



Educación

Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN
DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN (2G)
EMPLEANDO RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR
A NIVEL PLANTA PILOTO.”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

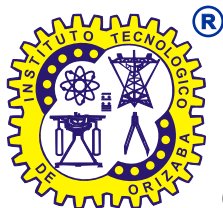
I.Q. Carlos Iván Montero Hernández

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Leticia López Zamora

CODIRECTOR DE TESIS:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

FEBRERO 2025



Instituto Tecnológico de Orizaba
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, **14/febrero/2025**
Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación.
Asunto: Autorización de Impresión
Opción: I

**CARLOS IVÁN MONTERD HERNÁNDEZ
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA
PRESENTE**

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA
GENERACIÓN (2G) EMPLEANDO RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR A NIVEL PLANTA PILOTO.**

Comunico a usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA-TÉCNICA-CULTURA®


**DRA. OFELIA LANDETA ESCAMILLA
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Archivo
OLE/NAVC



2025
Año de
**La Mujer
Indígena**

Av. Oriente 9 #852 Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320
Orizaba, Veracruz. Tel. 01 (272) 1105360
e-mail: info@orizaba.tecnm.mx www.orizaba.tecnm.mx





Instituto Tecnológico de Orizaba
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, **30/enero/2025**
Asunto: **revisión de trabajo escrito**

DRA. OFELIA LANDETA ESCAMILLA
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.

CARLOS IVÁN MONTERD HERNÁNDEZ

La cual lleva el título de:

ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA
GENERACIÓN (2G) EMPLEANDO RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR A NIVEL PLANTA PILOTO.

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA-TÉCNICA-CULTURA®

PRESIDENTE: DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA

FIRMA

SECRETARIO: DRA. MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA

FIRMA

VOCAL: DRA. ROSALÍA CERECERO ENRÍQUEZ

FIRMA

VOCAL SUP.: DRA. ARACELI ORTIZ CELISEO

FIRMA

TA-09-18



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Oriente 9 #852 Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320
Orizaba, Veracruz. Tel. 01 (272) 1105360
e-mail: info@orizaba.tecnm.mx www.orizaba.tecnm.mx



Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 15 del mes de febrero del año 2025.

El(la) que suscribe

C. CARLOS IVÁN MONTERD HERNÁNDEZ

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 97 cuartillas, ha sido escrita por mi y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

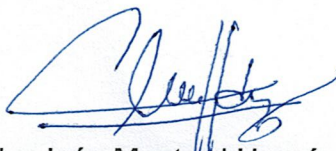
“ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN (2G) EMPLEANDO RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR A NIVEL PLANTA PILOTO”

del programa: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA bajo la asesoría y dirección del (la) DRA. LETICIA LOPEZ ZAMORA y DRA. MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal, en los casos que así lo requieran, cuento con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales. Por lo tanto, me hago responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando a toda responsabilidad al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba.

También declaro que, al presentar esta tesis, cedo los derechos del trabajo al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba para su difusión, con fines académicos y de investigación, bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: depi_orizaba@tecnm.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.



Carlos Iván Monterd Hernández

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi madre, Leticia, por ser mi mejor amiga y un apoyo incondicional durante todos estos años. Su amor, sacrificios y desvelos han sido fundamentales para brindarme una educación y motivarme a alcanzar mis metas. A mi padre, Carlos, le agradezco por sus valiosos consejos y por creer en mí como amigo y figura paternal.

A mi hermana, Erika, le debo el aliento en los momentos difíciles de la maestría, siempre motivándome a ser mejor persona y profesional, al igual que a mi hermano, Joaquín, por ser mi confidente y fuente de motivación. A toda mi familia, gracias por su apoyo y amor constante en cada uno de mis triunfos y fracasos.

A mis amigos de toda la vida, les agradezco por ser como hermanos para mí. Hemos compartido tantos recuerdos y anécdotas, tanto en los buenos como en los momentos difíciles. Aunque cada uno haya tomado rumbos diferentes, atesoro profundamente nuestra amistad duradera y celebro juntos nuestros triunfos personales, a pesar de la distancia que nos separa. También hacer una mención especial a Víctor, quien siempre ha estado dispuesto a ofrecerme su apoyo incondicional durante esta etapa, siendo un gran compañero en este viaje.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis compañeros del ITO-ITVER. Su amistad y apoyo han sido fundamentales en esta etapa de mi vida profesional. Gracias por estar a mi lado, brindándome aliento y fortaleza a lo largo de mi camino. Siempre estuve acompañado de su disposición para resolver mis dudas sobre los procedimientos, lo cual hizo que mis días en el instituto fueran más llevaderos y memorables.

Expreso mi gratitud a mi asesora, la Dra. Leticia López, y a mi coasesora, la Dra. Guadalupe Aguilar, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto. Su confianza y orientación han sido esenciales en esta etapa de mi formación profesional, permitiéndome alcanzar los resultados obtenidos. Asimismo, agradezco a la Dra. Inés Infanzón, al Dr. Daniel Zavala y al Dr. Javier Gómez por su valioso apoyo académico en el Laboratorio de Bioingeniería y en la Planta piloto de bioetanol del Instituto Tecnológico de Veracruz.

Extiendo mi agradecimiento a mi comité académico, conformado por la Dra. Rosalía Cerecero y la Dra. Araceli Ortiz, por sus recomendaciones y aportaciones que han sido cruciales para la culminación de esta tesis.

Finalmente, agradezco a todos mis maestros de posgrado, quienes me han inspirado a descubrir la pasión por mi carrera a través de sus enseñanzas y experiencias compartidas. Su dedicación y compromiso me han dejado una huella en mi vida profesional.

RESUMEN

Evaluación del proceso de producción de bioetanol de segunda generación (2G) a partir de bagazo de caña de azúcar a nivel planta piloto

Elaborado por: Ing. Carlos Iván Monterd Hernández Carlos Iván.

**Dirigida por: Dra. Leticia López Zamora.
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga.**

La presente tesis evalúa la producción de bioetanol de segunda generación (2G) a partir del bagazo de caña de azúcar, un residuo agrícola abundante en México. El objetivo del estudio fue escalar y validar las condiciones de pretratamiento, hidrólisis y fermentación para maximizar la conversión de biomasa en azúcares fermentables y etanol. La metodología incluyó ensayos de laboratorio que lograron una remoción del 51.59% de hemicelulosa y 75.9% de lignina, lo que aumentó la disponibilidad de celulosa. Se utilizó la caracterización NREL y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar el porcentaje de remoción. Además, se empleó bagazo pretratado y un proceso de ultrafiltración que mejoraron la actividad de las enzimas de *Aspergillus niger* ITV02, alcanzando una productividad de 2.31 g/L·h y 55.66 g/L de glucosa en 24 horas. Esto facilitó la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* ITV01, logrando una concentración máxima de etanol en 15 horas, con rendimientos óptimos ($Y_{p/s} = 0.424$ g/g) y una eficiencia del 68.3% a nivel laboratorio. Sin embargo, durante el escalado a planta piloto, se presentaron desafíos significativos, como una pérdida del 76% de materia en el bagazo pretratado, lo que afectó la disponibilidad de sustrato. La remoción casi total de hemicelulosa alteró el material, y la hidrólisis alcalina se vio comprometida, resultando en una baja remoción de lignina (14%) y un rendimiento de glucosa de solo 38 g/L. Estos problemas llevaron a la decisión de no continuar con el escalado enzimático. En conclusión, se destaca la necesidad de optimizar el pretratamiento ácido, sugiriendo ajustes en el uso de H_2SO_4 y la relación sólido-líquido para mejorar la deslignificación y la eficiencia del proceso, lo cual es crucial para futuras investigaciones en la producción sostenible de bioetanol 2G.

ABSTRACT

Evaluation of the second generation (2G) bioethanol production process from sugarcane bagasse at pilot plant level.

By: Eng. Carlos Iván Monterd Hernández Carlos Iván.

Advisor(s): Dra. Leticia López Zamora.

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga.

This thesis evaluates the production of second generation (2G) bioethanol from sugarcane bagasse, an abundant agricultural waste in Mexico. The objective of the study was to scale up and validate the pretreatment, hydrolysis and fermentation conditions to maximize the conversion of biomass into fermentable sugars and ethanol. The methodology included laboratory trials that achieved 51.59% hemicellulose and 75.9% lignin removal, which increased cellulose availability. NREL characterization and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to determine the percentage of removal. In addition, pretreated bagasse and an ultrafiltration process were used to improve the enzyme activity of *Aspergillus niger* ITV02, reaching a productivity of 2.31 g/L-h and 55.66 g/L of glucose in 24 hours. This facilitated fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* ITV01, achieving a maximum ethanol concentration in 15 hours, with optimal yields ($Y_{p/s} = 0.424$ g/g) and an efficiency of 68.3% at laboratory level. However, during scale-up to pilot plant, significant challenges were encountered, such as a 76% loss of matter in the pretreated bagasse, which affected substrate availability. The almost total removal of hemicellulose altered the material, and alkaline hydrolysis was compromised, resulting in low lignin removal (14%) and a glucose yield of only 38 g/L. These problems led to the decision not to continue with the enzymatic scale-up. In conclusion, the need to optimize the acid pretreatment is highlighted, suggesting adjustments in the use of H_2SO_4 and the solid-liquid ratio to improve delignification and process efficiency, which is crucial for future research in sustainable 2G bioethanol production.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	ix
NOMENCLATURA	x
INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
 1.1 Actualidad de los biocombustibles	4
1.2 Bioetanol	6
1.2.1 Biocombustibles de primera y segunda generación	8
1.3 Biomasa Lignocelulósica	9
1.3.1 Celulosa	10
1.3.2 Hemicelulosa	11
1.3.3 Lignina	12
1.4 Bagazo de caña de azúcar	13
1.4.1 Composición del bagazo de caña	16
1.5 Pretratamientos para la obtención de azúcares fermentables	17
1.5.1 Pretratamientos Físicos	18
1.5.2 Pretratamientos Químicos	19
1.5.3 Pretratamientos Biológicos	21
1.6 Microorganismos empleados en la producción de bioetanol	22
1.6.1 Celulasas	22
1.6.2 Producción de celulasas	23

1.6.2 <i>Aspergillus niger</i> ITV-02	24
1.6.3 Aplicación de celulasas	25
1.7 Fermentación	27
1.7.1 Métodos de fermentación	28
1.8 Levadura <i>Saccharomyce Cerevisiae</i> para la producción de bioetanol	31
1.9 Antecedentes	31

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología general	37
2.2 Recolección y pretratamiento físico de la materia prima, secado y molienda	37
2.3 Hidrólisis ácida	38
2.3.1 Evaluación a nivel laboratorio	38
2.3.2 Evaluación a nivel planta piloto	39
2.4 Hidrólisis alcalina	39
2.4.1 Evaluación a nivel laboratorio	39
2.4.2 Evaluación a nivel planta piloto	40
2.5 Hidrólisis enzimática	41
2.5.1 Medio de cultivo de la enzima <i>Aspergillus niger</i> ITV02	41
2.5.2 Medio de adaptación a nivel matraz	41
2.5.3 Medio de fermentación del hongo <i>Aspergillus niger</i> ITV02 a nivel matraz	42
2.5.4 Ultrafiltración por membrana	42
2.5.5 Determinación de la actividad enzimática celulasas	43
2.5.6 Diseño de tratamientos para hidrólisis enzimática	44
2.6 Fermentación para la obtención de bioetanol	44
2.6.1 Medios de cultivo	44

2.6.2 Pre cultivo y pre inoculo	45
2.6.3 Medio de Fermentación	45
2.7 Métodos Analíticos	46
2.7.1 Análisis de la caracterización y de hidrolizados por HPLC	46
2.7.2 Análisis de composición lignocelulósica	46
2.7.3. Viabilidad celular (%V)	48
2.7.4 Rendimientos y productividades	48
2.8 Balances de Materia	50
2.9 Energía eléctrica consumida	50
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Acondicionamiento de la materia Prima	51
3.2 Evaluación de condiciones Hidrólisis ácida	51
3.2.1 Balance de materia a Nivel laboratorio	51
3.2.2 Balance de materia a Nivel Planta piloto	52
3.3 Evaluación de condiciones Hidrólisis alcalina	55
3.3.1 Balance de masa a Nivel Laboratorio	55
3.3.2 Balance de masa a Nivel Planta Piloto	56
3.4 Evaluación de actividad enzimática	58
3.5 Hidrólisis enzimática a Nivel Laboratorio	60
3.6 Hidrólisis enzimática a nivel planta piloto	63
3.7 Fermentación empleando <i>Saccharomyce Cerevisiae</i> ITV01	65
3.8 Consumo eléctrico	70
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	73

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	86

75
86

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Esquema del proceso de producción de bioetanol	6
1.2	Representación de los componentes de LCB (Suárez <i>et al.</i> , 2022)	9
1.3	Estructura de la celulosa y enlaces inter e intra cadenas (Suárez <i>et al.</i> , 2022)	10
1.4	Estructura de la hemicelulosa (Suárez <i>et al.</i> , 2022)	11
1.5	Estructura de la lignina (Suárez <i>et al.</i> , 2022)	12
1.6	Caña de azúcar, <i>Saccharum officinarum</i> L. Fuente: Wikipedia. Recuperado de (https://ast.m.wikipedia.org/wiki/Ficheru:Saccharum_officinarum_Blanco1.18-cropped.jpg)	13
1.7	Bagazo de caña de azúcar. Fuente: Smartgreen. Recuperado de (https://smartgreen.com.mx/bagazo-de-cana-de-azucar/).	14
1.8	Ventajas y desventajas de los diferentes pretratamientos para la obtención de azúcares fermentables	18
1.9	Mecanismo de reacción de celulasas durante la hidrólisis. Fuente: Adaptado de Wikipedia. Recuperado de (https://hmn.wiki/es/Cellulase)	22
1.10	Métodos de fermentación para la producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica. A: SFH, B:SSF, C: SScF y D: CBP. Fuente: Adaptado de (Camesasca, 2013)	29
2.1	Metodología para la producción de bioetanol	37
2.2	Molino marca TILCA para la obtención de bagazo de caña	38
2.3	Reactor de hidrólisis ácida	40
2.4	Reactor de hidrólisis alcalina	41
2.5	Metodología para medir la actividad exoglucanasa (FPasa)	43
2.6	Metodología para medir la actividad endoglucanasa (CMCasa)	43
2.7	Metodología para medir la actividad β -glucosidasa (BGL)	44
3.1	Balance de materia de hidrólisis ácida a nivel laboratorio	52
3.2	Balance de materia de hidrólisis ácida a nivel planta piloto	53
3.3	Coloración del BCA en la etapa de hidrólisis ácida	54
3.4	Balance de materia de hidrólisis alcalina a nivel laboratorio	55
3.5	Balance de materia de hidrólisis alcalina a nivel planta piloto	56

3.6	Coloración del BCA en la etapa de hidrólisis alcalina	57
3.7	Mejora del rendimiento de la actividad enzimática de <i>Aspergillus niger</i> ITV02	60
3.8	Cinética de hidrólisis enzimática utilizando <i>Aspergillus niger</i> ITV02 ultrafiltrado	62
3.9	Consumo de azúcares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITV-01, producción de bioetanol 2G y cinética de la biomasa a nivel laboratorio	68

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Generaciones de biocombustible y las materias primas utilizadas	5
1.2	Producción mundial anual de etanol carburante (millones de galones), (Association, 2021)	7
1.3	Características importantes para el procesamiento de la celulosa	10
1.4	Características principales de la Hemicelulosa	11
1.5	Características principales de la Lignina	12
1.6	Producción de caña de azúcar y área de cultivo en los 10 países principales (Nunes <i>et al.</i> , 2020)	14
1.7	Número de ingenios azucareros por estado en México	15
1.8	Composición química de materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol (Kumar y Sharma, 2017)	17
3.1	Resultados de NREL a condiciones de operación modificadas en la etapa de hidrólisis ácida a nivel planta piloto	52
3.2	Caracterización del hidrolizado ácido a nivel laboratorio y planta piloto	53
3.3	Resultados de NREL a condiciones de operación modificadas en la etapa de hidrólisis ácida-alcalina a nivel planta piloto	57
3.4	Actividad de celulasas sin ultrafiltrar en comparación con otros autores	59
3.5	Condiciones de hidrólisis enzimática empleando <i>Aspergillus niger</i> <i>ITV02</i>	60
3.6	Productividad de la obtención de glucosa en diferentes pretratamientos	61
3.7	Producción de azúcares fermentables a partir de hidrólisis enzimática de BCA	63
3.8	Hidrólisis enzimática a nivel laboratorio con bagazo pretratado a nivel planta piloto empleando <i>Cellic CTec3</i>	65
3.9	Cinética de Fermentación con <i>Saccharomyce Cerevisiae</i> <i>ITV01</i> para la producción de etanol 2G nivel laboratorio	67
3.10	Producción de etanol 2G a partir de residuos lignocelulósicos	69
3.11	Consumo eléctrico durante el proceso de bioetanol 2G a nivel P.P.	70

NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	Unidades
<i>AIL</i>	Lignina Insoluble en Ácido (Acid Insoluble Lignin)	%
<i>AIR</i>	Residuo Insoluble en Ácido (Acid Insoluble Residue)	%
<i>ASL</i>	Lignina Soluble en Ácido (Acid Soluble Lignin)	%
<i>U</i>	Actividad enzimática	U/mL
<i>BCA</i>	Bagazo de caña de azúcar	g
<i>BCAc</i>	Bagazo de caña ácido	g
<i>BCAl</i>	Bagazo de caña alcalino	g
<i>DA</i>	Ácido sulfúrico diluido	L
<i>LCB</i>	Biomasa lignocelulósica	g
<i>ODW</i>	Peso Seco (Oven Dry Weight)	g
<i>FPU</i>	Filter Paper Unit	FPU/mL
<i>RLS</i>	Relación Líquido-Sólido	
<i>V</i>	Viabilidad celular	%
X_i	Concentración inicial de biomasa	g/L
X_f	Concentración final de biomasa	g/L
S_i	Concentración inicial de sustrato	g/L
S_f	Concentración final de sustrato	g/L
t_f	Tiempo de fermentación donde a la máxima concentración de producto	h
P_i	Concentración inicial del producto	g/L
P_f	Concentración final del producto	g/L
<i>Q</i>	Productividad Volumétrica	g/Lh
X_m	Promedio de células muertas	#
X_v	Promedio de células vivas	#
$Y_{x/s}$	Rendimiento celular	g/L
$Y_{p/s}$	Rendimiento del producto	g/L

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el consumo excesivo de combustibles fósiles se presenta como uno de los principales contribuyentes a la emisión de gases de efecto invernadero, siendo la causa fundamental de la crisis energética global y del deterioro climático. Este panorama se debe a la intensa explotación de los recursos petroleros en todo el mundo, lo que ha impulsado la necesidad de buscar alternativas energéticas más sostenibles.

Para mitigar los efectos negativos de esta crisis, se han desarrollado estrategias centradas en energías renovables y sustentables, que actúan como fuentes alternativas con el fin de reducir la dependencia de los combustibles fósiles y su impacto ambiental. A pesar de estos avances, el sistema económico global ha seguido un modelo lineal desde la Revolución Industrial, basado en la explotación intensiva de recursos naturales bajo el supuesto de que son ilimitados y de bajo costo. Este enfoque ha perpetuado la dependencia de energías tradicionales, particularmente en países como México, donde la aplicación de energías limpias y renovables sigue siendo limitada.

En este contexto, el bioetanol ha emergido como una alternativa energética viable, ampliamente estudiada y producida a nivel industrial. Su producción a partir de biomasa lignocelulósica (LCB) representa un enfoque prometedor, ya que permite aprovechar los desechos orgánicos generados por las industrias, los cuales de otro modo serían desaprovechados. Esta estrategia contribuye a la reducción de la dependencia de cultivos alimentarios y apoya un uso más eficiente de los recursos vegetales. Además, la integración de estas prácticas en la cadena de producción industrial favorece la economía circular, minimizando el impacto ambiental y promoviendo la sostenibilidad.

El bagazo de caña de azúcar, es un subproducto abundante de la industria azucarera, es un recurso de biomasa lignocelulósica con gran potencial para la producción de bioetanol de segunda generación (2G), sin embargo, este tipo de biomasa requiere pretratamientos específicos para la remoción de hemicelulosa y lignina, mejorando la accesibilidad de la celulosa para su posterior hidrólisis y conversión en azúcares fermentables mediante hidrólisis.

Los avances en tecnologías enfocadas en la producción de enzimas autóctonas, como las obtenidas de hongos filamentosos del género *Aspergillus niger*, han mejorado la viabilidad tanto económica como técnica de la conversión de biomasa a bioetanol. Estas enzimas nativas facilitan una descomposición más eficiente de la celulosa y la hemicelulosa, optimizando el proceso de hidrólisis enzimática y disminuyendo la dependencia de enzimas comerciales de alto costo.

El objetivo de este proyecto de investigación es evaluar el proceso de generación de bioetanol de 2da generación a partir de bagazo de caña de azúcar a nivel planta piloto, en función de las condiciones de operación previamente determinadas a escala de laboratorio. Para ello, se desarrolló una metodología que comprende la evaluación de los pretratamientos ácidos y alcalinos para la degradación de hemicelulosa y lignina, así como la utilización de enzimas autóctonas producidas por *Aspergillus niger* en la hidrólisis enzimática. La comparación de rendimientos en laboratorio y planta piloto permite identificar mejoras potenciales para optimizar el proceso en la planta de bioetanol 2G ubicada en el Instituto Tecnológico de Veracruz.

Este trabajo contribuirá a fortalecer el desarrollo de estrategias más eficientes para la producción de bioetanol, favorables para la implementación de energías alternativas en México y promoviendo un uso más sustentable de los residuos lignocelulósicos.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Actualidad de los biocombustibles

A principios del siglo XIX, el término “combustible fósil” se utilizaba para referirse a fuentes de energía tales como el carbón, el petróleo y el gas natural que se formaban a partir de restos de plantas y animales enterrados bajo la superficie de la Tierra durante millones de años, término que fue evolucionando con el pasar de los años y en base a los nuevos desarrollos científicos y tecnológicos.

