



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**Estandarización de las condiciones del proceso de producción de etanol a  
partir de celobiosa por *Saccharomyces cerevisiae* RP2-BGL**

**TESIS**

Que presenta

**Luis Fernando Castro Eddy**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**Biotecnología**

Directora de Tesis

**Dra. María Teresa Ponce Noyola**

Ciudad de México,

Agosto de 2018

## **Comité Tutorial**

### **Directora de Tesis**

Dra. María Teresa Ponce Noyola

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería-Cinvestav

### **Asesores**

Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo

Grupo de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables - Cinvestav

Dr. Eliseo Cristiani Urbina

Departamento de Bioquímica- ENCB-IPN

## **Créditos**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Microbiana y Fermentaciones del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) Unidad Zacatenco.

El desarrollo de esta tesis de Maestría tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca número 458292 y el financiamiento del proyecto CB-2014/236895 de CONACyT.

## **Agradecimientos**

A la **Dra. Tere Ponce**, por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto en su laboratorio y formar parte de su grupo de trabajo, así como por el apoyo que me brindó dentro y fuera del ámbito académico. A usted, muchas gracias.

Al **Dr. Poggi**, por sus asesorías impartidas cuando fueron necesarias.

Al **Dr. Cristiani**, gracias por la orientación y guía en momentos importantes de la investigación.

A la **M. en C. Odilia Pérez Avalos**, por su gran aportación al proyecto en la cuestión experimental y su amplia asesoría para la implementación de las técnicas necesarias para este trabajo.

A **Verónica**, sin su extraordinario apoyo dentro de las tareas del laboratorio este trabajo hubiese sido más complicado, gracias por la ayuda técnica, pero sobre todo por las risas y largas charlas que sirven como distracción y relajante en el arduo trabajo de la investigación.

A todos aquellos con los que tuve el placer de compartir el laboratorio por corto o largo tiempo, **Javier** fue el predecesor de mi trabajo, **Jimena** quien compartió sus experiencias, **Miguel** de quien aprendí lo que es dedicación, **Diego** y **Erika**, más que compañeros de laboratorio, amistades con quien reí, sufrí y gocé las experiencias vividas a lo largo de 2 años.

**Leobardo, Victor, Pablo, Monica, Ana, Adriana**, compañeros de generación y de aventuras, gracias por estos dos años compartiendo juntos.

**Andrea, Fernando, Emir, Balbuena, Jorge M., Jorge L., Magdiel, Sofía Christian, Job** amistades que pese a la distancia se mantienen siempre ahí.

**Sara**, por soportarme, aportarme y apoyarme siempre que lo necesité, por todo lo que pasamos juntos, por lo que falta, gracias.

A mis papás **Patricia** y **Javier**, por incitarme a superarme y formar quien soy.

A mis hermanos **Tita** eres como mi segunda madre, gracias por hacerme creer que soy capaz de todo, **Sergio** porque sé que siempre puedo contar contigo, **Carlos** aunque de lejos, pero estás siempre ahí, **Pato** por demostrar que ante cualquier adversidad hay que luchar de frente, eres una verdadera guerrera.

A todos mis sobrinos, **Mauricio**, **Enrique**, **Sylvia**, **Ángel** y el más reciente **Ethan**, por hacerme creer que soy un buen ejemplo.

A **Don Germán**, por saberme escuchar y dar consejos de corazón, aunque los escuche a medias.

Pero sobre todo, gracias especialmente a **Mauricio** y **Zuriken**, ustedes me han apoyado en gran manera en todo este proceso y espero algún día poder pagarles aunque sea un parte de lo que me han dado, sus consejos y las experiencias que hemos pasado juntos son parte realmente importante de este proyecto, nuevamente, gracias.

A todos aquellos que por mala memoria no plasmé su nombre, gracias.

