchero, V., Basaglia, M., and Casella, S. (2019). Novel yeast strains for the efficient saccharification and fermentation of starchy by-products to bioethanol. *Energies*, 12(4):714.
- Hasunuma, T. and Kondo, A. (2012). Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochemistry*, 47(9):1287–1294.
- Jahnvi, G., Prashanthi, G. S., Sravanthi, K., and Rao, L. V. (2017). Status of availability of lignocellulosic feed stocks in india: biotechnological strategies involved in the production of bioethanol. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73:798–820.
- Karagoz, P., Bill, R. M., and Ozkan, M. (2019). Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. *Renewable Energy*, 143:741–752.
- Krylova, A. Y., Kozyukov, E., and Lapidus, A. (2008). Ethanol and diesel fuel from plant raw materials: a review. *Solid Fuel Chemistry*, 42(6):358–364.
- Kumari, D. and Singh, R. (2018). Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90:877–891.
- Kumneadklang, S., Larпкиattaworn, S., Niyasom, C., Sompong, O., et al. (2015). Bioethanol production from oil palm frond by simultaneous saccharification and fermentation. *Energy Procedia*, 79:784–790.
- Liu, C.-G., Li, K., Wen, Y., Geng, B.-Y., Liu, Q., and Lin, Y.-H. (2019). Bioethanol: New opportunities for an ancient product. In *Advances in Bioenergy*, volume 4, pages 1–34. Elsevier.
- Llano Buriticá, A. M., Cardona Longas, J. D., Lenis Ramírez, S., Pemberthy González, J. D., Salazar Zea, S. A., Agudelo Agudelo, M. Á., et al. (2020). Análisis de la producción de bioetanol desde la biomasa lignocelulósica del maíz producida en la huerta del colegio de la upb a partir de la literatura científica.
- Lu, Y., Yang, B., Gregg, D., Saddler, J. N., and Mansfield, S. D. (2002). Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Applied biochemistry and biotechnology*, 98:641–654.
- Manzanares, P. (2010). Integrated hydrolysis, fermentation and co-fermentation of lignocellulosic biomass. In *Bioalcohol Production*, pages 205–223. Elsevier.
- Merino, S. T. and Cherry, J. (2007). Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Biofuels*, pages 95–120.

- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., and Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6):673–686.
- Oceguera-Contreras, E., Aguilar-Juárez, O., Oseguera-Galindo, D., Macías-Barragán, J., Bolaños-Rosales, R., Mena-Enríquez, M., Arias-García, A., Montoya-Buelna, M., Graciano-Machuca, O., and De León-Rodríguez, A. (2019). Biohydrogen production by vermicompost-associated microorganisms using agro industrial wastes as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(20):9856–9865.
- Olguin, E. (2020). Bioproceso consolidado para la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*), utilizando el aislado nativo *trametes hirsuta* bm-2. Tesis de grado, Centro de Investigacion Cientifica de Yucatán.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., and Lidén, G. (2008). A short review on ssf—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for biofuels*, 1(1):1–14.
- Parisutham, V., Kim, T. H., and Lee, S. K. (2014). Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production. *Bioresource technology*, 161:431–440.
- Paulova, L., Patakova, P., Branska, B., Rychtera, M., and Melzoch, K. (2015). Lignocellulosic ethanol: technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology advances*, 33(6):1091–1107.
- Prasad, S., Singh, A., and Joshi, H. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 50(1):1–39.
- Rastogi, M. and Shrivastava, S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80:330–340.
- Riaño, A. M. S. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 1(5).
- Robak, K. and Balcerek, M. (2020). Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Microbiological Research*, 240:126534.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206):841–845.
- SAGARPA (2022). Anuario estadístico de la producción agrícola año 2021. *Servicio de información agroalimentaria y pesquera*.
- Salcedo, J., López, J. G., and Flórez, L. M. P. (2012). Hidrólisis enzimática de residuos de la cosecha de caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1):171–181.