En la década de 1970 apareció el término denominado “biocombustible”, el cual continúa vigente a la fecha. Delshad *et al.*, (2010), lo definen como un combustible elaborado a partir de plantas u otros materiales biológicos; Robertson y Doran (2013), lo consideran cualquier combustible que se derive de la biomasa, incluida leña, metano y petróleo; Alaswad *et al.*, (2015), lo consideraron como un combustible producido a partir de organismos recientemente vivos.

En base a estas definiciones, se determina que biocombustible corresponde a cualquier fuente de energía producida por o a partir de un organismo vivo renovable, cuya fuente de materia prima y tecnología, se clasifica en diferentes generaciones de biocombustibles de acuerdo a las materias primas utilizadas.

La producción y el suministro de combustibles de hidrocarburos fósiles, productos químicos y aditivos están bajo presión en muchas partes del mundo debido a los limitados recursos petroleros sostenibles, el creciente costo y la necesidad de alternativas menos tóxicos al ambiente. Una tendencia en el desarrollo de bioproductos con valor agregado, es el uso de materias primas (biomasa lignocelulósica) como fuente de productos químicos industriales.

En la actualidad las plantaciones energéticas, para la producción de materia prima, son grandes parcelas de árboles o plantas cultivadas de crecimiento rápido y, que no

requieren gran mantenimiento, las cuales usualmente, se cultivan en tierras de bajo valor productivo, entre ellos se encuentran el maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum spp.*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), el pasto varilla (*Panicum virgatum*) y sauce (*Salix viminalis*), entre otros (Oleszek *et al.*, 2019).

Además, el establecimiento de cultivos destinados a la producción de materia prima contribuye al control de la erosión y la degradación de los suelos, lo que los posiciona como una alternativa viable frente a los combustibles no renovables. Sin embargo, su desarrollo implica el uso de recursos como tierra, agua dulce y fertilizantes, los cuales pueden generar un impacto negativo significativo en las emisiones de gases de efecto invernadero y en la biodiversidad (Knápek *et al.*, 2021).

El etanol de primera generación generó preocupaciones sobre la competencia entre alimentos y combustibles, estas fueron superadas con las generaciones posteriores, como el etanol de segunda, tercera y cuarta generación. En la Tabla 1.1, se presenta la clasificación de los diferentes tipos de biocombustibles cuya materia prima significativa para su obtención está conformada por: (a) cultivos oleaginosos, (b) biomasa lignocelulósica, (c) residuos sólidos y (d) algas.

Tabla 1.1 Generaciones de biocombustible y las materias primas utilizadas

Biocombustibles	Productos obtenidos	Materias primas
Primera generación	Bioalcoholes, aceite vegetal, biodiesel, bioetanol, biosíngas, biogás.	Azúcar, almidón, grasas animales, soja, girasol, maíz, caña de azúcar, sorgo, aceite de palma, coco, canola, mandioca, ricino, jatrofa, aguas residuales.
Segunda generación	Bioalcoholes, bioaceite, biodiésel, biometanol, biohidrógeno	Cultivos no alimentarios, paja de trigo, maíz, madera, paja de cereal, bagazo de caña de azúcar, residuos forestales, cultivos energéticos, desechos sólidos municipales.
Tercera generación	Bioetanol, aceite vegetal, biodiesel, biometanol, combustibles para aviones.	Especies microbianas, algas, levaduras, hongos, cianobacterias.
Cuarta generación	Diésel verde, biogasolina, combustible de aviación verde	Aceite vegetal, biodiesel.

1.2 Bioetanol

El bioetanol, un biocombustible renovable obtenido a partir de la fermentación de materia con alto contenido de azúcares, ha sido ampliamente estudiado en el campo de las energías alternativas debido a su potencial para sustituir al diésel. Su utilización como fuente energética ha demostrado beneficios significativos, incluyendo una mejora en el rendimiento de los sistemas de combustión y una reducción notable en las emisiones de humo, monóxido de carbono y óxidos de nitrógeno, en comparación con los combustibles fósiles convencionales (Asemoloye *et al.*, 2023).

La conversión de biomasa lignocelulósica en productos valiosos, a menudo sigue la secuencia de procesos como se muestra en la Figura 1.1, siguiendo las diferentes etapas para la producción de bioetanol: (i) pretratamiento de biomasa, (ii) hidrólisis ácida, (iii) hidrólisis alcalina, (iv) hidrólisis enzimática, (v) fermentación microbiana y (vi) purificación (también llamado proceso posterior). Se han desarrollado muchas tecnologías innovadoras para mejorar la primera y segunda etapa de la conversión de biomasa con el fin de mejorar y acelerar el proceso posterior (Asemoloye, *et al.*, 2023).



Figura 1.1 Esquema del proceso de producción de bioetanol

Los biocombustibles y la bioenergía han impactado significativamente en el desarrollo de muchas naciones, por lo que, en los próximos años se espera que una mayor parte de los productos químicos globales provenga de fuentes biológicas para descomponer la materia de plantas leñosas, generando así biocombustibles y bioproductos (Amin *et al.*, 2017).

Actualmente, tanto países desarrollados como en vías de desarrollo, han implementado programas para fomentar el uso de etanol como combustible, de acuerdo a lo establecido por la Asociación de Combustibles Renovables (Nunes *et al.*, 2020), Brasil y Estados Unidos son los principales impulsores del etanol como combustible, aportando aproximadamente el 31% (8.08 mil millones de galones) y el 53% (13.9 mil millones de galones), respectivamente. Considerando lo anterior el uso de bioetanol ha generado un impacto positivo tal y como se muestran en la Tabla 1.2, lo cual demuestra el valor del etanol como alternativa para implementarlo como fuente de energía limpia con el fin de reducir las emisiones de dióxido de carbono en la atmósfera (Association, 2021).

Tabla 1.2 Producción mundial anual de etanol carburante (millones de galones), (Association, 2021)

Región	2020	2021	2022	% de la producción mundial
Estados Unidos	13,941	15,016	15,361	54
Brasil	8,100	7,320	7,400	26
Unión Europea	1,330	1,410	1,460	5
India	520	870	1,230	4
China	940	900	920	3
Canadá	429	434	447	2
Tailandia	390	350	370	1
Argentina	210	279	310	1
Resto del mundo	620	680	722	3

En cuanto a las materias primas utilizadas para las diferentes generaciones de biocombustibles, la misma materia prima puede pertenecer a diferentes grupos; por ejemplo, la caña de azúcar pertenece a la materia prima de biocombustibles de primera y segunda generación.

1.2.1 Biocombustibles de primera y segunda generación

El bioetanol de primera generación se produce, principalmente, por medio de materias primas a partir de cultivos alimentarios, puesto que presentan un alto contenido de azúcares, almidón y aceites, dando como resultado productos tales como: bioalcoholes, aceite vegetal, biodiesel, bioetanol, biosíngas y biogás. Por otro lado, dado que sus materias primas también son fuentes de alimento, puede generar una limitación debido a que podría amenazar el suministro de alimentos y la biodiversidad (Ruan *et al.*, 2019). Lo cual es una desventaja dado que antes estas condiciones es difícil lograr un aprovechamiento aceptable para la generación de bioetanol.

El bioetanol producido para la segunda generación, se obtiene principalmente a partir de materias primas no alimentarias (principalmente biomasa lignocelulósica), así como desechos sólidos municipales (Zhang y Zhang, 2019). Esta generación incluye, principalmente, biocombustibles generadores que representan el mayor ahorro en la emisión de gases de efecto invernadero en comparación con los biocombustibles de primera generación, sin embargo, el proceso de obtención es más complicado puesto que involucra la extracción de materias primas útiles de biomasa leñosa o fibrosa.

La obtención de biocombustibles se da a partir de la manipulación de contenido orgánico, la cual comúnmente es denominada como “biomasa”, que corresponde a un tipo de material derivado de la reacción entre CO_2 y el aire, agua y luz solar, dando como resultado una de las fuentes de energía renovable más extendida y prometedora en la actualidad. El valor de cada tipo de biomasa depende de sus propiedades físicas y químicas, además del tamaño de sus moléculas componentes y de la facilidad de extracción de su energía almacenada (Suárez *et al.*, 2022).

1.3 Biomasa Lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica (LCB) representa una de las materias primas más económicas, sostenibles y grandes para la producción de energía de base biológica; esta denota la materia vegetal seca que muestra diversas propiedades fisicoquímicas, incluido el contenido de agua, el tamaño de las partículas y la hidrofobicidad, sin embargo, generalmente tiene componentes similares a la celulosa, hemicelulosa, lignina, extractos de agua (materia orgánica) y cenizas (materia inorgánica).

Este tipo de biomasa, generalmente contiene cantidades insignificantes de extractos que pueden influir en el rendimiento del pirólisis, incluidas grasas, taninos, ceras, resinas, saponinas de té y azúcares. Chen *et al.*, (2021) y Acharya *et al.*, (2021) presentaron la introducción sintética de una estructura lignocelulósica y las propiedades de dicha biomasa. En la Figura 1.2, se muestran las unidades de composición de celulosa, hemicelulosa y lignina de LBC, mismas que están presentes en la pared celular de la planta (Suárez *et al.*, 2022).

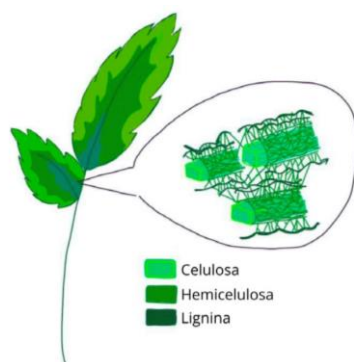


Figura 1.2 Representación esquemática de los componentes de LBC (Suárez *et al.*, 2022)

1.3.1 Celulosa

La celulosa es uno de los biomateriales más abundantes en el planeta, puesto que representa alrededor del 40 al 50% de la biomasa en peso, siendo considerada la fracción mayoritaria (Brigham, 2018). Estructuralmente, es un polímero polisacárido compuesto exclusivamente por monómeros β -D-glucopiranososa (glucosa) que forman cadenas lineales unidas mediante enlaces β -1,4-glucosídicos. La estructura de la celulosa se une por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intermoleculares formando agregados (microfibrillas). Estos enlaces químicos que unen los átomos de oxígeno e hidrógeno de moléculas de glucosa adyacentes, disponen las cadenas de celulosa de forma paralela, lo cual puede inducir al orden (cristalinidad) o al desorden (amorfismo) en la estructura molecular, mismas que pueden observarse en la Figura 1.3. De igual manera, en la Tabla 1.3, se muestran las características importantes para el procesamiento de la celulosa:

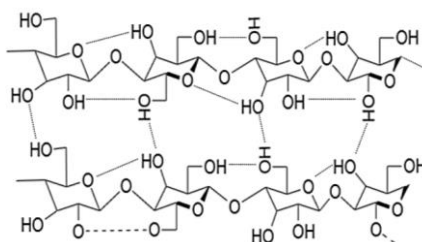


Figura 1.3 Estructura de la celulosa y enlaces inter e intra cadenas (Suárez *et al.*, 2022)

Tabla 1.3 Características importantes para el procesamiento de la celulosa

Propiedades	Descripción
Grado de polimerización	Desde 10000 hasta 15000 unidades de β -D-glucopiranososa
Región cristalina	Se encuentra en mayor proporción, es hidrofóbica y necesita tratamiento de mercerización (tratamiento alcalino fuerte de hidróxido de sodio), para la obtención de celulosa hidrófila y accesible. Presenta mayor resistencia mecánica.
Región Amorfa	Región más susceptible a tratamientos físicos, químicos y biológicos.
Degradación térmica	A partir de 400°C, se registra la producción de subproductos aromáticos y/o biochar por pirólisis secundaria.

1.3.2 Hemicelulosa

Es un biopolímero heteropolisacárido, compuesto por diferentes monómeros: pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (glucosa, manosa y galactosa). La columna vertebral de la hemicelulosa es una cadena ramificada unida principalmente por enlaces β -1,4-glucosídicos y en menor cantidad enlaces β -1,2 β -1,3 y β -1,6-glucosídicos, tal y como se puede observar en la Figura 1.4.

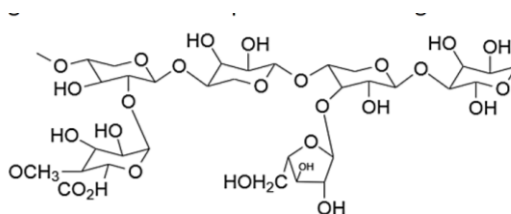


Figura 1.4 Estructura de la hemicelulosa (Suárez *et al.*, 2022)

Las hemicelulosas tienen menor masa molar que la celulosa y, estructuralmente, tienen como función servir de conexión entre la lignina y la celulosa, gracias a las uniones no covalentes que forman con la superficie de las microfibrillas de celulosa (Chávez-Sifontes, 2019). Además, las hemicelulosas representan el componente más susceptible de sufrir transformaciones desde el punto de vista térmico y químico. Para el caso de la celulosa, la remoción de al menos un 50% de la hemicelulosa incrementa de manera significativa su digestibilidad (Patel y Parsania, 2018). Algunas características notables se observan en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4 Características principales de la Hemicelulosa

Características	Descripción
Unidades monoméricas	Xilanos, mananos, galactanos y arabinogalactanos.
Degradación térmica	Se da entre 180 a 350°C. Produce gases no condensables, carbón y una variedad de cetonas, aldehídos, ácidos y furanos.
Naturaleza onformacional	Amorfa, con propiedades adhesivas y tendencia a endurecerse cuando se deshidrata.

1.3.3 Lignina

Es un heteropolímero no polisacárido presente en la pared celular de la planta madura, constituido por compuestos aromáticos como unidades de fenilpropano, puesto que estructuralmente tiene funciones de unir las fibras para mejorar la compacidad y resistencia mecánica de la planta. En la Figura 1.5 ilustra la estructura de la lignina, con los tres alcoholes precursores cumarílico, conoferílico y sinapílico, en los cuales se observan grupos metoxilo e hidroxilo, que permiten la formación de los enlaces puente de hidrógeno y fuerzas intermoleculares como enlaces de Van der Waals (Tursi, 2019). De igual manera, en la Tabla 1.5 se muestran las características importantes para el procesamiento de la lignina:

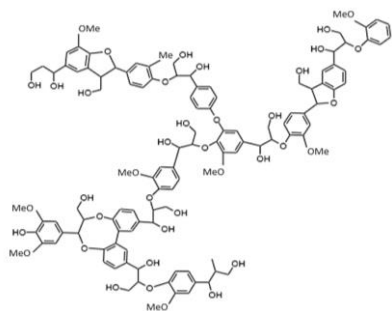


Figura 1.5 Estructura de la lignina (Suárez *et al.*, 2022)

Tabla 1.5 Características principales de la Lignina

Características	Descripción
Unidades monoméricas	Guaiacil propanol (alcohol de coniferilo), p-hidroxifenil propanol (alcohol cumarílico) y alcohol siringílico (alcohol sinapílico).
Degradación térmica	Se da a partir de los 200°C. Se obtienen productos fenólicos, así como también metanol, ácido acético y gases como CO ₂ .
Naturaleza onformacional	Amorfa.

La lignina, conocida por su efecto incrustante, recubre las fibras vegetales, razón por la cual es identificada como una de las principales barreras al ataque químico y biológico (Bajpai, 2016). Este componente es principalmente soluble en soluciones

alcalinas, sin embargo, en solubilidad de soluciones ácidas, puede clasificarse como insoluble y soluble. La lignina insoluble es el residuo remanente del tratamiento de las fibras vegetales en solución de ácido sulfúrico al 72% a temperatura ambiente, después de una hidrólisis con el mismo ácido al 3% y elevadas temperaturas (Suárez *et al.*, 2022).

1.4 Bagazo de caña de azúcar

El bagazo de caña (SCB), es el residuo derivado del proceso agroindustrial de la caña de azúcar, *Saccharum officinarum* L. (*Poaceae*), (Figura 1.6), es una planta perenne de tallos gruesos y fibrosos, que se produce tradicionalmente en más de 110 países de las regiones tropicales y templadas del mundo, ocupando un área de producción de 27 millones de hectáreas (Nunes *et al.*, 2020).

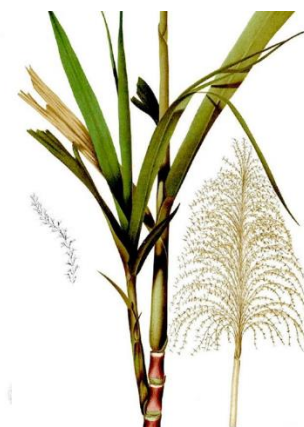


Figura 1.6 Caña de azúcar, *Saccharum officinarum* L. Fuente: Wikipedia. Recuperado de (https://ast.m.wikipedia.org/wiki/Ficheru:Saccharum_officinarum_Blanco1.18-cropped.jpg)

Como se puede observar en la Tabla 1.6, los 10 mayores productores mundiales representan una producción de 1,584 millones de ton anual en una superficie aproximada de 21,595,079 hectáreas (Nunes *et al.*, 2020), siendo México el sexto lugar en la producción de caña a nivel mundial.

Tabla 1.6 Producción de caña de azúcar y área de cultivo en los 10 países principales (Nunes *et al.*, 2020)

País	Producción (Toneladas/Año)	Área (Hectáreas)
Brasil	768,678,382	10,226,205
India	348,448,000	4,950,000
Porcelana	123,059,739	1,675,215
Tailandia	87,468,496	1,336,575
Pakistán	65,450,704	1,130,820
México	56,446,821	781,054
Colombia	36,951,213	416,626
Australia	34,403,004	447,204
Guatemala	33,533,403	259,850
Estados Unidos de América	29,926,210	370,530

Al extraer el jugo de los tallos de la caña, la parte sólida llamada “bagazo”, tal y como se muestra en la Figura 1.7, representa el 30 % de la residual (Becerra *et al.*, 2016), y se emplea comúnmente para la generación de vapor en calderas de los ingenios azucareros, así como, materia prima para la fabricación de papel, paneles aglomerados y destilación de alcohol; sin embargo, a pesar de sus diversos usos, es común que en países en vías de desarrollo sean dispersados en vertederos o reducidos a cenizas, provocando problemas de contaminación ambiental (Díaz *et al.*, 2022).



Figura 1.7 Bagazo de caña de azúcar. Fuente: Smartgreen. Recuperado de (<https://smartgreen.com.mx/bagazo-de-cana-de-azucar/>).

En el año 2020, en México, se generaron 16.9 millones de toneladas de bagazo de caña (SIAP, 2020), por lo que se considera un material abundante y disponible en gran parte del país, ya que actualmente operan 50 ingenios distribuidos en 15 estados de la República Mexicana (Tabla 1.7). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas ecológicas a partir de toda la biomasa que se genera a nivel nacional se puede convertir en un área de oportunidad para la producción de etanol y obtener resultados favorables comparado con los países con mayor producción de bioetanol.

Tabla 1.7 Número de ingenios azucareros por estado en México

Estado	Cantidad de Ingenios	Estado	Cantidad de Ingenios
Campeche	1	Puebla	2
Chiapas	2	Quintana Roo	1
Colima	1	San Luis Potosí	4
Jalisco	6	Sinaloa	1
Michoacán	3	Tabasco	2
Morelos	2	Tamaulipas	2
Nayarit	2	Veracruz	18
Oaxaca	3		

Según Gutiérrez *et al.* (2020), la obtención de productos de alto valor agregado a partir del bagazo, así como su aprovechamiento en la cogeneración de energía, requiere la implementación de una estrategia integral que contemple múltiples factores. Entre estos, se destaca la necesidad de contar con tecnologías que sean tanto técnica como económicamente viables, la integración eficiente del proceso productivo para optimizar la cadena de valor, y la existencia de un mercado consolidado que garantice la viabilidad y sostenibilidad económica del proceso. Estas consideraciones son fundamentales para maximizar el aprovechamiento del bagazo y asegurar la competitividad en el entorno industrial.

A nivel global, el procesamiento de la caña de azúcar para la producción de azúcar y etanol genera un volumen considerable de residuos sólidos y líquidos, así como subproductos tales como paja, bagazo, lodo prensado, aguas residuales, cenizas derivadas de la incineración del bagazo, vinazas resultantes de la destilación del etanol y melazas (Ungureanu *et al.*, 2022). La gestión de estos residuos y subproductos requiere un enfoque estratégico que considere tanto la sostenibilidad como la viabilidad económica. En este contexto, la valorización de residuos líquidos, como las vinazas, es especialmente relevante debido a su elevado contenido en materia orgánica y azúcares, lo que les confiere una rápida fermentación. Este proceso permite su aprovechamiento mediante digestión anaeróbica para la producción de biogás, biohidrógeno y otros compuestos de interés, contribuyendo a una mejor integración del proceso productivo y diversificación de la cadena de valor (Silva *et al.*, 2019; Gutiérrez *et al.*, 2020)

1.4.1 Composición del bagazo de caña

El bagazo de caña, al igual que otros materiales lignocelulósicos, está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Este material también presenta una composición que incluye entre un 45 a 50 % de agua, 2 a 5 % de azúcares disueltos, 40 a 45 % de fibra y 60 a 80 % de carbohidratos (Sahu, 2018).

Con la continua expansión de la industria azucarera en los últimos años, el bagazo ha trascendido su papel de residuo y se ha consolidado como una materia prima clave en la generación de energía y la producción de productos de alto valor agregado (de Armas *et al.*, 2019). Su alto contenido de lignina, celulosa, hemicelulosa y azúcares lo convierte en un sustrato ideal para el crecimiento microbiano, lo que lo hace apto para procesos de fermentación fundamentales en las biorrefinerías.