# Contenido

Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tablas.....	xi
Abreviaturas y símbolos .....	xii
Resumen.....	xiv
1.-Introducción.....	16
1.1 Bioetanol.....	16
1.2 Lignocelulosa.....	17
1.3 Celulasas.....	19
1.3.1 Cellulomonas flavigena PR-22.....	20
1.4 Producción de etanol celulósico.....	21
1.4.1 Proceso secuencial.....	22
1.4.2 Proceso simultáneo.....	23
1.4.3 Proceso consolidado.....	24
1.5 Saccharomyces cerevisiae RP2-BGL.....	24
2.-Justificación.....	26
3.-Hipótesis.....	27
4.-Objetivos.....	28
5.- Estrategia experimental.....	29
6.- Materiales y Métodos.....	30
6.1 Microorganismos y medio de cultivo.....	30
6.2 Preparación de Inóculo de S. cerevisiae RP2-BGL.....	30

6.3 Fermentación control con <i>S. cerevisiae</i> RP2-BGL.....	30
6.4 Estandarización de las condiciones de operación .....	31
6.4.1 Análisis de factores preliminares.....	31
6.4.2 Análisis de superficie de respuesta.....	31
6.4.3 Validación de la superficie de respuesta .....	31
6.5 Construcción del modelo matemático.....	31
6.6 Determinación del régimen de operación .....	32
6.7 Sacarificación enzimática de bagazo de caña .....	32
6.8 Sacarificación y fermentación simultánea (SimSF).....	32
6.9 Determinación de crecimiento celular .....	32
6.9.1 Densidad óptica.....	32
6.9.2 Proteína celular .....	33
6.10. Pretratamiento del bagazo de caña .....	33
6.11 Caracterización del bagazo de caña pretratado .....	33
6.11.1 Determinación de celulosa.....	33
6.11.2 Determinación de holocelulosa .....	34
6.11.3 Determinación de hemicelulosa .....	34
6.11.4 Determinación de lignina.....	34
6.11.5 Humedad y Cenizas .....	35
6.12 Determinación de la actividad de $\beta$ -glucosidasa.....	35
6.13 Determinación de azúcares y etanol.....	36
6.14 Herramientas estadísticas .....	36
7. Resultados y Discusión .....	37

7.1.1 Evaluación de parámetros de operación.....	37
7.2.1 Estandarización de las condiciones de operación .....	41
7.2.2 Validación de las condiciones de operación .....	48
7.3.1 Elaboración de un modelo cinético .....	52
7.3.2 Evaluación del régimen de lote alimentado .....	58
7.3.2.1 Evaluación de alimentación lineal .....	58
7.3.2.2 Evaluación de alimentación exponencial.....	62
7.4.1 Tratamiento y caracterización del bagazo de caña.....	69
7.4.2 Evaluación de cócteles enzimáticos ricos en celulasas .....	70
7.4.3 Establecimiento del proceso SimSF .....	72
8.- Conclusión .....	79
9.-Bibliografía .....	80
10.- Anexos .....	85
10.1 Análisis de varianza celobiosa residual .....	85
10.2 Análisis de varianza etanol final.....	86
10.3 Análisis de varianza rendimiento .....	87
10.4 Validación del modelo.....	88
10.5 Ecuación para la alimentación exponencial .....	90
10.6 Ecuación empírica para determinar la cédula de alimentación.....	92