- Sanchez, O. J. and Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, 99(13):5270–5295.
- Sarto, S., Hildayati, R., and Syaichurrozi, I. (2019). Effect of chemical pretreatment using sulfuric acid on biogas production from water hyacinth and kinetics. *Renewable Energy*, 132:335–350.
- Sharma, B., Larroche, C., and Dussap, C.-G. (2020). Comprehensive assessment of 2g bioethanol production. *Bioresource Technology*, 313:123630.
- Sinche Arias, D. F., Ramírez Peñaherrera, V. E., and Velalcázar Rhea, C. M. (2022). Simultaneous saccharification and fermentation of hydrothermally pretreated jatropha curcas shell for bioethanol production. *Ingeniería*, 32(1):19–32.
- Suárez, A., Alfonso, G., Reyes, I., et al. (2019). Sugarcane bagasse alkaline pretreatment to improve biomethane production. *Centro Azúcar*, 46(4):79–88.
- Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1):1–11.
- Zabed, H., Sahu, J., Suely, A., Boyce, A., and Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71:475–501.
- Zhang, H., Zhang, J., Xie, J., and Qin, Y. (2020). Effects of naoh-catalyzed organosolv pretreatment and surfactant on the sugar production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 312:123601.

Anexo

Anexo A: Artículo publicado en la 9^a Jornada de Ciencia y Tecnológica Aplicada

Evaluación experimental de las variables con mayor impacto en el proceso de producción de bioetanol de segunda generación

Arturo Figueroa Arcos *, Víctor M. Alvarado*
Guadalupe López López *

* Centro Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico,
Cuernavaca, Morelos, CP 62460.

m21ce032@cenidet.tecnm.edu.mx, victor.am@cenidet.tecnm.mx,
guadalupe.ll@cenidet.tecnm.mx

Abstract: La producción de biocombustibles ha cobrado gran importancia en los últimos años debido a la búsqueda de fuentes alternativas de combustibles. En este artículo se presenta la producción de bioetanol a partir del residuo agrícola de la caña (Biomasa lignocelulósica) y sus etapas que intervienen durante una configuración separada (SHF) y una configuración simultánea (SSF). En el análisis de variables del proceso se determinó gran importancia en la temperatura y pH durante el proceso de hidrólisis enzimática, durante una etapa de hidrólisis separada se pudo obtener una producción de etanol del 16 % en un volumen de 100 ml, manteniendo las condiciones de 50 °C y pH 5 siendo las condiciones óptimas reportadas y al ser manipuladas fuera del rango determinado se observa una reducción importante en el producto final, así como en una etapa simultánea cobra importancia la temperatura de operación donde se pudo obtener una producción del 15 % en volumen, usando 43° C y una reducción del tiempo de operación. A través de esta investigación se busca proponer alternativas en producción de biocombustibles y establecer las variables de interés que intervienen en el proceso, para temas de aplicación de control en estas etapas cruciales.

Palabras clave: Biomasa lignocelulósica, hidrólisis enzimática, fermentación, pretratamiento.

1. INTRODUCCION

La producción de combustibles de las últimas décadas ha sido proveniente de fuentes no renovables o fósiles para cubrir la demanda energética. Como consecuencia se tiene una sobre explotación y su uso contribuye al calentamiento global, por lo que actualmente se buscan energías alternativas y/o renovables (Willem *et al.*, 2009). Debido a la problemática mencionada anteriormente, se han desarrollado investigaciones de energías alternativas que tienen un menor impacto en el medioambiente, como es la producción de biocombustibles a partir del aprovechamiento de los residuos (Manrique *et al.*, 2015).

El principal biocombustible es el bioetanol, este es un tipo de alcohol que se obtiene por medio de la fermentación de los azúcares que contiene la materia prima (biomasa), es considerado biocombustible debido a que proviene de residuos agrícolas generalmente y por una baja emisión de CO₂ (Castro Martínez *et al.*, 2012).

En este documento se presenta el proceso de producción de bioetanol de segunda generación, usando el bagazo de caña de azúcar en las pruebas experimentales. Dichas pruebas se

realizaron para obtener las características y condiciones de operación de cada etapa (pretratamiento, hidrólisis y fermentación), así como también el análisis de las principales variables que afectan el rendimiento en el porcentaje de etanol obtenido.

2. PRODUCCION DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN.

El bioetanol de segunda generación es uno de los biocombustibles con mayor alcance debido a que implica el uso de desechos agrícolas, residuos vegetales secos provenientes de podas, cascara de alimentos, entre otros. A este tipo de materia se le conoce como biomasa lignocelulósica, por su composición de hemicelulosa y lignina (estructura rígida), y celulosa (carbohidrato) el cual es fermentado para obtener bioetanol (Hernández, 2012).

2.1 Biomasa lignocelulósica

El bagazo generado de la caña de azúcar es uno de los principales residuos lignocelulósicos, por cada tonelada de azúcar producida se obtiene de 0.7 a 0.3 toneladas de bagazo (Albernas *et al.*, 2016). La composición del bagazo de caña de azúcar es