La presencia de estos componentes ha sido documentada para diversos desechos agroindustriales (Kumar y Sharma, 2017). En la Tabla 1.8 se muestra una comparación de la composición química del bagazo de caña con otros residuos agroindustriales, resaltando la importancia del material lignocelulósico.

Tabla 1.8 Composición química de materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol (Kumar y Sharma, 2017)

Biomasa Lignocelulósica	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Bagazo de Caña de Azúcar	42	25	20
Mazorca de Maíz	45	35	15
Rastrojo de Maíz	38	26	19
Paja de Arroz	32	24	28
Paja de Trigo	29-35	26-32	16-21
Residuos agrícolas	5-15	37-50	25-50

La producción de bioetanol a partir de la caña de azúcar se basa en el procesamiento del jugo de la planta, en mezclas de jugo y residuos de melaza de la producción de azúcar, por otro lado, la paja y el BCA muestran potencial para ser utilizados como materias primas, sin embargo, requieren pretratamiento (Bermejo *et al.*, 2020).

1.5 Pretratamientos para la obtención de azúcares fermentables

El pretratamiento, se considera un paso crítico en la transformación de la lignocelulosa en combustibles y productos bioquímicos (Do Espírito *et al.*, 2019), con el objetivo principal, la separación de la lignina y hemicelulosa de la celulosa, así como la reducción de la cristalinidad y aumento de la porosidad. Esto permite una mayor exposición de la celulosa a las enzimas hidrolíticas, optimizando la eficiencia de las etapas subsecuentes. Dependiendo del tipo de biomasa a procesar, se utilizan distintos tipos de pretratamientos, los cuales se clasifican en físicos, químicos y biológicos (ver Figura 1.8).

Estos pretratamientos se seleccionan y aplican de acuerdo con las características específicas de la biomasa y las exigencias del proceso, con el fin de optimizar el rendimiento de la etapa de hidrólisis subsiguiente.

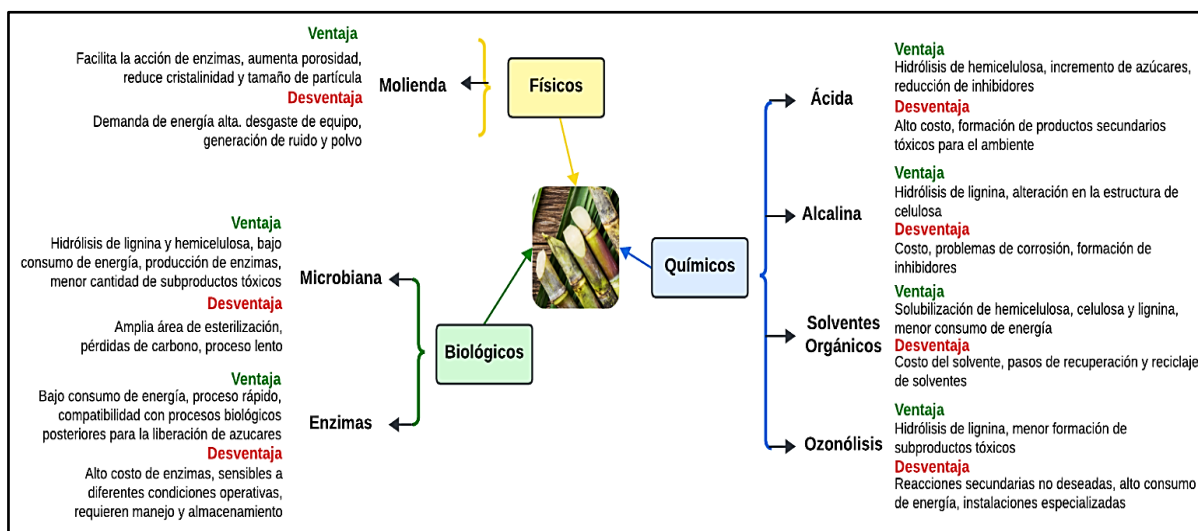


Figura 1.8 Ventajas y desventajas de los diferentes pretratamientos para la obtención de azúcares fermentables

1.5.1 Pretratamientos Físicos

En la etapa inicial, la biomasa se somete a un proceso de molienda o trituración con el fin de reducir el tamaño de las partículas y facilitar su manipulación en etapas posteriores. Posteriormente, se realiza un pretratamiento físico y/o químico, que puede incluir métodos como la aplicación de ácido diluido, tratamiento alcalino, extracción con solventes o explosión con vapor, entre otros. Sin embargo, uno de los desafíos principales de los pretratamientos físicos es su alto consumo energético, lo cual puede comprometer la viabilidad económica del proceso. Por esta razón, la reducción de los costos de producción se ha convertido en un objetivo prioritario para mejorar la eficiencia y sostenibilidad de esta etapa.

Pretratamiento Mecánico: En esta fase, se busca disminuir el tamaño de las partículas o perturbar la estructura regular de los materiales lignocelulósicos con el propósito de disminuir el grado de polimerización de la celulosa y la lignina, al mismo tiempo que se incrementa la superficie accesible para las enzimas (Espinosa *et al.*, 2021). Es relevante destacar que, aunque se produce una modificación significativa, la lignina no se elimina por completo del sustrato lignocelulósico durante este proceso. Este pretratamiento se realiza mediante la utilización de diversos tipos de molinos, como el de cuchillas o de lijas, que posibilitan la trituración o molienda de materiales de alta dureza o fibrosidad, lo que contribuye a reducir la cristalinidad de la celulosa.

1.5.2 Pretratamientos Químicos

Los pretratamientos químicos tienen como objetivo principal la remoción de hemicelulosa y lignina de la biomasa, y su eficacia depende del tipo de agente químico utilizado (ácido, alcalino, oxidativo u orgánico) y de las condiciones operativas. Sin embargo, el uso de agentes químicos, especialmente en condiciones ácidas, puede generar compuestos inhibidores de la fermentación, como 5-hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido fórmico y furfural, que impactan negativamente la etapa de fermentación si el hidrolizado no es desintoxicado adecuadamente (Sarto *et al.*, 2018).

Hidrólisis ácida: Este método implica la ruptura de las fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes que mantienen la estructura de la biomasa, causando la lisis celular y liberación de compuestos intracelulares (Sarto *et al.*, 2018). Se emplean ácidos como el clorhídrico (HCl), nítrico (HNO₃), acético (CH₃COOH) y sulfúrico (H₂SO₄), siendo este último el más utilizado. Este proceso genera una fracción líquida rica en azúcares fermentables y una fracción sólida de celulosa y lignina, aunque implica riesgos por la toxicidad y corrosividad de los ácidos, lo que demanda materiales resistentes a la corrosión.

Hidrólisis alcalina: Utiliza agentes alcalinos y se caracteriza por operar a bajas temperaturas y tiempos de tratamiento variables, de horas a días. Este método provoca la hinchazón de las partículas orgánicas por la acción de aniones hidroxilo (OH), resultando en deslignificación, disminución de la cristalinidad y ruptura de enlaces éster intermoleculares. Pueden emplearse soluciones de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), potasio (KOH), amoníaco (NH_3) e hidróxido de sodio (NaOH), siendo este último el más común por su costo reducido y eficacia en la mejora del rendimiento de biogás sin generar subproductos indeseados (Ungureanu *et al.*, 2022).

Ozonólisis: Este pretratamiento se basa en la oxidación de la biomasa con ozono (O_3), un método ambientalmente amigable que no deja residuos tóxicos. La ozonólisis es eficaz en la descomposición de la lignina y mejora la accesibilidad de la celulosa y la hemicelulosa a las enzimas durante la hidrólisis enzimática, ya que el ozono, soluble en agua, oxida la lignina liberando compuestos solubles de menor peso molecular, lo que favorece la liberación de azúcares fermentables (Aftab *et al.*, 2019). La eficiencia de la oxidación depende del contenido de humedad de la biomasa, que puede disminuir el rendimiento si es alto.

Solventes Orgánicos (Organosolv): Este método emplea disolventes orgánicos, como alcoholes, ácidos orgánicos o ésteres, para disolver la lignina y facilitar la exposición de las fibras de celulosa, mejorando así la hidrólisis. El etanol es uno de los solventes más utilizados, incrementando el rendimiento de metano, aunque debe retirarse antes de la digestión anaerobia para evitar la inhibición de enzimas hidrolíticas (Espinosa *et al.*, 2021; Abraham *et al.*, 2020). El proceso organosolvente es atractivo por generar menos residuos y requerir menos energía para neutralizar el hidrolizado. Diversos catalizadores, como ácido sulfúrico, hidróxido de sodio y sulfato de magnesio, pueden potenciar la eficiencia, destacando el hidróxido de sodio como una opción efectiva para mejorar la digestibilidad de la biomasa (Korasapati *et al.*, 2023).

1.5.3 Pretratamientos Biológicos

Los pretratamientos biológicos consisten en el uso de enzimas o microorganismos, como bacterias y hongos, para reducir la cristalinidad de la biomasa lignocelulósica y convertir la celulosa y hemicelulosa liberadas en monosacáridos fermentables como glucosa y xilosa (Konde *et al.*, 2021). Comparados con los métodos físicos y químicos, estos pretratamientos ofrecen beneficios ecológicos, como un menor requerimiento de energía, operación bajo condiciones suaves y la ausencia de compuestos tóxicos. No obstante, presentan desafíos significativos, entre ellos la necesidad de grandes áreas estériles, tiempos de operación prolongados y altos costos asociados a las enzimas (Brémond *et al.*, 2018).

Hidrólisis Enzimática: Este proceso biológico es crucial para la producción de bioetanol, ya que permite la obtención de monosacáridos listos para la fermentación mediante la acción de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas (Mirón, 2020). La selección de las enzimas adecuadas y el control de variables como concentración, temperatura, pH y tiempo de reacción son esenciales para optimizar la producción de azúcares fermentables y minimizar la formación de subproductos no deseados.

Las enzimas implicadas en la hidrólisis enzimática se clasifican en tres grupos principales: endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas (BGL). Estas trabajan en conjunto para descomponer las cadenas de celulosa en glucosa, un paso clave en el procesamiento de biomasa lignocelulósica como el bagazo de caña de azúcar. Los azúcares obtenidos son fermentables y pueden ser convertidos en etanol por microorganismos como las levaduras, lo cual constituye una etapa esencial en la producción de bioetanol (Sun y Cheng, 2002).

1.6 Microorganismos empleados en la producción de bioetanol

1.6.1 Celulasas

Las celulasas constituyen un complejo de enzimas hidrolíticas que se clasifican en función de su acción sobre el sustrato durante la etapa de depolimerización (Ver Figura 1.9). Su función esencial es catalizar los enlaces β -1,4 glucosídicos presentes en la celulosa, permitiendo así la obtención de glucosa (Miranda, 2019). Estas enzimas actúan de manera sinérgica y se dividen principalmente en tres clases para llevar a cabo una hidrólisis eficiente de la celulosa:

1. **Endoglucanasas:** Estas enzimas actúan sobre las regiones amorfas de la celulosa, rompiendo los enlaces β -1,4 para producir fragmentos más cortos de cadenas de glucosa. La acción no sigue un patrón lineal, ya que las endoglucanasas cortan la cadena en diversos puntos, generando productos con extremos no reducidos, los cuales son más susceptibles a la acción de las exoglucanasas y las celobiasas (Mirón, 2020).

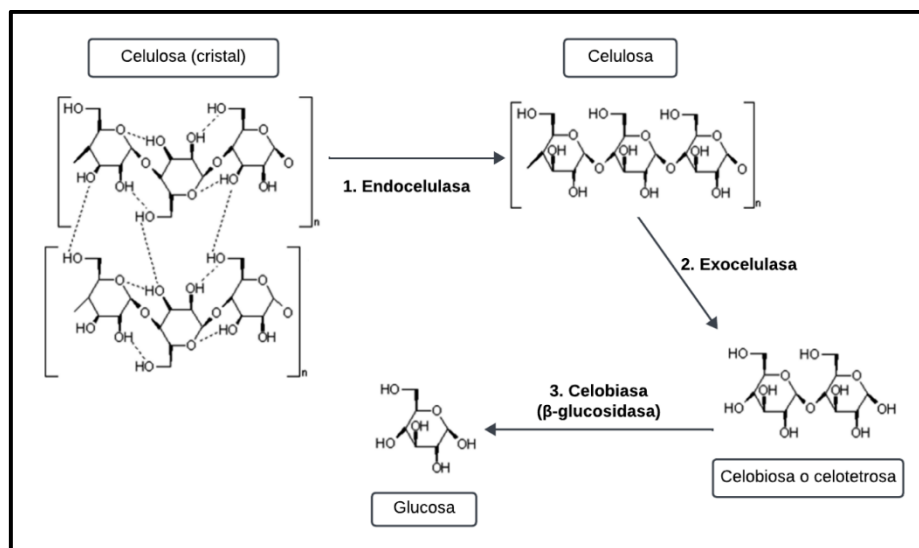


Figura 1.9 Mecanismo de reacción de celulasas durante la hidrólisis. Fuente: Adaptado de Wikipedia. Recuperado de (<https://hmn.wiki/es/Cellulase>).

2. **Exoglucanasas:** También conocidas como celulasas, estas enzimas atacan los extremos de las cadenas de celulosa, tanto el reductor (C1) como el no reductor (C4). Las exoglucanasas hidrolizan los enlaces β -1,4 glucosídicos de manera secuencial, liberando glucosa y moléculas de celobiosa, que es un dímero de glucosa. Este proceso reduce progresivamente las cadenas de celulosa a monómeros de glucosa y pequeños oligómeros (Mirón, 2020).
3. **Celobiasas (β -Glucosidasas):** Estas enzimas descomponen la celobiosa, un producto de la acción de las exoglucanasas, rompiendo los enlaces β -1,4-glucosídicos para liberar dos moléculas de glucosa. Las celobiasas son esenciales para completar la descomposición de la celulosa, ya que convierten los fragmentos de celobiosa en glucosa, facilitando así la disponibilidad de azúcares fermentables (Mirón, 2020).

La acción coordinada de estas enzimas es fundamental para optimizar la conversión de celulosa en glucosa y mejorar la eficiencia global del proceso de hidrólisis en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica.

1.6.2 Producción de celulasas

En los últimos años, la investigación sobre la producción de celulasas por parte de bacterias y hongos ha cobrado gran relevancia, dado que estas enzimas son fundamentales para la descomposición de carbohidratos. A diferencia de otros organismos, las celulasas no requieren lípidos ni proteínas como fuentes de energía para su crecimiento y metabolismo, lo que otorga a estos microorganismos una ventaja significativa en entornos de producción biológica. Entre las celulasas bacterianas, se han identificado ventajas notables frente a las fúngicas, incluyendo una mayor eficiencia en la transferencia de masa, una actividad específica más elevada y una estabilidad superior en condiciones operativas diversas (Ilić *et al.*, 2023).

Existen diversas cepas de bacterias celulolíticas que sintetizan enzimas con alta resistencia a condiciones ambientales adversas. Entre estas destacan *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Escherichia sp.*, *Serratia sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Clostridium sp.*, *Streptomyces sp.* y *Cellulomonas sp.* (Ejaz *et al.*, 2021). Estas bacterias se aíslan frecuentemente de entornos extremos y se caracterizan por su rápida tasa de crecimiento y accesibilidad comercial.

En cuanto a los hongos, muchas especies como *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Beauveria sp.*, *Humicola sp.*, producen una cantidad significativa de celulasas (Ejaz *et al.*, 2021). Los hongos tienen la ventaja de poder generar enzimas celulolíticas durante su desarrollo en sustratos de bajo costo, lo cual los posiciona favorablemente frente a las bacterias en ciertos contextos industriales.

La selección entre celulasas bacterianas y fúngicas para aplicaciones biotecnológicas, como la producción de bioetanol, depende de múltiples factores, incluidos la eficiencia enzimática, la facilidad para la manipulación genética, la disponibilidad comercial y las características específicas del proceso industrial (Ilić *et al.*, 2023). Otros aspectos críticos a considerar en la producción de celulasas incluyen el método de fermentación, la temperatura, el pH, el tiempo de incubación, y las fuentes de carbono y nitrógeno.

1.6.2 *Aspergillus Niger* ITV-02

Además de la levadura, reconocida como un sistema eucariota idóneo para la ingeniería metabólica, el género *Aspergillus*, y en particular *Aspergillus niger*, ha emergido como un organismo clave en la producción industrial de productos como ácido cítrico, enzimas y biocombustibles. Este hongo filamentoso se destaca por ser una fuente eficaz de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, cruciales para la degradación de la biomasa lignocelulósica y la obtención de azúcares fermentables, paso esencial en la producción de biocombustibles (Dhevagi *et al.*, 2021). La capacidad de *A. niger* para descomponer los componentes estructurales de la biomasa

vegetal está directamente relacionada con su potencial en la síntesis de estas enzimas y una adecuada regulación génica.

Una característica importante de las enzimas producidas por *A. niger* es su tolerancia a concentraciones elevadas de glucosa y xilosa, ya que éstas pueden desencadenar represión catabólica y disminuir la eficiencia del proceso. Las condiciones óptimas de producción de estas enzimas se sitúan en un rango de temperatura de 30-45 °C, con una agitación de 100 a 200 rpm, para maximizar la actividad enzimática y la conversión de la biomasa (Miranda, 2019).

La optimización de la producción de celulasas mediante *A. niger* ha sido objeto de diversos estudios que emplean materiales lignocelulósicos como sustratos, tales como bagazo de caña, bagazo de sorgo, rastrojo de maíz, cáscara de arroz y paja de cebada. Estos estudios buscan establecer las condiciones óptimas de producción en función de variables como la fase de crecimiento del hongo, la concentración de sustrato, la temperatura, el pH y la agitación. La meta es desarrollar un proceso eficiente y sostenible para la obtención de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica, mejorando la rentabilidad y el rendimiento del proceso industrial (Miranda, 2019).

1.6.3 Aplicación de celulasas

En los últimos años, las enzimas celulasas han despertado un notable interés debido a su creciente demanda y múltiples aplicaciones industriales (Ejaz *et al.*, 2021; Ilić *et al.*, 2023). Su aplicación abarca en diversos sectores, destacándose los siguientes:

- **Industria alimentaria:** Se emplean para una variedad de funciones, como ablandar frutas, clarificar jugos, extraer compuestos aromatizantes y aceites esenciales, y mejorar la conservación y envasado de alimentos, optimizando procesos y productos.

- **Industria vinícola:** No solo mejoran la calidad y estabilidad del vino, sino que también facilitan su clarificación, optimizan el desarrollo del color y favorecen la maceración.
- **Extracción de carotenoides:** Estas enzimas se utilizan para extraer carotenoides de fuentes vegetales, los cuales se aplican como agentes colorantes en alimentos y bebidas, incrementando su atractivo visual.
- **Industria textil:** Las celulasas se aplican en el biopolido (biopolishing), un proceso de acabado que mejora la apariencia y el tacto de los tejidos de algodón, aportando mayor brillo y suavidad a las telas.
- **Sector de detergentes:** En formulaciones de detergentes, las celulasas contribuyen a la limpieza de tejidos, eliminando suciedad y realzando el brillo de los colores, mientras protegen la integridad de las prendas.
- **Industria papelera:** Las celulasas intervienen en la descomposición de la lignina y la celulosa de la madera, facilitando el procesamiento de la pulpa y mejorando la calidad del papel. Su uso contribuye a incrementar la eficiencia del proceso y a reducir la dependencia de productos químicos agresivos.
- **Biocombustibles y biorrefinerías:** En el campo de la energía, las celulasas juegan un papel esencial al hidrolizar la biomasa lignocelulósica en azúcares simples, que pueden ser fermentados para la producción de biocombustibles, promoviendo un enfoque más sostenible en la generación de energía.

La versatilidad de las celulasas y su relevancia en procesos industriales subrayan su valor como herramienta biotecnológica, impulsando avances en sostenibilidad y eficiencia en múltiples sectores productivos.

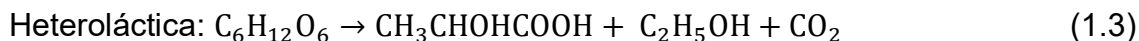
1.7 Fermentación

Durante la conversión de biomasa lignocelulósica a bioetanol, los azúcares de hexosa generados tras la etapa de hidrólisis son transformados en etanol mediante procesos de fermentación. El término "fermentación" proviene del latín *fervere*, que significa "hervir", en referencia a la acción de las levaduras sobre extractos de frutas o cereales malteados, donde la liberación de dióxido de carbono durante el catabolismo anaeróbico del azúcar genera burbujeo, simulando ebullición.

La fermentación es un proceso metabólico en el que los azúcares se consumen en condiciones anaeróbicas (ausencia de oxígeno). Este fenómeno ocurre principalmente en levaduras y ciertos tipos de bacterias, así como en células musculares en condiciones de falta de oxígeno, resultando en la producción de alcohol, gases o ácidos orgánicos (Ruan *et al.*, 2019). En particular, la fermentación alcohólica, mediada por levaduras, es un proceso clave en la producción de bioetanol, por la conversión de azúcares en etanol y dióxido de carbono, como se describe en la siguiente ecuación (1.1).



Los ácidos orgánicos se generan principalmente a través de procesos de fermentación homoláctica y heteroláctica, que se describen en las ecuaciones (1.2) y (1.3), respectivamente. En el contexto de la producción de bioetanol, una vez obtenido el etanol, es necesario someterlo a procesos de destilación y deshidratación para alcanzar un alcohol de alto octanaje y libre de agua (Champagne, 2008). Aunque existen múltiples técnicas y procedimientos para la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, el desafío de lograr rendimientos económicamente viables persiste, especialmente cuando se utilizan desechos lignocelulósicos como materia prima (Kumar y Chandra, 2020).



En este escenario, las levaduras han sido ampliamente utilizadas como los microorganismos predominantes en los procesos de fermentación, debido a su capacidad eficiente para fermentar diversos azúcares, produciendo alcohol y dióxido de carbono como subproductos. Las levaduras no solo destacan por su rapidez en el proceso de fermentación, sino también por su notable tolerancia a distintas condiciones ambientales y su capacidad de adaptarse a diferentes sustratos lignocelulósicos. Esta adaptabilidad las convierte en candidatas ideales para la producción de biocombustibles a partir de una variedad de fuentes de biomasa.

1.7.1 Métodos de fermentación

Como se mencionó previamente, la fermentación es un proceso bioquímico de gran relevancia en la industria, especialmente en la producción de diversos productos. En el ámbito específico de los biocombustibles, existen diversos métodos de fermentación, que se emplean de acuerdo al producto final deseado, la disponibilidad de sustratos y las condiciones de proceso más adecuadas (Figura 1.10). A continuación, se describen algunos de estos métodos destacados:

A. Hidrólisis y fermentación separadas (SHF): Este proceso, (Figura 1.10 A), es una técnica bioquímica ampliamente utilizada en la producción de biocombustibles, específicamente en la conversión de biomasa lignocelulósica en etanol. Esta metodología, reconocida por su alta eficiencia, comprende dos etapas fundamentales: la hidrólisis enzimática de la biomasa para liberar azúcares fermentables y la fermentación de estos azúcares para la generación de biocombustibles (Esquivel-Hernández, *et al.*, 2022).

Un desafío crítico en el SHF es la inhibición por retroalimentación, donde los azúcares liberados durante la hidrólisis ralentizan la actividad enzimática, lo que

limita la eficiencia de la descomposición de la biomasa (Maslova *et al.*, 2019). Esto conlleva la necesidad de una mayor carga enzimática o de tiempos prolongados de procesamiento, afectando la viabilidad económica del proceso.

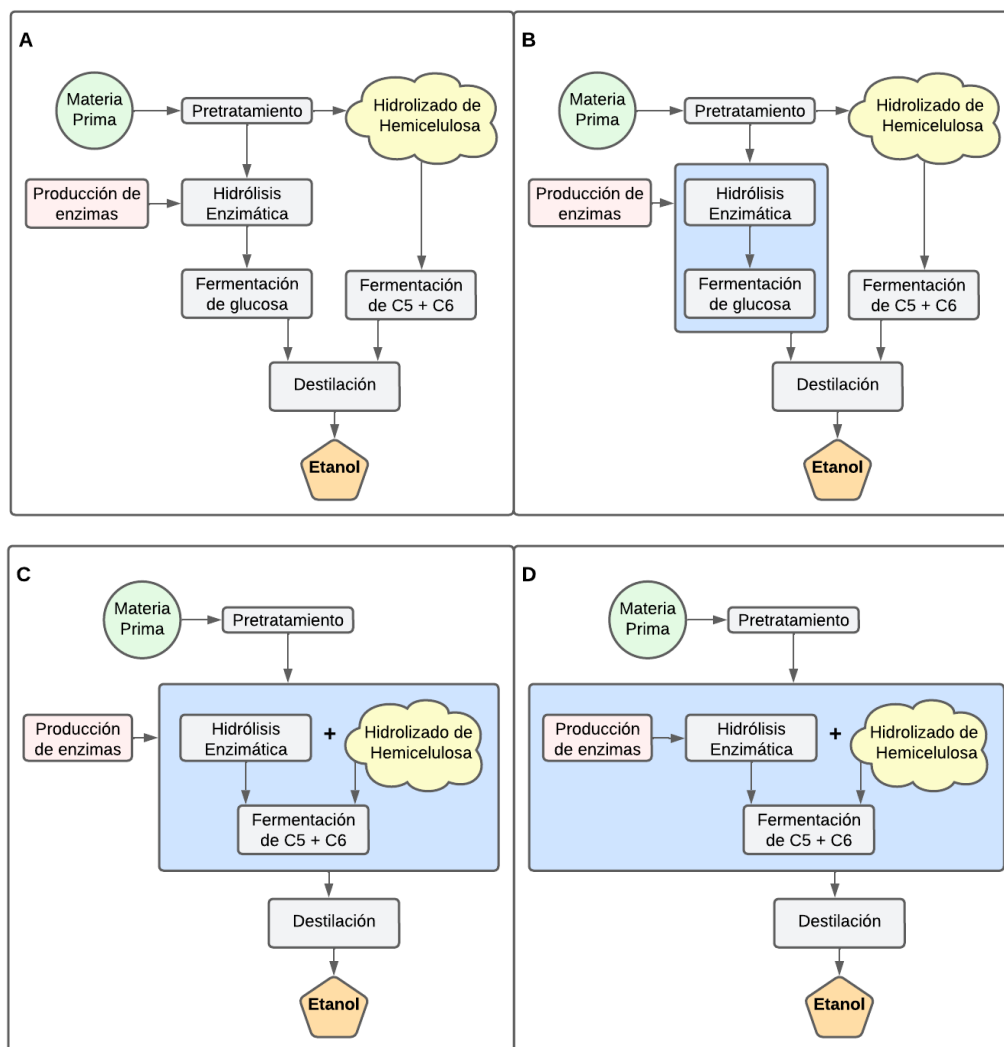


Figura 1.10 Métodos de fermentación para la producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica. A) SFH, B) SSF, C) SSfC y D) CBP. Fuente: Adaptado de (Camesasca, 2013).

B. La sacarificación y fermentación simultáneas (SSF): Este método, (Figura 1.10 B), combina la hidrólisis enzimática y la fermentación en un único sistema reactor (Esquivel-Hernández *et al.*, 2022). Esta integración permite la coexistencia de enzimas y microorganismos fermentadores, lo que previene la

acumulación de azúcares y reduce las inhibiciones por sustrato (Maslova *et al.*, 2019). Además, la SSF presenta ventajas operativas como la reducción de equipos y espacio, disminuyendo costos de capital y operativos.

El principal reto en la SSF es la optimización de las condiciones de operación, debido a que los parámetros ideales de temperatura, pH y concentración de sustrato pueden diferir entre la sacarificación y la fermentación. Lograr un equilibrio adecuado es esencial para maximizar la conversión de biomasa y la tolerancia de los microorganismos a las condiciones del proceso (Haokok *et al.*, 2023).

C. La sacarificación y cofermentación simultáneas (SScF): Esta etapa, (Figura 1.10 C), integra la sacarificación y la fermentación en un solo reactor, permitiendo que las enzimas y los microorganismos actúen simultáneamente en la conversión de azúcares, pentosas y hexosas (Esquivel-Hernández *et al.*, 2022). Esta estrategia busca mejorar la eficiencia global del proceso y reducir los tiempos de residencia, al tiempo que evita la inhibición enzimática, optimizando la actividad y acelerando la conversión de la biomasa (Haokok *et al.*, 2023).

D. El bioprocesamiento consolidado (CBP): Este proceso, (Figura 1.10 D), representa un enfoque innovador que integra la producción de enzimas, la sacarificación y la fermentación de hexosas y pentosas en un solo reactor.

Éste emplea microorganismos multifuncionales, generalmente cepas modificadas de bacterias o levaduras, para realizar todas las etapas de manera integrada (Esquivel-Hernández *et al.*, 2022).

Aunque simplifica el proceso y reduce costos, su implementación a gran escala enfrenta a barreras significativas, incluyendo altos costos operativos y la necesidad de instalaciones especializadas (Ahmad *et al.*, 2020). Por ello, se

considera que el CBP aún requiere un desarrollo considerable para superar estos desafíos y competir en términos de productividad con las metodologías SHF y SSF (Kawaguchi *et al.*, 2016).

1.8 Levadura *Saccharomyce Cerevisiae* para la producción de bioetanol

Las levaduras representan los microorganismos más comúnmente empleados en procesos de fermentación, destacándose entre ellas la *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) por ser la más estudiada y utilizada en la producción de etanol. Esto se debe a su sistema genético bien caracterizado y su alta disponibilidad comercial. Esta levadura puede metabolizar eficientemente tanto disacáridos como la sacarosa, así como azúcares simples como la glucosa, y exhibe una notable resistencia tanto al etanol como a diversos inhibidores presentes en los hidrolizados de biomasa (Korasapati *et al.*, 2023).

El desarrollo de nuevos pretratamientos, métodos de hidrólisis y técnicas de fermentación ha influido significativamente en la liberación y aprovechamiento de glucosa. Sin embargo, una de las limitaciones clave en la bioconversión de biomasa lignocelulósica es la incapacidad de *S. cerevisiae* de fermentar eficientemente azúcares de cinco carbonos, como la xilosa, debido a la ausencia de los genes necesarios para su asimilación. Aunque se han realizado modificaciones metabólicas en *S. cerevisiae* para ampliar su capacidad de convertir xilosa en etanol, aún no se han desarrollado cepas comerciales que lo hagan de manera óptima y eficiente (Konde *et al.*, 2021).

1.9 Antecedentes

Miranda (2019), estableció una producción de celulasa a partir de *Aspergillus niger* /ITV02 utilizando como biomasa diferentes residuos lignocelulósicos (Bagazo de caña, bagazo de sorgo, cáscara de arroz, paja de cebada y rastrojo de maíz), de los cuales

realizaron una optimización de Box Benhen evaluando el efecto de la temperatura, pH y agitación. En base a lo anterior obtuvo una mejor producción con 10 g/L de residuo lignocelulósico a 33°C, 5.3 de pH a 200 rpm

Khaire *et al.* (2021), llevaron a cabo una bioconversión de las puntas de caña de azúcar (PCA) siendo su composición aproximada del 40 al 45% de celulosa, 25 al 30% de hemicelulosa y 15 al 19% de lignina, con el objetivo de obtener bioetanol a partir de diversos métodos de pretratamiento, para la obtención de productos de valor agregado como el xilano, lignina y furfural. Estos son considerados con un enfoque industrial más eficiente, dada su aplicación en la producción de oligosacáridos, bioetanol y petroquímicos derivados del petróleo. Cabe destacar que la identificación de un método de separación rentable para la extracción a gran escala de xilano y lignina a partir de las PCA sigue siendo objeto de investigación continua.

Rasid *et al.* (2021), concluyeron avances en los años 2018 a 2021 para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, abarcando métodos ecológicos como la ozonólisis, los líquidos iónicos, los disolventes eutécticos profundos (DES), el organosolv y la explosión de vapor métodos para mejorar la producción de biocombustibles. Estos métodos se analizan para determinar sus parámetros de proceso óptimos que maximizan la degradación de la lignina, el rendimiento del azúcar de hidrólisis, así como minimizan el tiempo de reacción, el consumo de reactivos, inversión económica y consumo de energía.

Al-Mardeai *et al.* (2022), realizaron una investigación empleando el uso de biorreactores de membrana para mejorar la hidrólisis enzimática de la celulosa con una membrana de ultrafiltración de polietersulfona con un corte molecular de 10 kDa, obteniendo un rendimiento máximo de 86.7 % en la conversión de azúcares en un periodo de 8 h, siendo esta una estrategia para la optimización en la producción de biocombustibles.

Ranganathan *et al.* (2022), analizaron enfoques experimentales y computacionales para mejorar las celulasas, destacando que la combinación de métodos de evaluación permitió desarrollar cepas mejoradas con alta actividad enzimática, optimizando la conversión de biomasa y el rendimiento de glucosa. Además, se evaluó un quimioenzimático compuesto por molibdeno y platino como alternativa sostenible frente a cepas como *Cellulomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.* y *Aspergillus niger*, mostrando su potencial en procesos lignocelulósicos.

Infanzón-Rodríguez *et al.* (2022), realizó una optimización multirrespuesta para la producción de exoglucanasas, endoglucanasa, y β -glucosidasa por *Aspergillus niger* ITV02 a partir de bagazo de caña deslignificado, empleando 20 g/L con 0.2% Tween 80 a un pH de 5.6 obteniendo un incremento en la actividad FPasa, CMCasa, BGL un 47.62, 65 y 47.4% respectivamente.

Devi *et al.* (2023), analizaron una visión panorámica del panorama tecnológico para la producción de bioetanol a partir de varias generaciones de materias primas. Este estudio se hizo con el fin de recolectar información en detalle de las materias primas de diferentes generaciones para proporcionar un conocimiento general sobre su proceso de bioconversión y poder aplicarlo a diferentes retos y perspectivas actuales en el ámbito de biocombustibles para obtener el mejor provecho de residuos lignocelulósicos y buscar solución a las barreras tecnológicas comunes que afectan la producción de bioetanol.

Hammond y McCann (2023), desarrollaron un procesamiento de bioetanol a partir de paja de trigo, realizaron análisis en una biorrefinería en el Reino Unido que procesa 237,000 toneladas métricas de paja de trigo (peso seco), generando aproximadamente 75 millones de litros (ML) de bioetanol desnaturalizado al año. La tecnología de proceso investigada fue el pretratamiento con ácido diluido y la hidrólisis enzimática obteniendo una reducción del 7% en la paja mojada durante el pretratamiento con un secado efectivo durante el proceso. El contenido de azúcar se mantuvo en un modesto

1.4% en peso seco, con un contenido de humedad del 6.5%, en comparación con los granos de trigo, que presentan un contenido de humedad del 15% en el contexto del Reino Unido. Además, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad para identificar los factores clave que influyen en los costos, destacando cambios en los rendimientos, con énfasis en el rendimiento de bioetanol y el rendimiento de la paja de trigo.

Hung *et al.* (2023), desarrollaron dos estrategias de alimentación adaptativas diseñadas para optimizar la productividad del etanol en la fermentación discontinua alimentada de 5 L utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. Estas estrategias se centraron en ajustar la adición del medio alimentario (suministro de azúcar) para aumentar la disponibilidad de azúcar fermentable, obteniendo como resultados un aumento del 20% en la productividad general del etanol, alcanzando valores de 0.88-0.04 g/Lh y 0.87-0.06 g/Lh, con notables rendimientos de etanol del 91% y títulos del 13% (v/v) respectivamente.

Mokomele *et al.* (2023), investigaron la fermentación eficiente de lechadas de bagazo de caña de azúcar utilizando *S. cerevisiae* resistente a xilosa, comparando diferentes técnicas de pretratamiento. El bagazo tratado con explosión de vapor resultó en mayores concentraciones de etanol. Se aplicó un enfoque de fermentación de sacarificación simultánea pre-hidrólisis (SHCF) para aumentar la carga de sólidos, y se encontró que el uso de todo el lodo de fermentación sin detoxificación produjo altos rendimientos de etanol. Se identificaron cepas de *S. cerevisiae* con mayor capacidad de consumo de xilosa y resistencia a inhibidores microbianos. Estos resultados tienen implicaciones industriales significativas, destacando el alto consumo de xilosa y las concentraciones elevadas de etanol obtenidas por ciertas cepas de *S. cerevisiae*, incluso en presencia de ácido acético.

Szopa *et al.* (2023), investigaron tecnologías recientes para tratar residuos mediante hidrólisis química, enzimática y procesos auxiliares, enfocándose en residuos biológicos con alto contenido proteico, grasas y azúcares. El artículo identifica los

residuos con mayor potencial, analiza regulaciones legislativas, compara la hidrólisis química y enzimática, y destaca la necesidad de optimizar estos métodos para mejorar la extracción de componentes valiosos como estimulantes de crecimiento de plantas, alimento para animales, productos químicos, biocombustibles y biopolímeros. Además, se abordan perspectivas futuras y se ofrecen pautas para desarrollar estas tecnologías, considerando su viabilidad económica y escalabilidad.

Varilla-Mazaba *et al.* (2024), optimizó la etapa de hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar para obtener la máxima concentración de xilosa y menor concentración de ácido acético empleando H_2SO_4 al 0.86 % v/v, con una RLS 6:1 mL/g, durante 22 min a 121°C y 1.1 atm. Se reportaron rendimientos de xilosa de 20 g/L y 3.05 g/L de ácido acético, con una remoción del 75% de hemicelulosa en el bagazo de caña.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología general

En la Figura 2.1, se presenta una descripción general de las etapas de la metodología propuesta a partir del aprovechamiento del material lignocelulósico derivado del BCA, considerando condiciones óptimas a nivel de planta piloto (PP), a fin de garantizar resultados confiables y reproducibles dentro del proceso de producción de azúcares fermentables a partir de hongos autóctonos para la producción de bioetanol 2G.

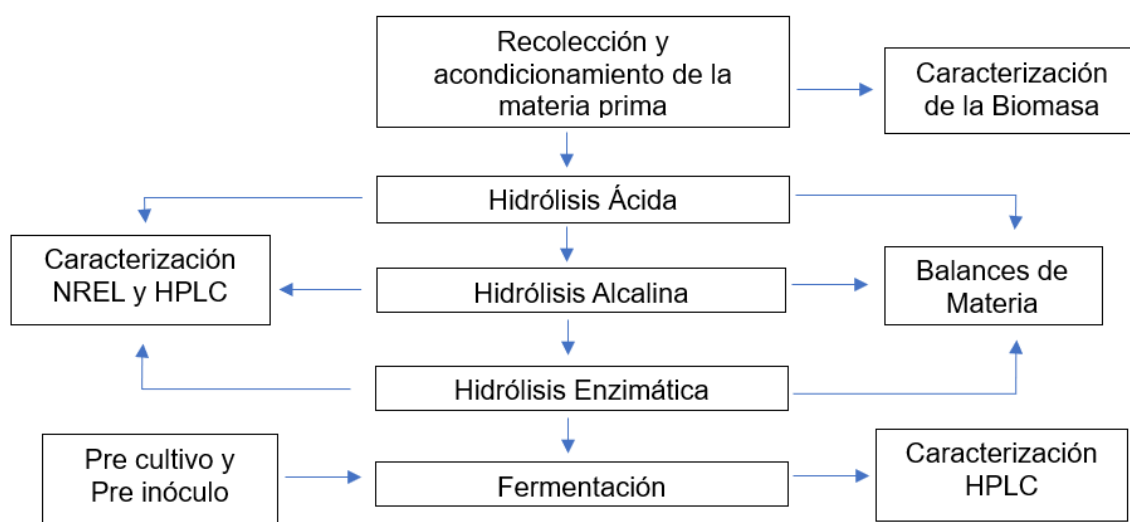


Figura 2.1 Metodología para la producción de bioetanol

2.2 Recolección y pretratamiento físico de la materia prima, secado y molienda

La caña de azúcar se adquirió del Instituto Nacional de Investigación Forestal, Veracruz, Ver. el cual, se sometió a un proceso de exprimido a través de un molino marca TILCA de 12 in, para la extracción del jugo y obtención del bagazo (Figura 2.2). El BCA resultante se sometió a secador solar, hasta alcanzar una humedad del 10%, y posteriormente se redujo su tamaño de 4-6 cm, a fin de facilitar su manipulación y aumentó de la superficie de contacto para la etapa de pretratamiento químico

empleando una ensiladora para verde seco, Avante Agrícola modelo PG-5000. Este proceso de trituración favoreció una preparación efectiva del material lignocelulósico para su posterior tratamiento.



Figura 2.2 Molino marca TILCA para la obtención de bagazo de caña

Las condiciones de operación de las tres etapas de hidrólisis evaluadas para este proyecto, consideraron las condiciones óptimas de tres variables (relación líquido-sólido (RLS), % de concentración del reactivo p/p y tiempo de cinética, obtenidas a nivel laboratorio por Moran-Aguilar (2018)

2.3 Hidrólisis ácida

2.3.1 Evaluación a nivel laboratorio

Se colocaron en dos vasos de precipitado de 4 L, 200 g de BCA, se les añadió una solución de H_2SO_4 al 3 % p/p, y una RLS 10:1 mL/g, posteriormente se esterilizaron con autoclave marca Felisa modelo FE339 a 121 °C durante 15 min. Una vez concluido el proceso de esterilización, el bagazo de caña de azúcar hidrolizado (BCAc), se exprimió, a fin de separar la fracción líquida y el bagazo sólido pretratado. A la fracción líquida obtenida se le determinó el pH con un potenciómetro marca Hanna modelo HI1131, se etiquetó y almacenó en un congelador para su posterior análisis.

El BCAC, se lavó con una corriente de agua, para incrementar el pH a 7 aproximadamente. seis veces, utilizando una cantidad de 2 L de agua por lavado, después el bagazo se desintegró sobre charolas de aluminio para reducir humedad mediante radiación solar, 1 g de la muestra se colocó durante 30 min en una termobalanza XM 50 para registrar su contenido de humedad, menor al 10%. Por último, se tomaron muestras de cada lote de bagazo para análisis según el protocolo NREL para la evaluación de sus componentes.

2.3.2 Evaluación a nivel planta piloto

Se utilizó un reactor tipo tanque con una capacidad máxima de 1000 L (ver Figura 2.3), se emplearon 40 kg de BCA en cada corrida, empleando: H_2SO_4 al 3 % p/p, una RLS 10:1 L/kg durante 15 min. Una vez completado el proceso, se procedió a la descarga del lote, separando el BCAC mediante una malla. Para incrementar el pH a 7, se realizaron lavados con una corriente de agua, se prensó para eliminar la mayor cantidad de agua posible, y se colocó sobre una lona para someterlo a secado por radiación solar, hasta alcanzar una humedad por debajo del 10%. Una vez completada esta etapa se retiró una muestra de cada lote para su caracterización de NREL. Finalmente, el hidrolizado obtenido fue almacenado en un contenedor de 1000 L, reservando una muestra para su posterior caracterización por HPLC.

2.4 Hidrólisis alcalina

2.4.1 Evaluación a nivel laboratorio

Se tomaron dos lotes de BCAC (122 g y 115 g), que se trataron con H_2O_2 al 9 % p/p y una RLS 10:1 mL/g; una vez humedecido el bagazo se añadió gradualmente la solución de NaOH al 40 % para que no se incrementara la temperatura del vaso de precipitado hasta alcanzar un pH de 11.5, con un tiempo de cinética de 36 h. Se muestreo en la hora 12, 24, 36 a fin de analizar el bagazo mediante pruebas NREL.



Figura 2.3 Reactor de hidrólisis ácida

Al terminar el tiempo de la cinética, se exprimió el bagazo de caña hidrolizado alcalino (BCAI) para separar la fracción líquida. El BCAI se lavó con una corriente de agua para reducir el pH a 7.8 aproximadamente, posteriormente el BCAI se desintegró en trozos pequeños y se dispuso sobre charolas expuesta a la luz solar para facilitar la pérdida de humedad por debajo del 10%. Finalmente, se determinó la humedad del BCAI seco mediante una termobalanza XM 50, empleando 1 g de muestra 30 min. Una vez registrado un valor menor al 10 %, se determinó el peso del bagazo de cada lote.

2.4.2 Evaluación a nivel planta piloto

Se utilizó un tanque con una capacidad máxima de 3000 L (Figura 2.4). Se emplearon 20 kg de BCAC, distribuidos equitativamente para llevar a cabo dos corridas experimentales, empleando: H_2O_2 al 9 % p/p; una RLS 10:1 L/kg y un tiempo de cinética de 36 h. Una vez completado el proceso, se procedió a la descarga del lote, separando el BCAI mediante una malla para reducir el pH a 7 con lavados de una corriente de agua, tras esto, se prensó para eliminar la mayor cantidad de agua posible, y se colocó sobre una lona expuesta a la luz solar para facilitar la pérdida de humedad por debajo del 10%. Una vez completada esta etapa se retiró una muestra de cada lote para su caracterización de NREL.



Figura 2.4 Reactor de hidrólisis alcalina

2.5 Hidrólisis enzimática

2.5.1 Medio de cultivo de la enzima *Aspergillus niger* ITV02

La conservación del hongo *Aspergillus niger* ITV02 se realizó en refrigeración a 4° C, resemebrándolo, en placas de Petri que contuvieron un medio de agar con la siguiente composición: 25 g/L agar-agar, 10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona de caseína, 20 g/L glucosa, 40 g/L harina de sorgo. A este medio de conservación se añadieron 0.25 g/L de antibiótico (gentamicina) con el fin de evitar el crecimiento bacteriano, posteriormente se le ajustó un pH de 5.5 con una solución de H_3PO_4 al 5 %, y finalmente fue esterilizado en una autoclave marca Felisa modelo FE339 a 121° C durante 15 min.

2.5.2 Medio de adaptación a nivel matraz

El hongo se adaptó en 200 mL de medio sintético (10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona de caseína, 20 g/L glucosa, 10 g/L CMC), este medio corresponde al 10 % del medio de fermentación al cual se le ajustó un pH a 5.5 con una solución de H_3PO_4 al 5 %, y se esterilizó en una autoclave marca Felisa modelo FE339 a 121° C por 15 min. Se colocaron en una incubadora de agitación STIK, modelo PSB2125, México a 30°C y 200 rpm por 24 h en 4 matraces Erlenmeyer de 150 ml que contuvieron 50 ml de

medio de volumen definido. La cantidad de hongo transferido se calculó, a partir de las ecuaciones (2.1) y (2.2) para el de conteo de esporas de los cuales se transfirieron 2978 μL del hongo a cada matraz.

$$cel/mL = \frac{\bar{x} \cdot D \cdot 1 \times 10^6}{20} = x \text{ cel}/mL \quad (2.1)$$

$$\mu\text{L} = \left(\frac{6 \times 10^6 \text{ cel}/mL \cdot \text{Volumen del Medio (mL)}}{x \text{ cel}/mL} \right) * 100 \quad (2.2)$$

Donde: $\bar{x}$ es la media de esporas contadas en la cámara de Tommen, D es la dilución de la muestra definida por la ecuación 2.3.

$$\text{Dilución} = \frac{\text{Volumen total}}{\text{Volumen de la muestra}} \quad (2.3)$$

2.5.3 Medio de fermentación del hongo *Aspergillus niger* ITV02 a nivel matraz

La fermentación se realizó en un medio de 2 L distribuido en 4 matraces de 1L con 500 mL del medio compuesto por: 1.5 g/L extracto de levadura, 2 g/L KH_2PO_4 , 0.3 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.9 g/L Urea, 0.3 g/L CaCl_2 , 2.4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L peptona y 2 mL/L de Tween 80 %. La solución se mezcló asépticamente ajustando el pH a 5.5 con una solución de H_3PO_4 al 5 %, y finalmente fue esterilizado en una autoclave marca Felisa modelo FE339 a 121°C durante 15 min. Se añadieron 20 g de BCAA sin pretratamiento ácido previo, con las condiciones de RLS 10:1 mL/g; H_2O_2 9 % p/p; tiempo de cinética de 36 h se le suministraron 500 μL de medio Mandels a cada matraz, incubándose a 31°C y 200 rpm por 168 horas en una incubadora STIK, modelo PSB2125, México. El fermentado se centrifugó a 5000 rpm por 20 min en tubos falcon de 50 mL en una Centrífuga 5804 R Marca eppendorf.

2.5.4 Ultrafiltración por membrana

Se realizó una filtración por membrana de 10 kDa suministrándole nitrógeno a 1 bar con una capacidad de trabajo de 300 mL.

2.5.5 Determinación de la actividad enzimática celulasas

La actividad en papel filtro (FPasa) fue cuantificado de acuerdo a Ghose (1987). Los azúcares reductores fueron cuantificados por el método DNS (Dinitrosalicylic Acid), Miller (1959), como muestra en la Figura 2.5.

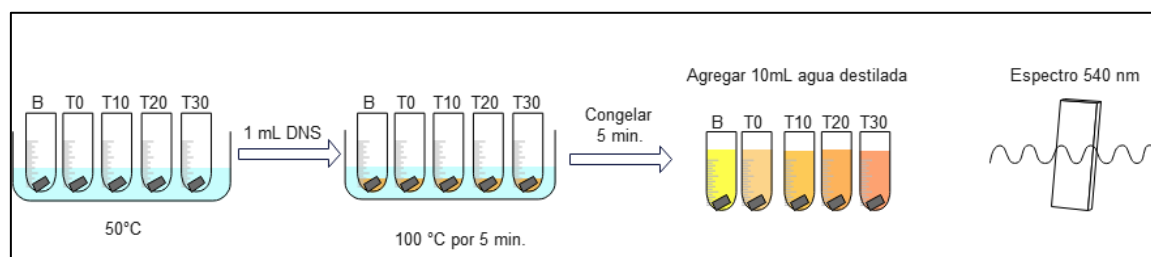


Figura 2.5. Metodología para medir la actividad exoglucanasa (FPasa)

La actividad endoglucanasa (CMCasa) fue medida por la liberación de azúcares reductores que fueron cuantificados por el DNS, Miller (1959), como se muestra en la Figura 2.6 usando el extracto enzimático en un buffer de acetato de sodio de pH 5, 0.05 M.

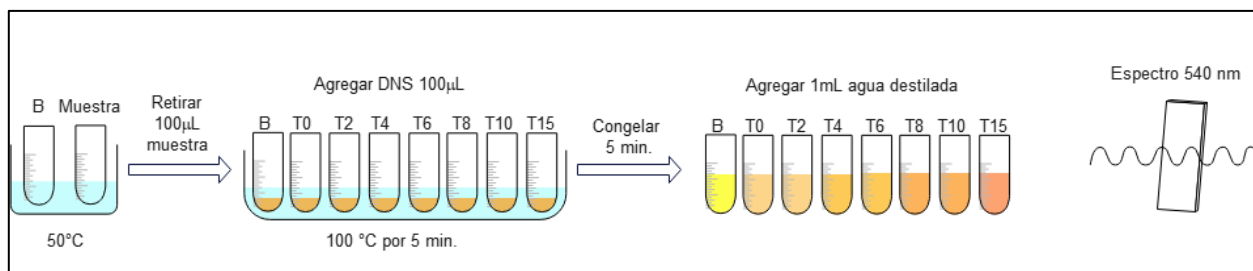


Figura 2.6 Metodología para medir la actividad endoglucanasa (CMCasa)

La actividad β -glucosidasa (BGL) fue determinada usando 10 mM 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (β -pNPG, Sigma) como sustrato en 0.05 M buffer de acetato de sodio, pH 5. La reacción fue mezclada incubando el sustrato con el extracto enzimático a 50°C por 10 min; la reacción fue detenida por agregar 2 mL de Na_2CO_3 0.2 M a 1 mL de mezcla de reacción como muestra en la Figura 2.7.

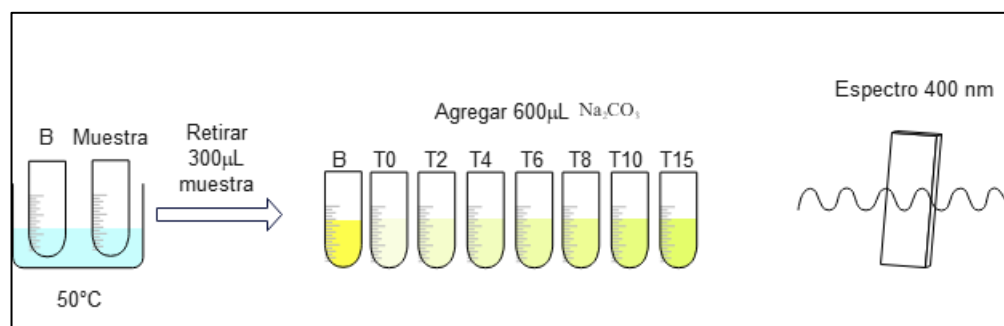


Figura 2.7. Metodología para medir la actividad β-glucosidasa (BGL)

2.5.6 Diseño de tratamientos para hidrólisis enzimática

Una vez evaluadas las tres actividades enzimáticas, se tomó la actividad FPasa como referencia para llevar a cabo los tratamientos experimentales. La actividad enzimática en unidades FPU (Filter Paper Unit) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar azúcares reductores, cuantificados como glucosa. De acuerdo con Infanzón-Rodríguez *et al.* (2022), para la degradación de 1 g de celulosa se requieren 8 FPU, lo que permitió realizar las conversiones correspondientes basadas en la actividad enzimática de *A. niger* ITV02 medida (U/mL). Por otro lado, en el caso del uso de la enzima comercial *Cellic® CTec3*, se emplearon 32 μL, equivalentes a 4 FPU, para asegurar una actividad enzimática adecuada en los ensayos.

2.6 Fermentación para la obtención de bioetanol

2.6.1 Medios de cultivo

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 se conservó en refrigeración a 4° C y se resembró cada cuatro meses, en placas de Petri que contuvieron un medio de agar con la siguiente composición: 20 g/L de agar-agar, 100 g/L glucosa y 10 g/L de extracto de levadura.

2.6.2 Pre cultivo y pre inoculo

Se tomaron tres asadas de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 en cajas Petri, para la preparación del inóculo. Las células se transfirieron a un medio de activación contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de medio de cultivo compuesto por 5 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 1 g/L de extracto de levadura. Los matraces inoculados se incubaron en una incubadora (STIK, modelo PSB2125, México) a 200 rpm y 30 °C durante 8 horas. Tras este período, se realizó un pase de $6 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ a un medio de adaptación en otro matraz Erlenmeyer de 250 mL, que contenía 100 mL de medio compuesto por 5 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de extracto de levadura y una mezcla de glucosa en una proporción de 50% medio sintético y 50% medio hidrolizado. Los frascos inoculados se incubaron bajo las mismas condiciones de agitación (200 rpm) y temperatura (30 °C) durante 8 h.

2.6.3 Medio de Fermentación

Las cinéticas fermentativas se realizaron incorporando $3 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ del medio de adaptación a un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contuvieron 200 ml de medio de cultivo compuesto por 5 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de extracto de levadura y 200 mL de glucosa de medio hidrolizado. Los matraces se colocaron en una incubadora (STIK, modelo PSB2125, México) a 200 rpm, 30 °C durante 72 h. Se retiraron muestras cada 3 h, registrando pH, ° Brix y conteo de células vivas/muertas. Las muestras se analizaron por HPLC para medir glucosa, xilosa y producción de etanol.

2.7 Métodos Analíticos

2.7.1 Análisis de la caracterización y de hidrolizados por HPLC

Se llevó a cabo el análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de cada etapa del proceso de hidrólisis, incluyendo los licores generados tras cada etapa de hidrólisis y muestras líquidas obtenidas después de aplicar la técnica NREL, las cuales fueron congeladas hasta el momento del análisis. Antes de ser analizadas por HPLC, las muestras fueron descongeladas y atemperadas, tratándose con una solución de BaO 0.3 M y ZnSO₄ al 5% p/v, con el propósito de eliminar impurezas como proteínas y almidones, que podrían obstruir los filtros, así como la precolumna y columna del HPLC modelo LC-2050 de Shimadzu Corporation, Japón, con una columna Shodex SH1011 (8x300 mm) y un detector RID-20A (Shimadzu Corporation, Japón) a una temperatura de 50 °C, utilizando una fase móvil de H₂SO₄ 0.05 N y un flujo de alimentación de 0.6 mL/min durante un tiempo total de análisis de 40 min. (Partida, 2017). La relación de los reactivos utilizada fue de 8:1:1, permitiendo un reposo de 10 min tras una agitación vigorosa en tubos Eppendorf, seguido de una centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min.

2.7.2 Análisis de composición lignocelulósica

Para dar comienzo, se pulverizaron las muestras introduciéndolas por un tamiz Tyler de acero inoxidable malla 25, diámetro 20 cm, con una abertura de 0.710 mm. De manera continua, se tomaron 0.3 g en un tubo de ensayo que llevó a cabo un proceso de hidrólisis ácida doble (Sluiter *et al.*, 2008), la primera hidrólisis se efectuó durante 1 h utilizando una solución de 72% H₂SO₄ a 30 °C (baño de agua Thermo Haake C10-B3, Alemania), y la segunda hidrólisis se completó utilizando una autoclave (AESA, CV-250, México) a 121 °C y 1.1 atm durante 1 h. La caracterización de celulosa, hemicelulosa y lignina, por la Técnica NREL se determinó con los siguientes cálculos.

Para determinar el porcentaje de lignina presente en el material lignocelulósico, se emplearon las ecuaciones 2.4 a 2.8.

$$ODW = \frac{\% \text{ total de sólidos} * \text{peso de la muestra}}{100} \quad (2.4)$$

$$\%AIR = \frac{\text{peso del crisol con AIR} - \text{peso del crisol}}{ODW} * 100 \quad (2.5)$$

$$\%AIL = \frac{(\text{Peso crisol con AIR} - \text{peso crisol}) - (\text{Peso crisol con cenizas} - \text{peso crisol})}{ODW} * 100 \quad (2.6)$$

$$\%ASL = \frac{\text{absorbancia} * 0.8673 * \text{dilución} - \text{peso del crisol}}{25 * ODW * \text{longitud de celda}} * 100 \quad (2.7)$$

$$\%Lignina = \%AIL + \%ASL \quad (2.8)$$

Para determinar el porcentaje de celulosa presente en el material lignocelulósico, se emplearon las ecuaciones 2.9 a 2.13.

$$\text{Concentración glucosa} = \text{concentración glucosa HPLC} * \text{dilución} \quad (2.9)$$

$$\text{Masa glucosa} = \frac{\text{concentración glucosa} * 87}{1000} \quad (2.10)$$

$$\text{Masa corregida glucosa} = \text{masa glucosa} * 0.09 \quad (2.11)$$

$$\%Glucanos = \frac{\text{masa corregida glucosa} * 100}{ODW} \quad (2.12)$$

$$\%Celulosa = \frac{\%Glucanos * 100}{90} \quad (2.13)$$

Para determinar el porcentaje de hemicelulosa presente en el material lignocelulósico, se emplearon las ecuaciones 2.14 a 2.18.

$$\% \text{ xilosa} = \text{Concentración xilosa HPLC} * \text{dilución} \quad (2.14)$$

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \frac{\% \text{ xilosa} * 100}{70} \quad (2.15)$$

$$\text{Masa corregida xilosa} = \text{masa xilosa} * 0.88 \quad (2.16)$$

$$\text{Masa xilanos} = \frac{\text{concentración xilosa HPLC} * 87}{1000} \quad (2.17)$$

$$\% \text{ Xilano} = \frac{\text{masa corregida} * 100}{\text{ODW}} \quad (2.18)$$

2.7.3. Viabilidad celular (%V)

El análisis cuantitativo de células es una metodología que se basa en la observación microscópica después de realizar una tinción con azul de metileno, indicando la proporción de células viables en relación con la población total de una muestra previamente diluida, la cual no debe exceder un máximo de 300 células. El porcentaje de viabilidad se calcula mediante la ecuación 2.19.

$$\%V = \frac{X_v}{(X_m - X_v)} (100) \quad (2.19)$$

Donde X_m es el promedio de células muertas y X_v es el promedio de células vivas.

2.7.4 Rendimientos y productividades

Rendimiento Celular ($Y_{x/s}$)

Este rendimiento tiene la función de cuantificar la cantidad de biomasa generada por unidad de sustrato consumido en g/L, lo cual es crucial para determinar la eficiencia del crecimiento microbiano y la adaptación del microorganismo al sustrato lignocelulósico pretratado, y se calcula mediante la ecuación 2.20.

$$Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)} \quad (2.20)$$

Donde X_f es la concentración final de biomasa, X_i es la concentración inicial de biomasa, S_f es la concentración final de sustrato, S_i es la concentración inicial de sustrato.

Rendimiento de producto ($Y_{p/s}$)

Este rendimiento permite medir la cantidad de producto (etanol) producido por unidad de sustrato consumido, proporcionando información clave sobre la conversión de azúcares fermentables en etanol. Este rendimiento se calcula mediante la ecuación 2.21 y se expresa en unidades de g/L.

$$Y_{p/s} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - X_f)} \quad (2.21)$$

Donde P_f es la concentración final del producto, P_i es la concentración inicial del producto.

Productividad Volumétrica (Q)

La productividad se define como la cantidad de producto generado por unidad de tiempo y volumen de cultivo (g/L·h), cuya función es evaluar el desempeño del proceso fermentativo, permitiendo determinar la rapidez y eficiencia con la que los microorganismos convierten los azúcares en etanol. Este parámetro se determina empleando la ecuación 2.22.

$$Q = \frac{P_f}{t_f} \quad (2.22)$$

Donde P_f es la concentración de producto máxima alcanzada en el tiempo t_f (g/L), t_f es el tiempo de fermentación donde se alcanza la máxima concentración de producto (h).

2.8 Balances de Materia

Se realizaron los balances de materia de las etapas de hidrólisis con el fin de analizar las condiciones de trabajo a nivel laboratorio para comparar y ajustar los valores obtenidos a nivel planta piloto.

2.9 Energía eléctrica consumida

Para calcular cuántos litros de bioetanol necesitas para cubrir un consumo energético, se debe tener en cuenta lo siguiente:

Cálculo del volumen requerido

Para determinar el volumen de bioetanol requerido, se empleó la ecuación 2.23, la cual establece que el volumen necesario se obtiene al dividir la energía requerida (kWh) entre el poder calorífico inferior del bioetanol, equivalente a 5.86 kWh/L. Este cálculo permite estimar con precisión la cantidad de biocombustible necesaria para satisfacer la demanda.

$$\text{Litros de bioetanol} = \frac{\text{Energía consumida (kWh)}}{\text{Poder calorífico del bioetanol (5.86 } \frac{\text{kWh}}{\text{L}})} \quad (2.23)$$

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Acondicionamiento de la materia Prima

El lote de caña de azúcar utilizado en este estudio fue recibido y pesado en una báscula, obteniéndose un peso total de 916 kg. Posteriormente, se extrajo el jugo mediante un molino, lográndose obtener un volumen de 295 L de jugo de caña. Este jugo fue destinado a un proyecto paralelo relacionado con la producción de bioetanol de primera generación (1G).

El residuo sólido remanente del proceso, conocido como BCA, fue sometido a un acondicionamiento mencionado en la sección 2.2 para su uso en esta investigación, reportando un peso final de 286.85 kg de BCA, con una caracterización de 40.9% de celulosa, 28.3% de hemicelulosa y 25.4% de lignina. De acuerdo con lo reportado por De la Torre *et al.*, (2021), el BCA representa aproximadamente el 30% del peso total de la caña procesada. Este balance confirma la consistencia de los resultados obtenidos, ya que el peso del bagazo seco corresponde al porcentaje estimado, validando el procedimiento realizado durante el acondicionamiento de la materia prima.

3.2 Evaluación de condiciones Hidrólisis ácida

3.2.1 Balance de materia a Nivel laboratorio

El peso del bagazo final con pretratamiento ácido fue de 122 g y 115 g existiendo una pérdida de biomasa entre el 39-42.5 % durante este pretratamiento (Figura 3.1). También se registraron las pérdidas de fracciones líquidas entre el 26 y 32 %. obtenidas en cada lote reportando el pH. Se registró una composición del BCAC de 65.8% de celulosa, 13.7% de hemicelulosa y 22.6% de lignina de esta etapa el pretratamiento realizó una remoción del 51.59% de hemicelulosa con las condiciones empleadas.

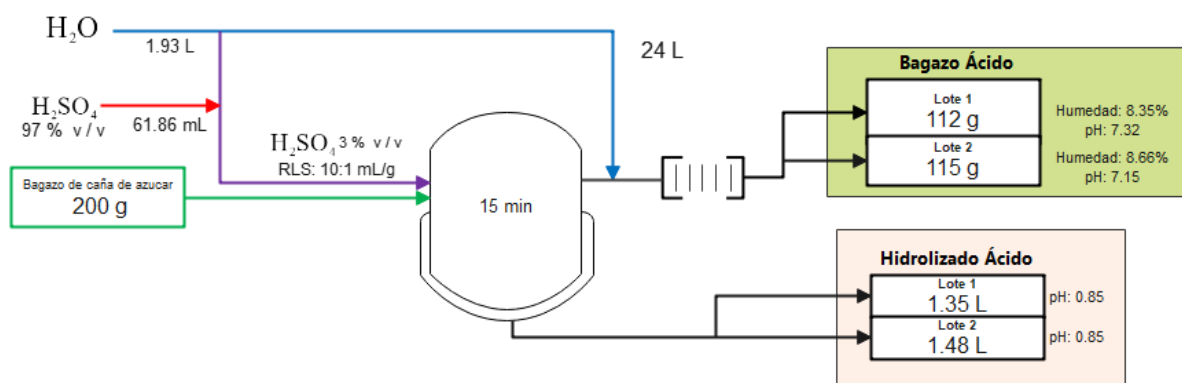


Figura 3.1 Balance de materia de hidrólisis ácida a nivel laboratorio

3.2.2 Balance de materia a Nivel Planta piloto

Se realizó un escalamiento 1:200 en planta, se trataron 4 lotes (40 kg cada uno), cuyas condiciones de operación se mencionan en la Tabla 3.1, las modificaciones se realizaron para poder recuperar el mayor porcentaje de biomasa, realizando el pretratamiento correctamente. Las modificaciones se realizaron debido a que en el Lote 1 se tuvo una pérdida del 76.85 % de bagazo, aproximadamente 90 % superior al del nivel laboratorio. Como se puede apreciar en la Figura 3.2, con la modificación de las condiciones de presión y temperatura, se logró recuperar 5 kg de bagazo en el lote 4, con una pérdida del 65 %.

Tabla 3.1 Resultados de NREL a condiciones de operación modificadas en la etapa de hidrólisis ácida a nivel planta piloto

Lote	Condiciones		Composición del BCAC (%)		
	Temperatura (°C)	Presión (atm)	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
1	120	1.2	68.9	0	24.7
2	120	1.2	66.7	0	24
3	116	1	66.6	2.6	24.2
4	110	0.9	61.3	10	24.3

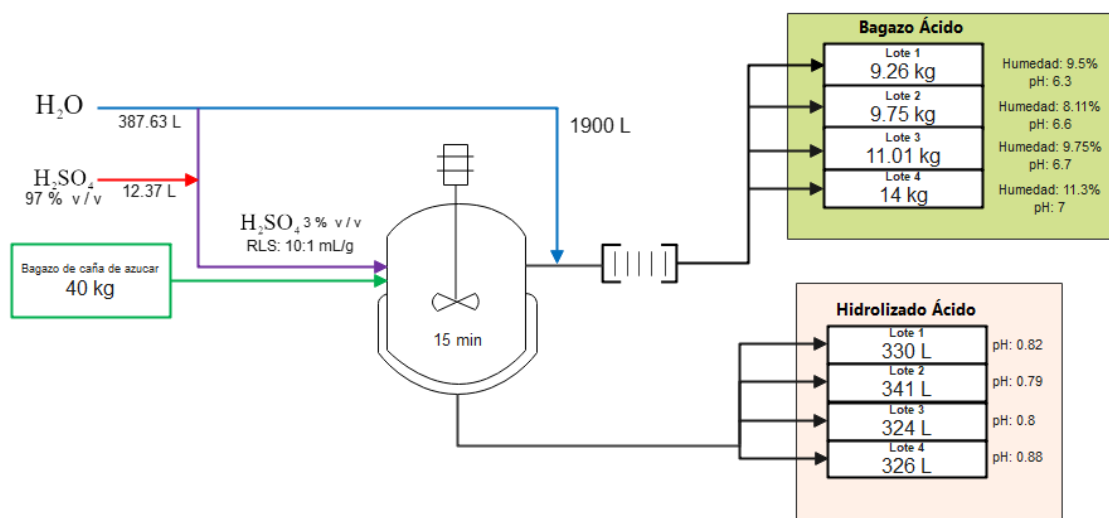


Figura 3.2 Balance de materia de hidrólisis ácida a nivel planta piloto

La caracterización del BCAC indicó que los niveles de celulosa y lignina permanecieron estables, en rangos de 61-69% y 24-25%, respectivamente. En contraste, la hemicelulosa fue eliminada en su totalidad en los primeros dos lotes del pretratamiento (ver Tabla 3.1). las fracciones líquidas obtenidas en cada lote, reportando una reducción del hidrolizado ácido alimentado al inicio con agua y ácido del 14-19%, valores menores que los obtenidos en condiciones de laboratorio. Posteriormente, el hidrolizado fue neutralizado mediante ajuste de pH con NaOH al 40% y caracterizado por HPLC, para identificar los subproductos presentes, indicados en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Caracterización del hidrolizado ácido a nivel laboratorio y planta piloto

Muestra del Hidrolizado ácido	Composición (g/L)				
	Glucosa	Xilosa	Ácido Acético	Furfural	Hidroximetilfurfural (HMF)
Laboratorio	6.24	13.23	2.48	1.054	0
L1 PP	12.05	12.89	2.22	1.056	1.03
L2 PP	13.20	12.90	2.05	0.957	0.95
L3 PP	14.34	14.34	2.21	0.7502	0.53
L4 PP	11.29	10.06	1.87	1.555	0.22

Varilla -Mazaba *et al.*, (2024), reportó a unas condiciones óptimas para la obtención de xilosa, especificando que una RLS de 1:8 g/mL o superior permite obtener concentraciones inferiores a 3 g/L de ácido acético, independientemente de la concentración de ácido y el tiempo de hidrólisis. En esta investigación, los hidrolizados muestran concentraciones aceptables de ácido acético por debajo de 3 g/L. Sin embargo, se observó que el escalamiento del pretratamiento impactó la composición del BCAC, resultando en concentraciones de glucosa superiores a 10 g/L, lo cual indica cierta degradación de celulosa debido a las condiciones aplicadas, siendo ésta, un aspecto desfavorable.

El pretratamiento con ácido sulfúrico rompe la estructura de la biomasa, permitiendo el acceso a las fibras de celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, bajo condiciones severas (altas temperaturas y concentraciones de ácido), los monosacáridos liberados tienden a descomponerse en compuestos inhibidores como furfural y HMF, que interfieren en etapas posteriores, como la fermentación, reduciendo la eficiencia en la producción de biocombustibles. Los niveles aceptables de HMF en el hidrolizado ácido deben ser menores a 0.5-1 g/L (Menegazzo *et al.*, 2018). En el escalamiento, se observó que el BCAC presentaba un color más oscuro y una textura quebradiza, como se muestra en la Figura 3.3, debido al tiempo prolongado en el reactor mientras se esperaba una temperatura de manipulación segura.



Figura 3.3 Coloración del BCA en la etapa de hidrólisis ácida

3.3 Evaluación de condiciones Hidrólisis alcalina

3.3.1 Balance de masa a Nivel Laboratorio

Se registraron los valores de pH después de agregar NaOH al 40 % a las 0 h para incrementar el pH hasta 11.5, este valor se mantuvo constante durante las 36 h de reacción. Como se puede observar en la Figura 3.4 se obtuvo una pérdida de fracción líquida entre el 21-26 % respectivamente, posteriormente el bagazo fue lavado con 36 L de agua para ajustar el pH a 7.8 para cada lote. El peso final del bagazo alcalino pretratado seco (humedad < 10%) presentó una pérdida de 35-37 %. Durante el proceso se formó espuma, ocasionada por que el oxígeno liberado quedó atrapado en el líquido, y la presencia de lignina y otros componentes orgánicos en el bagazo puede estabilizar las burbujas, aumentando aún más el volumen de espuma alcanzando una temperatura máxima de 80°C.

La aplicación de H_2O_2 en combinación con NaOH demostró ser altamente eficaz para oxidar y desintegrar las estructuras lignocelulósicas, alcanzándose una remoción de la lignina residual del 75.9 %, provocando un blanqueamiento del BCAI (Figura 3.6), obteniendo una caracterización en esta etapa de 70.8% de celulosa, 18.5% de hemicelulosa y 6.1% de lignina.

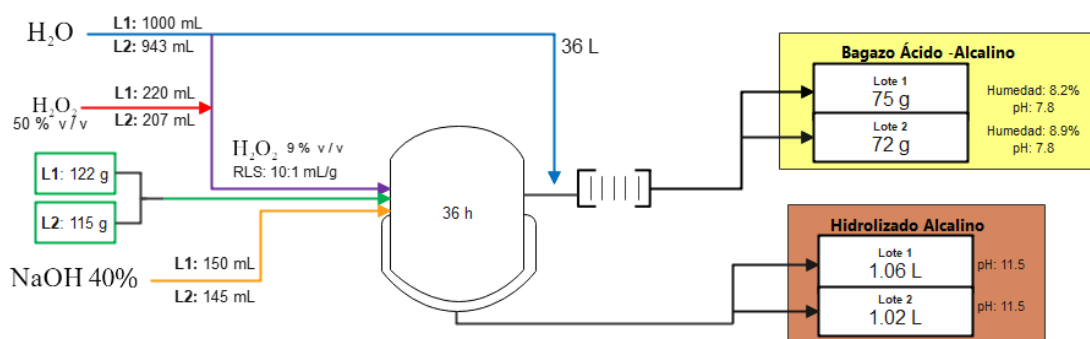


Figura 3.4 Balance de materia de hidrólisis alcalina a nivel laboratorio

3.3.2 Balance de masa a Nivel Planta Piloto

Se realizaron pruebas preliminares para evaluar el comportamiento del bagazo ácido sometido a tratamiento alcalino, utilizando 50 g de bagazo e NaOH al 40 % para ajustar el pH a 11.5. Este procedimiento representó una reducción de un tercio en la cantidad de NaOH comparado con experimentos previos a escala de laboratorio, lo que resultó alarmante debido al incremento de pH en poco tiempo, generando una reacción rápida con un aumento de espuma que alcanzó el 70-80 % del volumen de un contenedor de 3 L y una disminución del pH a 10.5 después de 24 horas.

Para el proceso de escalamiento, se estableció una relación de 1:166, llevando a cabo dos lotes, cada uno conformado por sublotos correspondientes a la etapa de hidrólisis ácida. El Lote 1 incluyó los sublotos 1 y 3, mientras que el Lote 2 abarcó los sublotos 2 y 4. Esta configuración permitió alcanzar el volumen de operación requerido y garantizar una agitación homogénea de las paletas del reactor. Al inicio de la reacción, se registraron valores de pH de 11.5 al adicionar NaOH al 40 % ocupando un tercio del volumen como lo reportado en las pruebas preliminares a nivel laboratorio, sin embargo, a las 36 horas se observó una disminución del pH, registrándose valores de 11 en el Lote 1 y 10.6 en el Lote 2. Como se muestra en la Figura 3.5, se reportó una pérdida de fracción líquida alimentado al inicio con agua, NaOH y H_2O_2 entre el 40 y 46 %. Durante el proceso, la celulosa cambió de blanco a tonos café-amarillo (Figura 3.6) y el hidrolizado mostró una capa aceitosa sobre el bagazo, requiriendo menos agua para ajustes de pH.

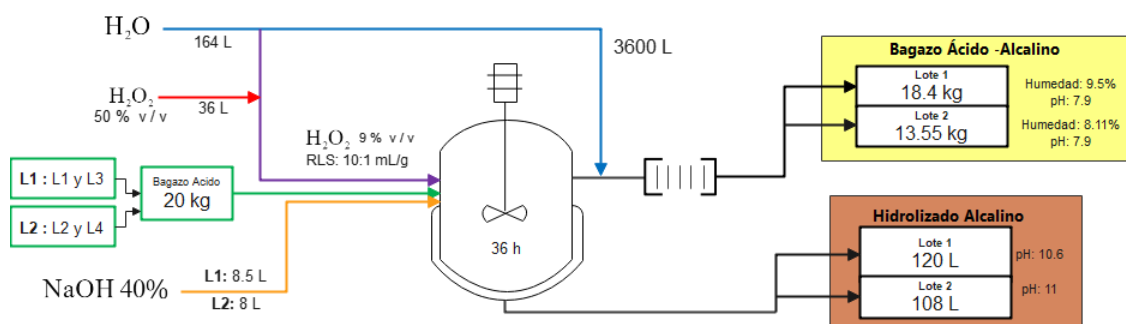


Figura 3.5 Balance de materia de hidrólisis alcalina a nivel planta piloto.

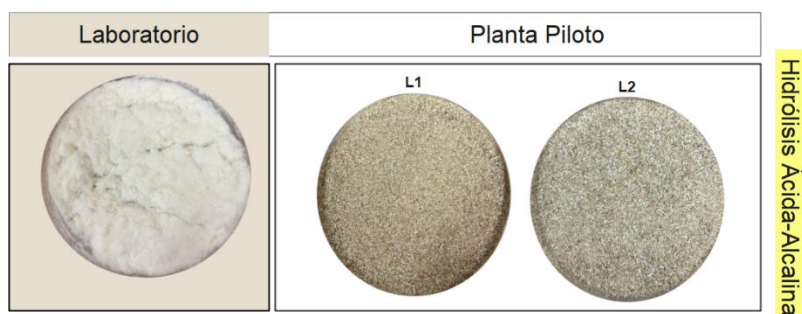


Figura 3.6 Coloración del BCA en la etapa de hidrólisis alcalina

La composición del bagazo alcalino (BCAI) de ambos lotes se presenta en la Tabla 3.3, donde se observa una remoción de lignina del 14 % en ambos casos. Esto se atribuye al limitado suministro de NaOH necesario para alcanzar un pH de 11.5 siendo una tercera parte del volumen esperado. La reacción inicial fue rápida y resultó en un incremento de la temperatura a 82°C, generando una notable formación de espuma. En el Lote 1, el suministro de NaOH se realizó en intervalos más prolongados, provocando un aumento de espuma entre un 40-50 % del volumen del reactor. Por otro lado, en el Lote 2, la frecuencia de suministro de NaOH fue mayor, lo que generó una espuma que alcanzó entre un 70-80 % del volumen total del reactor de 3000 L.

Tabla 3.3 Resultados de NREL a condiciones de operación modificadas en la etapa de hidrólisis ácida-alcalina a nivel planta piloto

Lote	Condiciones	Composición del BCAI (%)		
		Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
1	0.5 L de NaOH cada 10 min con una agitación intermitente de 12h	66.7	0	21.4
2	0.5 L de NaOH cada 5 min con una agitación intermitente de 20h	66.9	0	22.4

Un factor determinante en el balance del proceso fue la agitación. El Lote 1 se sometió a agitación intermitente durante las 36 horas de reacción, lo que resultó en una pérdida del 8 % del bagazo. En contraste, el Lote 2, tras alcanzar el pH de 11.5, se dejó el

reactor con agitación sin interrupción durante 12 horas y luego se agitó de forma intermitente, lo que causó una pérdida más significativa, del 32 %. Por consiguiente, se concluye que la ausencia de una agitación constante contribuye a una mayor degradación del bagazo y no se recomienda en estos procesos.

3.4 Evaluación de actividad enzimática

De acuerdo con Silva *et al.*, (2023), el bagazo deslignificado ofrece una mejor accesibilidad para las enzimas debido a la reducción de la lignina, lo cual facilita la acción de las celulasas sobre la celulosa. El bagazo alcalino sin pretratamiento ácido previo obtenido a nivel laboratorio con las condiciones mencionadas en la sección 2.5.3, fue empleado en la etapa de fermentación enzimática, reportando una caracterización de 48.4% celulosa, 35% hemicelulosa y 17.5% lignina.

En la Tabla 3.4 se presenta una comparación detallada de la actividad de las enzimas celulasas producidas por el hongo *Aspergillus niger* ITV02 después de 168 h de fermentación, bajo las condiciones operativas mencionadas en la sección 2.5.3, utilizando bagazo de caña como fuente de carbono, contra resultados reportados por otros autores. Los datos obtenidos en esta investigación demuestran una mejora en la actividad enzimática en comparación con los reportados por Miranda (2019), lo cual se atribuye al empleo de condiciones óptimas de tiempo cinético, temperatura y velocidad de agitación, así como a la adecuación de la fuente de carbono. Al comparar los resultados con los de Infanzón-Rodríguez *et al.* (2022), se observó un rendimiento menor en las actividades de FPasa y BGL, obteniendo aproximadamente una tercera parte del rendimiento. Esto se debe a la resistencia a la etapa limitante de la reacción (RLS) y a un mayor porcentaje de pureza mayor de H_2O_2 , que permitieron una deslignificación más efectiva del bagazo, dado que las condiciones experimentales de tiempo, velocidad de agitación y temperatura reportadas fueron similares.

Tabla 3.4 Actividad de celulasas sin ultrafiltrar en comparación con otros autores

Condiciones Hidrólisis Alcalina							Actividad (U/mL)			Referencia
RLS (mL/g)	H ₂ O ₂ (%p/p)	t(h)	T(°C)	BCAI (g/L)	pH	rpm	FPasa	CMCasa	BGL	
10:1	6 %	120	30	10	5.5	250	0.09 5	0.013	2.19	Miranda (2019)
12:1	6 %	168	31	20	6	200	0.47	0.5	12.6	Infanzón-Rodríguez <i>et al.</i> , (2022)
10:1	9 %	168	31	20	5.5	200	0.15	0.44	4.88	Esta investigación

La necesidad de concentraciones elevadas de β -glucosidasa (BGL) es importante, dado que esta enzima hidroliza la celobiosa en unidades de glucosa. La ausencia de BGL en un extracto enzimático provoca la acumulación de celobiosa, lo que inhibe a las endo-glucanasas y exo-glucanasas, reduciendo la capacidad de hidrólisis enzimática (Singhania *et al.*, 2013), como resultado, el bagazo de caña se presenta como un mejor sustrato debido a su mayor actividad de BGL, con un rendimiento hasta 40 veces superior comparado con los resultados obtenidos por con Infanzón-Rodríguez *et al.*, (2021) con bagazo de sorgo deslignificado.

La aplicación de la ultrafiltración no solo mejora la pureza de las enzimas, sino que también optimiza la concentración y el intercambio de amortiguadores, debido a su capacidad para separar y concentrar biomoléculas de alto peso molecular sin afectar su actividad (Tavares *et al.*, 2024), por lo tanto, en la presente investigación la actividad reportada después de la ultrafiltración de 10 kDa se mejoraron los rendimientos de Fpasa, CMCasa y BGL como se puede apreciar en la Figura 3.7.

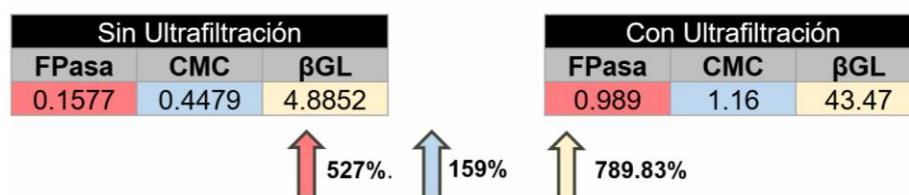


Figura 3.7 Mejora del rendimiento de la actividad enzimática de *Aspergillus niger* ITV02

La concentración del sustrato (celulosa y/o hemicelulosa) es un factor determinante en el rendimiento y la velocidad inicial de la hidrólisis enzimática, ya que concentraciones elevadas pueden provocar inhibición, problemas de mezclado y transferencia de masa, reduciendo la velocidad de la reacción (Sun y Cheng, 2002). El grado de inhibición está relacionado con la proporción enzima-sustrato; por lo tanto, es esencial controlar variables como la concentración y calidad del sustrato, el pretratamiento, la actividad enzimática, la temperatura, el pH y el mezclado durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos.

3.5 Hidrólisis enzimática a Nivel Laboratorio

En función de lo anterior, se diseñaron una serie de tratamientos a nivel laboratorio, (ver Tabla 3.5) empleando 1 g de celulosa en RLS 10:1 mL/g, al cual se añadió el extracto enzimático y Buffer con pH 5 como solución amortiguadora, mismas que fueron recolectadas a intervalos de 24, 48 y 72 horas, para la cuantificación de glucosa.

Tabla 3.5 Condiciones de hidrólisis enzimática empleando *Aspergillus niger* ITV02

	Tratamiento			
	1	2	3	4
Solución amortiguadora (mL)	2	6	6	10
Extracto de <i>Aspergillus niger</i> ITV02 (mL)	8	4	4	0
Cellic CTec3 (μL)	0	32	0	32

Tras cada intervalo, las muestras se retiraron del matraz y se centrifugaron para obtener el sobrenadante, en el cual se cuantificó la glucosa (g/L) mediante HPLC. Los tratamientos se compararon con el rendimiento de la enzima comercial *Cellic® CTec3*, empleando la misma cantidad de unidades FPU, un estándar para medir la actividad enzimática en la degradación de celulosa. Esto permitió evaluar y comparar los rendimientos de *Cellic® CTec3* pura y en combinación con el extracto enzimático de hongos autóctonos, analizando su efectividad en la conversión de celulosa bajo condiciones experimentales.

La Figura 3.8 muestra que los tratamientos 2 y 4 lograron el mayor rendimiento a las 72 horas, alcanzando un promedio de 60.5 g/L de glucosa. El análisis de regresión lineal indica que el Tratamiento 4 presenta el mejor ajuste del modelo, con un R^2 cercano a 1, lo que asegura un ajuste adecuado para predecir datos futuros. Este hallazgo sugiere que la producción de glucosa podría continuar incrementándose más allá de las 72 horas. En contraste, el Tratamiento 2 exhibió el ajuste más bajo, con un R^2 de 0.9084, inferior al de los otros tratamientos, lo que limita la capacidad del modelo para anticipar un aumento significativo en la producción de glucosa.

Es relevante destacar que la combinación de la enzima comercial *Cellic® CTec3* con *Aspergillus niger* ITV02 (Tratamiento 2) demostró una productividad notable en la conversión de glucosa durante las primeras 24 horas, generando 55.66 g/L de glucosa (ver Tabla 3.6). Estos resultados subrayan un gran potencial para optimizar la etapa de hidrólisis enzimática en la producción de biocombustibles generación 2G.

Tabla 3.6 Productividad de la obtención de glucosa en diferentes pretratamientos

Tratamiento	Glucosa (g/L) 24h	Productividad (g/Lh)
1	38.62 ± 0.211	1.60
2	55.66 ± 2.04	2.31
3	28.32 ± 1.34	1.18
4	43.40 ± 3.18	1.80

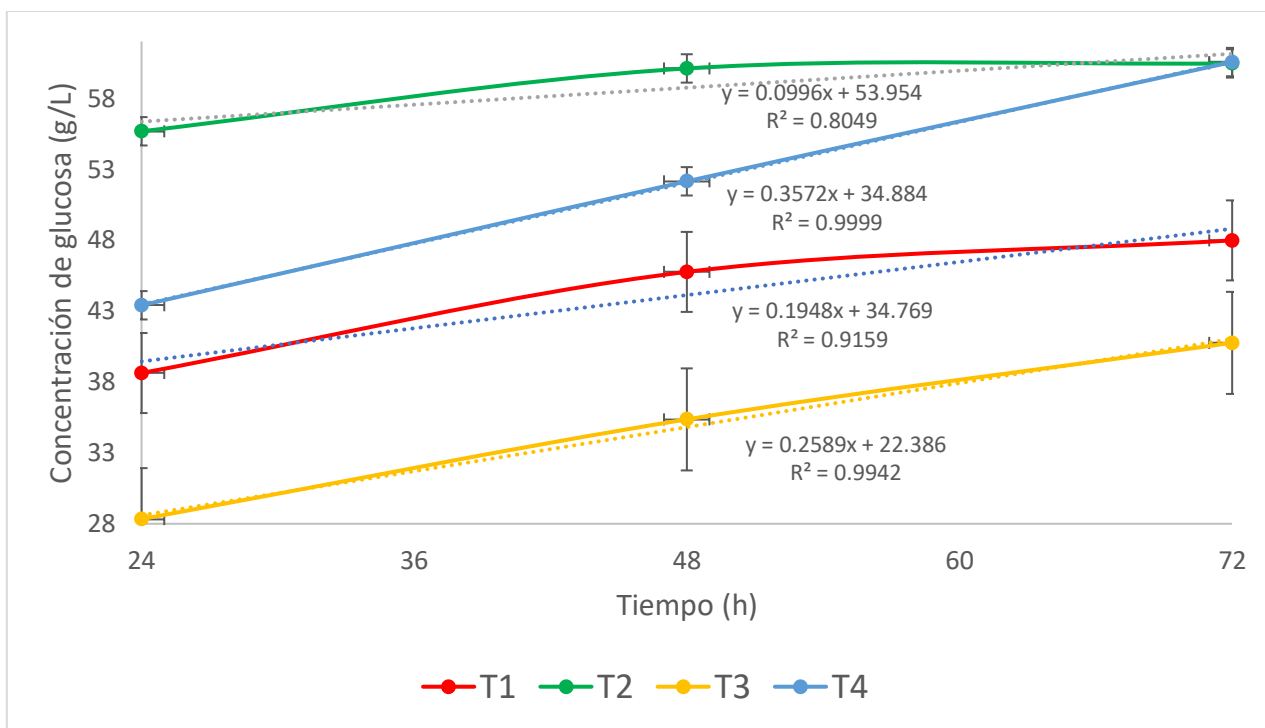


Figura 3.8 Cinética de hidrólisis enzimática utilizando *Aspergillus niger* ITV02 ultrafiltrado

Los resultados de esta investigación, utilizando un pretratamiento ácido-alcalino y la combinación de *Cellic® CTec3* con extracto enzimático de *Aspergillus niger* ITV02, demostraron un rendimiento competitivo frente a estudios similares (Tabla 3.7). El uso conjunto de enzimas autóctonas y comerciales se destacó como una estrategia eficiente para maximizar la conversión de sustratos lignocelulósicos en azúcares fermentables en menor tiempo. Mientras que Nochebuena-Morando *et al.*, (2014) y Castañón-Rodríguez *et al.*, (2015) lograron 50 g/L de glucosa en 72 horas, comparando ese dato con esta investigación, se alcanzó rendimientos similares en solo 24 horas, reduciendo así los costos operativos y mejorando la eficiencia general del proceso de etanol 2G.

Tabla 3.7 Producción de azúcares fermentables a partir de hidrólisis enzimática de BCA

Pretratamiento	Condiciones de hidrólisis	Glucosa (g/L)	Referencia
Ácido-Alcalino	Celulasas 4.1 FPU/g sólido, β -glucosidasa 18.2 CBU/g sólido y Tween 80 0.95 % (p/v)	50.1	Nochebuena-Morando <i>et al.</i> , (2014)
Ácido	750 μ L <i>Novozyme 188</i> and 0.5 mL <i>Celluclast 1.5</i> , 72 h, RLS 7.7:1	50	Castañón-Rodríguez <i>et al.</i> , (2015)
Ácido-Alcalino	<i>Cellic CTec3</i> 5% (p/p), RLS 5:1, 42h	167.92	Moran-Aguilar, 2018
Ácida-DES (ChCl-Gli) cloruro de colina y glicerol)	<i>Cellic CTec3</i> 5% p/p, RLS 6:1, 42 h	84.2	Varilla-Mazaba, (2024)
Ácido-Alcalino	32 μ L <i>Cellic CTec3</i> , 6 mL extracto <i>A.niger ITV02</i> , RLS 10:1, 24h	55.66	Esta investigación

Comparando con los resultados obtenidos por Moran-Aguilar (2018) y Varilla-Mazaba (2024, se observó que esta investigación logró una conversión eficiente a menores relaciones sólido-líquido (RLS). Esto se atribuye a las condiciones de pretratamiento aplicadas para la obtención de celulosa, lo que resalta la importancia de optimizar estos parámetros. Se sugiere, por tanto, evaluar las condiciones empleadas en este estudio a relaciones sólido-líquido más bajas, con el fin de maximizar la eficiencia del proceso en futuros trabajos.

3.6 Hidrólisis enzimática a nivel planta piloto

Para la producción de enzimas, se prepararon 30 L de medio de adaptación en un reactor de preinóculo de 80 L, al cual se inocularon 1.9 L de *A. niger ITV02* junto con Tween 80, manteniendo una agitación entre 75 y 95 rpm durante un periodo de 24 horas. Durante la carga inicial, se observó que el volumen del medio no cubría el nivel de agitación, por lo que se adicionaron 10 L adicionales de agua para asegurar un nivel adecuado de mezcla. Se registró una parada imprevista de la agitación durante la noche, aunque el momento preciso de la interrupción no pudo determinarse.

Posteriormente, el medio de adaptación (40 L) fue transferido al reactor de fermentación, donde se adicionaron 250 L de agua y se ajustaron los reactivos para operar con un volumen total de 300 L. Durante el proceso de fermentación, se observó un incremento del pH del extracto fermentado, pasando de 5.3 a 6.9 a las 96 horas, junto con la presencia de un olor desagradable en reactor. A pesar de ello, se continuó con el monitoreo cinético y la actividad enzimática fue evaluada mediante la metodología de Miller (1959), obteniéndose valores bajos de actividad enzimática, lo que llevó a la descalificación del lote.

De forma paralela, se llevó a cabo una prueba de hidrólisis enzimática a nivel de laboratorio empleando bagazo de caña pretratado a nivel de planta piloto. En un segundo intento de producción enzimática con bagazo alcalino pretratado, se detectó una contaminación en el extracto, evidenciada por un cambio de color de amarillo-naranja a café oscuro. Ante esta situación, se decidió utilizar la enzima comercial Cellic® CTec3 para la hidrólisis enzimática de 1 g de celulosa con 10 mL de buffer pH 5, evaluando la conversión de glucosa a las 72 horas con dos dosis: 32 μ L (4 FPU) y 64 μ L (8 FPU).

Los resultados obtenidos, se presentan en la Tabla 3.8, indicaron que el alto contenido de lignina en el bagazo con pretratamiento ácido-alcalino a nivel PP., limitó la conversión de glucosa en ambos ensayos. Con base en estos hallazgos, se recomienda optimizar el proceso de pretratamiento durante la etapa de escalado, enfocándose en la hidrólisis ácido-alcalina para mejorar la remoción de lignina y, por ende, la eficiencia de conversión de glucosa en futuros estudios.

Tabla 3.8 Hidrólisis enzimática a nivel laboratorio con bagazo pretratado a nivel planta piloto empleando *Cellic CTec3*

	Lote1 H. Ácida-Alcalina PP.	Lote2 H. Ácida-Alcalina PP.	Lote1 H. Alcalina PP.
Solución amortiguadora (mL)	10	10	10
Cellic CTec3 (μL)	64	64	32
Glucosa (g/L) a 72 h	37.67	38.85	60.68
% Lignina	22.1	21.4	11.9

3.7 Fermentación empleando *Saccharomyce Cerevisiae* ITV01

Para la producción del extracto enzimático, se llevó a cabo un nuevo lote de bagazo alcalino tratado con *Aspergillus niger* ITV02 con el fin de obtener glucosa. Sin embargo, se presentaron problemas de contaminación que condujeron a bajos rendimientos, a pesar de que el extracto fue sometido a un proceso de ultrafiltración con membranas de 10 kDa. Ante esta situación, se decidió utilizar la enzima comercial *Cellic® CTec3*. Se observó en esta investigación que, tras 72 horas de reacción, los resultados con *Cellic® CTec3* en la etapa de hidrólisis enzimática con el BCAI pretratado los valores de glucosa obtenidos fueron comparables a los del tratamiento 2 (ver Figura 3.8). Para la hidrólisis, se prepararon dos lotes de 25 g de celulosa cada uno, a los cuales se añadieron 0.8 mL de *Cellic® CTec3* y 250 mL de buffer con pH 5. La caracterización por HPLC reveló una concentración promedio de 65.87 g/L de glucosa.

Posteriormente, se llevó a cabo la preparación del medio de activación para favorecer el crecimiento exponencial de la levadura. Se utilizó un medio de adaptación compuesto por una mezcla de medio sintético e hidrolizado para acondicionar gradualmente la levadura a la glucosa generada. Finalmente, se procedió a la etapa de fermentación utilizando el medio hidrolizado, registrando periódicamente los valores de pH, °Brix y el conteo celular (vivo y muerto) cada 3 horas (ver Tabla 3.9.)

Tabla 3.9 Cinética de Fermentación con *Saccharomyce Cerevisiae* ITV01 para la producción de etanol 2G nivel laboratorio

Tiempo (h)	pH	°Brix	Conteo Celular (cel/mL)	Viabilidad (%)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Etanol (g/L)	Peso Seco (cel/mL)	Azúcares totales (g/L)	Productividad (g/L*h)
0	5.25	9	5.05 E+06	100	67.69	17.21	1.52	2.53E+6	84.91	X
3	5.25	9	1.44E+07	99.65	65.61	16.84	1.69	7.18E+06	82.45	0.56
6	5.21	8	5.73E+07	99.78	57.11	16.53	4.57	2.86E+07	73.65	0.76
9	5.04	7	8.70E+07	99.65	35.94	15.78	14.98	4.35E+07	51.73	1.66
12	4.97	5.5	1.01E+08	99.38	15.50	15.28	23.38	5.06E+07	30.78	1.94
15	4.95	5.1	1.10E+08	99.09	1.347	13.21	29.63	5.50E+07	14.56	1.97
18	4.94	4.9	9.89E+07	97.89	1.27	12.90	29.07	4.94E+07	14.17	1.61
21	4.9	4.8	8.14E+07	97.41	1.24	12.70	28.98	4.07E+07	13.94	1.38
24	4.89	4.8	6.75E+07	96.77	1.20	12.64	28.61	3.38E+07	13.84	1.19
48	4.77	4.5	1.61E+07	96.69	0.80	9.93	22.21	8.50E+07	10.74	0.46
72	4.7	4.5	8.65E+07	93.01	0.72	9.85	20.67	4.33E+07	10.58	0.28

El análisis cinético del proceso de fermentación, evaluado durante 72 horas, indicó que el máximo rendimiento de producción de etanol se alcanzó a las 15 horas, con una concentración de 29.63 g/L, marcando la fase exponencial de la fermentación (ver Figura 3.9). Simultáneamente, se observó una disminución en las concentraciones de xilosa y glucosa, registrándose valores de 13.21 y 1.34 g/L, respectivamente. Tras esta etapa, las concentraciones de azúcares y la producción de etanol se mantuvieron en una fase estacionaria hasta las 38 horas, seguida por la muerte celular de la levadura.

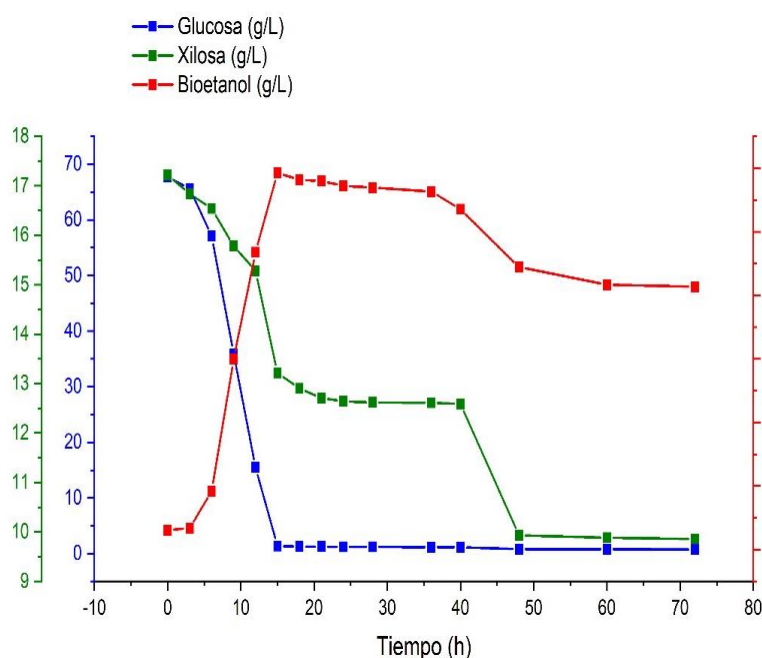


Figura 3.9 Consumo de azúcares de *S. cerevisiae* ITV01, producción de bioetanol 2G y cinética de la biomasa a nivel laboratorio

A partir de estos datos, se calculó el rendimiento de conversión ($Y_{p/s} = 0.424$ g/g), la eficiencia del proceso (68.3%) y la productividad volumétrica ($Q = 1.97$ g/Lh), empleando las ecuaciones descritas en la sección 2.7.3. Estos valores permitieron una comparación objetiva con los resultados reportados por otros estudios que utilizaron distintos tipos de residuos lignocelulósicos para la producción de etanol 2G (ver Tabla 3.10).

Tabla 3.10 Producción de etanol 2G a partir de residuos lignocelulósicos.

Residuo lignocelulósico	Pretratamiento	Glucosa (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimiento (g/g)	Referencia
Bagazo de caña de azúcar	Acido- Alcalino	50	23.67	0.47	Castañón-Rodríguez <i>et al.</i> , (2015)
Bagazo de sorgo dulce	Acido- Alcalino	112.3	38.44	0.31	Partida, (2017)
Cascara de cereza de café	Ácido-Alcalino	115.59	48.19	0.41	Morales-Martínez <i>et al.</i> , (2021)
Bagazo de Agave tequilana Weber var. Azul	Ácido-Alcalino	94.76	47.30	0.47	Delfín-Ruiz <i>et al.</i> , (2020)
Bagazo de caña	Acido-Alcalino	65.87	29.63	0.42	Esta investigación

El análisis de los datos experimentales indica que el rendimiento de la fermentación se encuentra dentro del rango reportado por otros estudios. La variabilidad en los resultados en la obtención de glucosa se basa a diferentes tipos de biomasa empleados ya que las condiciones de los pretratamientos fueron diferentes para cada uno. Por ejemplo, Morales-Martínez *et al.* (2021) documentaron mayor producción de glucosa y conversión a etanol al usar cáscara de cereza de café como sustrato,

Al comparar los resultados de este trabajo con los obtenidos por Castañón-Rodríguez *et al.* (2015) utilizando el mismo tipo de residuo lignocelulósico, se concluye que las condiciones adecuadas de pretratamiento aplicadas en este estudio favorecieron una mayor conversión de glucosa, resultando en una producción 22 % superior de etanol 2G. Al optimizar las condiciones de hidrólisis y fermentación, incluyendo un pretratamiento eficiente y el uso de enzimas adaptadas, se incrementaría el rendimiento de glucosa para una mejor productividad en la conversión de etanol. Este enfoque no solo optimiza la gestión de los residuos agrícolas e industriales, sino que también contribuye a un modelo de economía circular mediante la valorización de subproductos que, de otro modo, serían descartados en procesos industriales.

3.8 Consumo eléctrico

En el proceso de producción de bioetanol de segunda generación (2G), es fundamental cuantificar el consumo energético de cada uno de los equipos involucrados, ya que este factor incide directamente en la sostenibilidad y eficiencia del proceso. En la Tabla 3.11 se presenta el desglose de la energía consumida (Kw/h) por cada equipo utilizado.

Considerando que el poder calorífico inferior (PCI) del bioetanol es de 5.86 kWh/L, se determinó que se necesitan aproximadamente 68.37 L de bioetanol para satisfacer una demanda energética de 400.56 kW/h. Este dato permite evaluar la viabilidad del proceso en términos de autosuficiencia energética y su potencial impacto económico.

Tabla 3.11 Consumo eléctrico durante el proceso de bioetanol 2G a nivel P.P.

Equipo	Energía dato de placa (kW/h)	Horas de uso (h)	Consumo teórico (kwh)
Molino marca TILCA	11.9	7	78.33
Ensiladora Avante Agrícola modelo PG-5000.	5.59	10	55.95
Tanque de hidrólisis ácida	3.73	4	14.92
Tanque de hidrólisis alcalina	3.73	32	119.36
Prensa	3.73	65.87	26.11
Tanque de preinoculo	1.07	24	25.70
Fermentador semilla	0.37	216	79.92

CONCLUSIONES

En los ensayos realizados a nivel de laboratorio, se logró una remoción eficiente del 51.59 % de hemicelulosa y 75.9 % de lignina, lo cual fue fundamental para asegurar una mayor disponibilidad de la celulosa en los procesos de hidrólisis. Utilizando las condiciones de operación propuestas en esta investigación para la producción enzimática, se concluyó que el empleo de bagazo pretratado, combinado con un proceso de ultrafiltración, incrementó la actividad de las enzimas autóctonas de *Aspergillus niger* ITV02. Al integrar estas enzimas con la formulación comercial de Cellic® CTec3, se alcanzaron resultados destacados, bajo una productividad de 2.31 g/L·h, y una producción de glucosa de 55.66 g/L, cabe mencionar que dichos resultados fueron obtenidos en tan solo 24 horas del proceso de hidrólisis enzimática.

Los ensayos obtenidos en la etapa de fermentación demostraron que el rendimiento con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITV01, bajo condiciones óptimas, alcanzó una concentración máxima de etanol en un tiempo relativamente corto, evidenciando la capacidad de la levadura para adaptarse y fermentar los sustratos disponibles. Los rendimientos obtenidos, con una eficiencia del 68.3% y una productividad de 1.97 g/L·h, indican que el proceso de fermentación fue altamente efectivo, lo que sugiere que la combinación de pretratamientos adecuados y la utilización de enzimas autóctonas optimizaron la disponibilidad de azúcares. Estos hallazgos subrayan la importancia de continuar investigando y ajustando las condiciones de pretratamiento y fermentación para maximizar la producción de bioetanol 2G, contribuyendo así a un uso más sostenible de los residuos lignocelulósicos y al desarrollo de energías alternativas en México.

Durante el escalamiento a nivel planta piloto se presentaron desafíos significativos. Se registró una pérdida promedio de materia del 76 % en el BCAC pretratado, lo cual impactó la disponibilidad de sustrato para la etapa de hidrólisis. Además, la remoción

casi total de hemicelulosa en los lotes procesados resultó en un cambio de color más oscuro y una textura terrosa del material, indicando una degradación más severa.

La etapa de hidrólisis alcalina, se vio afectada por las condiciones adversas de la Hidrólisis Ácida en la que se observó una reacción más violenta del bagazo, con un incremento del volumen de espuma que superó el 60% del volumen del contenedor. Esto dio paso a que se debieran utilizar menores cantidades de NaOH para la deslignificación, obteniendo una remoción de lignina de apenas el 14 %. Las pruebas preliminares de los lotes de la etapa ácida-alcalina a nivel PP., realizadas con 64 μ L de *Cellic® CTec3* (8 FPU) resultaron en un bajo rendimiento de glucosa, con un promedio de 38 g/L. Tomando en cuenta esto, es que se tomó la decisión de no continuar con el escalamiento de la etapa enzimática debido a la baja remoción de lignina y los bajos rendimientos de la enzima elaborada a nivel PP. debido a su contaminación.

Las condiciones de operación en los pretratamientos para la obtención de celulosa son un factor determinante en la eficiencia global del proceso de producción de bioetanol de segunda generación (2G). Una remoción insuficiente de hemicelulosa y lignina puede comprometer la accesibilidad de la celulosa, afectando así la eficacia de las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación.

Estos hallazgos resaltan la importancia de optimizar la etapa de pretratamiento ácido para maximizar el rendimiento del bagazo pretratado (BCAc). Reducciones en el porcentaje de H_2SO_4 y ajustes en la relación sólido-líquido (RLS) podrían mejorar la etapa de deslignificación, facilitando una interacción más eficiente con el NaOH. La implementación de estas mejoras es crucial para futuras investigaciones enfocadas en el escalado del proceso, garantizando así una producción de bioetanol 2G más eficiente y sostenible a nivel PP.

RECOMENDACIONES

Para optimizar el proceso de escalado a nivel planta piloto en la producción de bioetanol 2G a partir de bagazo de caña, se sugiere trabajar con menos del 50% del volumen total del reactor durante la etapa de hidrólisis ácida y menos del 30% en la etapa alcalina, evitando así problemas de desbordamiento causados por el exceso de espuma y mejorando la seguridad y eficiencia operativa.

Es fundamental realizar un mantenimiento preventivo y general de los equipos de la planta que se encuentran ubicados en el Anexo 1, incluyendo motores, válvulas, calentadores, bombas hidráulicas, mallas para prensado y básculas. Este mantenimiento es crucial, ya que el proceso de descarga, lavado y prensado del bagazo pretratado (BCAC y BCI) requiere un equipo mínimo de 5 a 6 personas para llevarse a cabo de forma eficiente.

Se recomienda aumentar el tamaño de partícula del bagazo y reducir la relación sólido-líquido (RLS) a 9:1 L/kg, así como disminuir el porcentaje de H_2SO_4 en aproximadamente un 2%, para evitar una pérdida significativa de biomasa al final del proceso. Para la etapa de hidrólisis ácida, es aconsejable implementar un sistema de refrigeración que permita reducir la temperatura del reactor de manera más rápida, facilitando la manipulación y el lavado seguro del bagazo tratado. También es importante contar con un sistema de calefacción para mantener el tanque de fermentación a 30 °C y el tanque para la etapa de hidrólisis enzimática a 50 °C.

En la preparación de soluciones de H_2SO_4 , H_2O_2 y NaOH, es esencial utilizar contenedores adecuados y rotulados, además es necesario acondicionar el cuarto de reactivos peligrosos para evitar contaminaciones. Los contenedores de acuerdo a la norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998 establecida por la Secretaría del Trabajo y Previsión Social (STPS) no deben almacenarse directamente en el suelo por lo que deben ubicarse en estanterías o plataformas elevadas, lo que reduce el riesgo

de accidentes y facilita un acceso seguro con el propósito de prevenirlo a la exposición a polvo, suciedad o residuos que podrían comprometer la integridad del material.

Implementar estas recomendaciones es esencial para garantizar la seguridad del personal y proteger el entorno de trabajo, promoviendo un manejo adecuado de los reactivos químicos y el equipo en la planta de bioetanol 2G. Estas medidas también contribuyen a un proceso más eficiente y controlado durante las etapas de hidrólisis, beneficiando futuras investigaciones y desarrollos en el campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abraham, A., Mathew, A.K., Park, H., Choi, O., Sindhu, R., Parameswaran, B., Pandey, A., Park, J.H., Sang, B.-I. 2020. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **301**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122725>
2. Acharya, B. Citado por Lu, H., Gong, Y., Areeprasert, C., Ding, L., Guo, Q., Yu, G. 2021. Integration of Biomass Torrefaction and Gasification based on Biomass Classification: A Review. *Energy Technol.* **9**(5): 2001108 . <https://doi.org/10.1002/ente.202001108>
3. Aftab, M. N., Iqbal, I., Riaz, F., Karadag, A., Tabatabaei, M. 2019. Different Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass for Use in Biofuel Production.. *Biomass for Bioenergy: Recent Trends and Future Challenges*. IntechOpen 15-31. DOI:[10.5772/intechopen.84995](https://doi.org/10.5772/intechopen.84995)
4. Ahmad, A., Banat, F., Taher, H. 2020. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges. *Environmental Technology and Innovation*, **20**: 101138. ISSN: 2352-1864 <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101138>
5. Alaswad, A., Dassisti, M., Prescott, T., Olabi, A.G. 2015. Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **51**: 1446-1460. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.058>
6. Al-Mardeai, S., Elnajjar, E., Hashaikh, R., Kruczek, B., Van der Bruggen, B., & Al-Zuhair, S. 2022. Membrane bioreactors: A promising approach to enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose. *Catalysts*, **12**(10), 1121. <https://doi.org/10.3390/catal12101121>
7. Amin, L., Hashim, H., Mahadi, Z. y Ismail, K. I. 2017. Determinants of stakeholders' attitudes towards biodiesel. *Biotechnol Biofuels* **10**, 219. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0908-8>
8. Asemoloye, M. D., Bello, T. S., Oladoye, P. O., Gbadamosi, M. R., Babarinde, S. O., Adebami, G. E., Olowe, O. M., Temporiti, M. E. E., Wanek, W., Marchisio, M.

- A. 2023. Engineered yeasts and lignocellulosic biomaterials: shaping a new dimension for biorefinery and global bioeconomy. *Bioengineered*, **14**(1), 2269328. <https://doi.org/10.1080/21655979.2023.2269328>
9. Association, R.F.A. 2021. Annual Ethanol Production U.S. and World Ethanol Production.; Available from: <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>. (Consultado 27 febrero 2022).
10. Bajpai, P. 2016. Structure of Lignocellulosic Biomass. In: Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production. SpringerBriefs in Molecular Science. ISBN: **9789811006869** :7-12. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6_2
11. Becerra, A.P., Buitrago, A.L., Pinto, P. 2016. Sostenibilidad del aprovechamiento del bagazo de caña de azúcar en el Valle del Cauca, Colombia. *Ingeniería Solidaria*. **12**(20): 133-149. <http://dx.doi.org/10.16925/in.v12i20.1548>
12. Bermejo, P., Raghavendran, V., Gombert, A. 2020. Neither 1G nor 2G fuel ethanol: setting the ground for a sugarcane-based biorefinery using an iSUCCELL yeast platform. *FEMS Yeast Research*. **20**(4): 27. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa027>
13. Brémond, U., de Buyer, R., Steyer, J.-P., Bernet, N., Carrere, H. 2018. Biological pretreatments of biomass for improving biogas production: An overview from lab scale to full-scale. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 583-604. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.103>
14. Brigham, C. 2018. Biopolymers: Biodegradable Alternatives to Traditional Plastics. *Green Chemistry*, Elsevier. ISBN **9780128092705**, **3**(22):753-770. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00027-3>
15. Camesasca, L. 2013. Producción de bioetanol combustible a partir de Pasto Elefante: estudio de la hidrólisis enzimática y fermentación. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
16. Castañón-Rodríguez, JF, Welte-Chanes, J., Palacios, AJ, Torrestiana-Sanchez, B., Ramírez de León, JA, Velázquez, G., Aguilar-Uscanga, MG 2015. Influencia

- del procesamiento a alta presión y tratamiento alcalino en la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar. *CyTA - Revista de alimentación*, 13 (4), 613–620. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1029523>
17. Champagne, P. 2008. *Biomasa. Energía del futuro*. Elsevier. Capítulo 9. 151-170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-054808-1.00009-0>
18. Chávez-Sifontes, M. 2019. La biomasa: fuente alternativa de combustibles y compuestos químicos. *An. Quím.* **115**(5): 399-407. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7285186> (consultado septiembre, 2023)
19. Chen, W.H. Citado por Lu, H., Gong, Y., Areeprasert, C., Ding, L., Guo, Q., Yu, G. 2021. Integration of Biomass Torrefaction and Gasification based on Biomass Classification: A Review. *Energy Technol.* **9**(5): 2001108. <https://doi.org/10.1002/ente.202001108>
20. de Armas, A.C., Morales, M., Albornas, Y., González, E. 2019. Proyección de una industria azucarera para transformarse en una biorrefinería a partir de biocombustibles de segunda y tercera generación. *Tecnología Química*. **39**(3): 489-507. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852019000300489
21. Delfín-Ruiz, M. E., Calderón-Santoyo, M., Ragazzo-Sánchez, J. A., Gómez-Rodríguez J., López-Zamora, L., Aguilar-Uscanga, M.G. 2020. Optimización del pretratamiento ácido para la producción de xilosa a partir de Agave tequilana Weber var. azul, Agave americana var. oaxacensis, Agave karwinskii y bagazos de Agave potatorum utilizando un diseño Box-Behnken. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10(6), 949–958. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00497-z>
22. De la torre, L., Tavera, M., Mena, X. 2021. Desarrollo Sustentable y Aprovechamiento del Residuo de la Caña de Azúcar. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, 7(1), 12-26. <https://www.remai.ipn.mx/index.php/REMAI/article/view/79/75>

-
23. Delshad, A.B., Raymond, L., Sawicki, V., Wegener, D.T. 2010. Public attitudes toward political and technological options for biofuels. Elsevier, **38**(7), 3414-3425, Julio. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.02.015>
24. Devi, A., Bajar, S., Sihag, P., Sheikh, Z. U., Singh, A., Kaur, J., Bishnoi, N. R., Pant, D. 2023. A panoramic view of technological landscape for bioethanol production from various generations of feedstocks, Bioengineered, **14**(1): 81-112. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2095702>
25. Dhevagi, P., Ramya, A., Priyatharshini, S., Thanuja, G., Sakthivel, A., Nivetha, A. 2021. Industrially Important Fungal Enzymes: Productions and Applications. Recent Trends in Mycological Research. Fungal Biology. Springer. ISBN: **9783030682590**. 263-309. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68260-6_11
26. Diaz, Y., Villaseñor, C.A., Pérez, A., Mancera, A., Venegas, M.R. y Ramírez, A. 2022. Elaboración y caracterización físico – mecánica de biocompuestos a base de harina de arroz y fibra de bagazo de caña. Biotecnia, **24**(1), 23–29. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i1.1468>
27. Do Espírito Santo, M. C., Cardoso, E. B., Guimaraes, F. E. G., De Azevedo, E. R., da Cunha, M. C., Novotny, E. H., Pellegrini, V. D. O. A., Chandel, A., Silveira, M. H. L., Polikarpov, I. 2019. Multifaceted characterization of sugarcane bagasse under different steam explosion severity conditions leading to distinct enzymatic hydrolysis yields. Industrial Crops and Products. **139**:111542. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111542>
28. Ejaz, U., Sohail, M., Ghanemi, A. 2021. Celulasas: de la bioactividad a una variedad de aplicaciones industriales. Biomimética, **6**(3), 44. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
29. Espinosa, A., López, L., Casdelo, N. 2021. Pretratamiento de biomasas lignocelulósicas: Breve revisión de los principales métodos utilizados. Centro Azúcar, **48**(3), 108-119. ISSN 0253-5777. Recuperado en 15 de febrero de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612021000300108&lng=es&tlng=es.

-
30. Esquivel-Hernández, D. A., García-Pérez, J. S., López-Pacheco, I. Y., Iqbal, H. M. N., Parra-Saldívar, R. 2022. Resource recovery of lignocellulosic biomass waste into lactic acid - Trends to sustain cleaner production. *Journal of Environmental Management*, **301**, 113925. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113925>
31. Ghose T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 59(2), 257– 268. Biochemical Engineering Research Centre. Indian Institute of Technology, New Delhi-110016, India. Printed in Great Britain.
32. Gutiérrez V., Aixa R., Céspedes G., De Armas M., Albernas, A., Villanueva, Y. y Ramos, G. 2020. Valorización de la Lignina en el concepto de Biorrefinería. *Centro Azúcar*. **47**(3): 95-105. Recuperado en 02 de octubre de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612020000300095&lng=es&tlng=es
33. Hammond G.P., McCann N. 2023. Bioethanol processing from wheat straw: investment appraisal of a full-scale UK biofuel refinery. *Biofuels*. **14**(3): 267-277. <https://doi.org/10.1080/17597269.2022.2132722>
34. Haokok, C., Lunprom, S., Reungsang, A., Salakkam, A. 2023. Efficient production of lactic acid from cellulose and xylan in sugarcane bagasse by newly isolated *Lactiplantibacillus plantarum* and *Levilactobacillus brevis* through simultaneous saccharification and co-fermentation process. *Heliyon*, **9**(7), e17935. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17935>
35. Hung, Y.H., Chae, M., Sauvageau, D. y Bressler, D.C. 2023. Adapted feeding strategies in fed-batch fermentation improve sugar delivery and ethanol productivity. *Bioengineered*. **14**:1. <https://doi.org/10.1080/21655979.2023.2250950>
36. Ilić N., Milić, M., Beluhan, S., Dimitrijević-Branković, S. 2023. Cellulases: From Lignocellulosic Biomass to Improved Production, **16**(8), 3598. <https://doi.org/10.3390/en16083598>
37. Infanzón-Rodríguez, M. I., del Moral, S., Castro-Martínez, C., Cano-Sarmiento, C., Gómez-Rodríguez, J., Aguilar-Uscanga, M. A. 2022 Multi-response

- optimization using the desirability function of exoglucanases, endoglucanases and β -glucosidases production by *Aspergillus niger* ITV-02 from delignified sugarcane bagasse. Sugar Tech, 25(1), 86–98. <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01191-7>.
38. Infanzón-Rodríguez, M. I., Ragazzo-Sánchez, J. A., del Moral, S., Calderón-Santoyo, M., Aguilar-Uscanga, M. G. 2021 Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass using native cellulase produced by *Aspergillus niger* ITV02 under liquid state fermentation. Biotechnology and Applied Biochemistry. doi:10.1002/bab.209710.1002/bab.2097.
39. Kawaguchi, H., Hasunuma, T., Ogino, C., Kondo, A. 2016. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. Current Opinion in Biotechnology, **42**, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.031>
40. Khaire, K. C., Moholkar, V. S. y Arun Goyal, A. 2021. Bioconversion of sugarcane tops to bioethanol and other value added products: An overview. Materials Science for Energy Technologies. **4**: 54-68. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2020.12.004>
41. Knápek, J., Králík, T., Vávrová, K., Valentová, M., Horák, M., Outrata, D. 2021. Policy implications of competition between conventional and energy crops. Renewable and Sustainable Energy Reviews. **151**: 111618. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111618>
42. Konde, K.S., Nagarajan, S. Kumar, V., Patil, S. V., Ranade, V.V. 2021. Sugarcane bagasse based biorefineries in India: Potential and challenges. Sustainable Energy and Fuels. **5**: 52-78 . DOI: 10.1039/d0se01332c
43. Korasapati, R., Babu Basthipati, S., Rosangzuala, K., Ravinder Reddy, P., Gajjala, R., Ravindra Babu, P., ... Banoth, L. 2023. Value Added Products Generation from Sugarcane Bagasse and Its Impact on Economizing Biorefinery and Sustainability of Sugarcane Industry. IntechOpen, ISBN: **9781803563701**, **2**(1) <https://doi.org/10.5772/intechopen.107472>

-
44. Kumar, A. y Chandra, R. 2020. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*, **6**, e03170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>
45. Kumar, A.K. y Sharma, S. 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing* **4**(1):7 <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
46. Maslova, O., Stepanov, N., Senko, O., Efremenko, E. 2019. Production of various organic acids from different renewable sources by immobilized cells in the regimes of separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SFF). *Bioresource Technology*, **272**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.143>
47. Menegazzo, F., Ghedini, E., y Signoretto, M. (2018). Producción de 5-hidroximetilfurfural (HMF) a partir de biomásas reales. *Molecules*, **23** (9), 2201. <https://hacer.o/1/moléculas23092201>
48. Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**:426–428. doi: 10.1021/ac60147a030.
49. Miranda, A. 2019. Producción de celulasas de *Aspergillus niger* ITV-02. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.
50. Miron, J. O. 2020. Evaluación de la producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales en México. Trabajo de grado, Universidad Politécnica de Madrid. Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica de Madrid. Recuperado: https://oa.upm.es/75776/1/TFG_JAIME_OLIVARES_MIRON.pdf
51. Mokomele, T., Brandt, B.A., Görgens, J.F. 2023. Effective Fermentation of Sugarcane Bagasse Whole Slurries Using Robust Xylose-Capable *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioenerg. Res.* **16**; 2297–2313. <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10577-8>
52. Morales-Martínez, J., Aguilar-Uscanga, M. G., Bolaños-Reynoso, E., López-Zamora, L. 2021. Optimización de pretratamientos químicos utilizando la metodología de superficie de respuesta para la producción de etanol de

- segunda generación a partir de residuos de cáscara de café. *BioEnergy Research*, 14(4), 815–827. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10197-6>
53. Moran-Aguilar, M.G. 2018. Estudio de la sacarificación del bagazo de caña de azúcar y *Agave angustifolia* para la producción de azúcares fermentables. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/2503>
54. Nochebuena-Morando, L. E., Domínguez-Gómez, C. X., López-Zamora, L., Aguilar-Uscanga, M. G. 2014. Optimización estadística del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino de bagazo de caña de azúcar para sacarificación enzimática con Tween 80 utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 4(1), 15–23. <https://doi.org/10.1007/s13399-013-0091-5>
55. Nunes, L. J. R., Loureiro, L. M. E. F., Sá, L. C. R., Silva, H. F. C. 2020. Recuperación de residuos de la industria de la caña de azúcar: un estudio de caso que utiliza tecnologías de conversión termoquímica para aumentar la sostenibilidad. *Applied Sciences*, 10(18), 6481. <https://doi.org/10.3390/app10186481>
56. Oleszek M., Kowalska I., Oleszek W. 2019. Fitoquímicos en cultivos bioenergéticos. *Phytochem.* 18(3): 893–927. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-019-09639-7>
57. Partida, S.G. 2017. Producción de etanol a partir de bagazo de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) mejorado genéticamente. Tesis doctoral. Instituto Tecnológico de Veracruz.
58. Patel, J.P. y Parsania, P.H. 2018 Characterization, testing, and reinforcing materials of biodegradable composites. *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites*. ISBN 9780081009703 :55-79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100970-3.00003-1>
59. Ranganathan, S., Mahesh, S., Suresh, S., Nagarajan, A., Sen, A. T., Yennamalli, R. M. 2022. Experimental and computational studies of cellulases as bioethanol

- enzymes, Bioengineered, **13**(5): 14028-14046, <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2085541>
60. Rasid N.S.A., Shamjuddin A., Zuhail A., Rahman A., Amin N.A.S. 2021 Recent advances in green pre-treatment methods of lignocellulosic biomass for enhanced biofuel production. *Journal of Cleaner Production*. **321**:129038. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129038>
61. Robertson, B.A. y Doran, P.J. 2013. Biofuels and biodiversity: the implications of energy sprawl. *Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press. **2**: 528-539. DOI:10.1016/B978-0-12-384719-5.00341-5
62. Ruan, R., Zhang, Y., Chen, P., Liu, S., Fan, L., Zhou, N., Ding, K., Peng, P., Addy, M., Cheng, Y., Anderson, E., Wanh, Y., Liu, Y., Lei, H., Li, Bingxi. 2019. Biofuels: Introduction. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels* (2nd Edition). ISBN **9780128168561**.3-43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816856-1.00001-4>.
63. Sahu, O. (2018). Evaluación de la industria de la caña de azúcar: idoneidad para la producción, el consumo y la utilización. *Ana. Agrar. Ciencia*, **16**: 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.08.001>
64. Sarto, S., Hildayati, R., Syaichurrozi, I. 2018. Effect of chemical pretreatment using sulfuric acid on biogas production from water hyacinth and kinetics. *Renewable Energy*, **132**: 335-350. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.07.121>
65. SIAP. 2020. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Producción nacional de caña de azúcar. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Consultado 16 agosto 2021).
66. Silva, C. G., Campini, P.A.L., Rocha, D.B. y Rosa, D.S. 2019. The influence of treated eucalyptus microfibers on the properties of PLA biocomposites. *Composites Science and Technology*. **179**: 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2019.04.010>
67. Silva, C. M., Matos, M., Rocha, G. J. M. 2023. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for

- enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 12(2), 277-289. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02200-1>.
68. Singhanian, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., Pandey, A. 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
69. Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D. 2008 Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>
70. Smartgreen: Productos Biodegradables. 2019. El Bagazo de Caña de Azúcar, su lado ecológico. Recuperado de: <https://smartgreen.com.mx/bagazo-de-cana-de-azucar/>
71. Suárez, G.A., Sánchez, S.R., Lazaro, A., Rodríguez, U.F. 2022. Conceptos de biocatálisis de lignocelulosa desde un enfoque de ingeniería de procesos y sistemas: una revisión. *Perfiles*, 1(28): 36-49. <https://doi.org/10.47187/perf.v1i28.179>
72. Sun, Y. and Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Journal Bioresource Technology* 83(1):1-11, DOI: [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00212-7)
73. Szopa, D., Skrzypczak, D., Izydorczyk, G., Chojnacka, K., Moustakas, K., Witek-Krowiak, A. 2023. Waste Valorization towards Industrial Products through Chemo- and Enzymatic- Hydrolysis, *Bioengineered*, 14(1), 2184480 <https://doi.org/10.1080/21655979.2023.2184480>
74. Tavares, A. P. M., Rosales, M., Lima, S. A. C., Carvalho, M. G. V. S., Silvestre, L. 2024. Enzyme-Driven Bioprocesses for Sustainability: Current Trends and Perspectives. In A. P. M. Tavares & R. Rosales (Eds.), *Sustainable Catalysis*, 293–310. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-42999-6_10.
75. Tursi, A. 2019. A review on biomass: importance, chemistry, classification, and conversion. *Biofuel Res.* 6: 962-979. <https://dx.doi.org/10.18331/BRJ2019.6.2.3>

76. Ungureanu, N., Valentin V., Sorin-Ștefan B. 2022. Valorización Sostenible de Residuos y Subproductos del Procesamiento de la Caña de Azúcar Sostenibilidad, **14**(17), 11089. <https://doi.org/10.3390/su141711089>
77. Varilla-Mazaba, A., Raggazo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., del Moral, S., Gómez Rodríguez, J., Aguilar-Uscanga, M.G. 2024. Optimización multirrespuesta de la hidrólisis ácida en bagazo de caña de azúcar para obtener alta concentración de xilosa. *Biomass Conversion and Biorefinery*, **14**, 173–181. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02404-5>
78. Wikipedia. 2009. Ficheru:Saccharum officinarum Blanco. Recuperado de: [https://ast.m.wikipedia.org/wiki/Ficheru:Saccharum officinarum Blanco1.18-cropped.jpg](https://ast.m.wikipedia.org/wiki/Ficheru:Saccharum_officinarum_Blanco1.18-cropped.jpg)
79. Wikipedia. s.f. Celulasa. Recuperado de: <https://hmn.wiki/es/Cellulase>
80. Zhang, J. y Zhang, X. 2019. The thermochemical conversion of biomass into biofuels. In Biomass. Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy. ISBN **9780081024263**, 327–368. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00015-1>

ANEXO 1

Croquis de los equipos y áreas de la Planta Piloto para la producción de bioetanol de 1a y 2a generación, Instituto Tecnológico de Veracruz