## Índice de Figuras

Figura 1 Estructura de la lignocelulosa (Rubin, 2008).....	18
Figura 2. Celobiosa residual a las 24, 36 y 48 horas en el proceso fermentativo de <i>S. cerevisiae</i> RP2-BGL en medio YPC bajo las siguientes condiciones: A,B: T= 30 °C, sin agitación, X <sub>o</sub> = 0.5 g/L, S <sub>o</sub> =10 g/L, pH inicial= 5 y 6 respectivamente. C,D: T= 32 °C y 28° C respectivamente, sin agitación, X <sub>o</sub> = 0.5 g/L, S <sub>o</sub> =10 g/L, pH inicial= 6.5. Control: T= 30 °C, sin agitación, X <sub>o</sub> = 0.5 g/L, S <sub>o</sub> =10 g/L, pH inicial= 6.5. Letras y números iguales sobre las barras indican pertenecer al mismo grupo estadístico .....	38
Figura 3 Producción de etanol a las 24, 36 y 48 horas en el proceso fermentativo de <i>S. cerevisiae</i> RP2-BGL en medio YPC bajo las siguientes condiciones: A,B: T= 30 °C, sin agitación, X <sub>o</sub> = 0.5 g/L, S <sub>o</sub> =10 g/L, pH inicial= 5 y 6 respectivamente. C,D: T= 32 °C y 28° C respectivamente, sin agitación, X <sub>o</sub> = 0.5 g/L, S <sub>o</sub> =10 g/L, pH inicial= 6.5. Control: T= 30 °C, sin agitación, X <sub>o</sub> = 0.5 g/L, S <sub>o</sub> =10 g/L, pH inicial= 6.5. Letras y números iguales sobre las barras indican pertenecer al mismo grupo estadístico .....	39
Figura 4 Rendimiento producto-sustrato a las 24, 36 y 48 horas en el proceso fermentativo de <i>S. cerevisiae</i> RP2-BGL en medio YPC bajo las siguientes condiciones: A,B: T= 30 °C, sin agitación, X <sub>o</sub> = 0.5 g/L, S <sub>o</sub> =10 g/L, pH inicial= 5 y 6 respectivamente. C,D: T= 32 °C y 28° C respectivamente, sin agitación, X <sub>o</sub> = 0.5 g/L, S <sub>o</sub> =10 g/L, pH inicial= 6.5. Control: T= 30 °C, sin agitación, X <sub>o</sub> = 0.5 g/L, S <sub>o</sub> =10 g/L, pH inicial= 6.5. (Letras y números iguales sobre las barras indican pertenecer al mismo grupo estadístico) .....	40
Figura 5 Concentración de etanol tomando en cuenta los factores significativos .	45
Figura 6 Concentraciones máximas de etanol obtenidas bajo las condiciones evaluadas considerando los factores principales. ....	46
Figura 7 Gráfica de contorno para la predicción de la concentración final de etanol usando el algoritmo de optimización numérica (Design Expert X®).....	47

Figura 8 Fermentación de etanol a partir de celobiosa por *S. cerevisiae* RP2-BGL bajo las condiciones estandarizadas mediante el modelo de superficie de respuesta. ( $S_0=27 \text{ g L}^{-1}$  ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$  , Agitación = 60 rpm,  $T= 32 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}_0 = 6$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones independientes) ..... 49

Figura 9 Producción de etanol a partir de celobiosa por *S. cerevisiae* RP2-BGL bajo las condiciones estandarizadas mediante el modelo de superficie de respuesta. ( $S_0=27 \text{ g L}^{-1}$  ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$  , Sin agitación,  $T= 32 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}_0 = 6$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones independientes). ..... 50

Figura 10 Concentraciones de celobiosa residual y etanol final bajo condiciones estandarizadas mediante el modelo de superficie de respuesta.A: Con agitación B: Sin agitación (Los resultados son promedios de tres mediciones)..... 51

Figura 11 Comparación entre los valores predichos para la concentración final de etanol y celobiosa residual por el modelo de superficie de respuesta y los valores obtenidos experimentalmente. .... 52

Figura 12 Comparación entre los valores predichos mediante un modelo de Haldane con producción de etanol parcialmente asociada al crecimiento y término de mantenimiento celular contra datos experimentales.(  $S_0=27 \text{ g L}^{-1}$  ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$  agitación= 150 rpm,  $T= 32 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}_0 = 6$ ..... 57

Figura 13 Fermentación de celobiosa en régimen de operación de lote alimentado. (Lote:  $S_0=10 \text{ g L}^{-1}$  ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_0= 200 \text{ mL}$ ,  $T = 32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ , sin agitación, Lote alimentado:  $F = 6.15 \text{ mL h}^{-1}$  ,  $S_a=65 \text{ g L}^{-1}$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones) ..... 59

Figura 14 Fermentación de celobiosa en régimen de operación por lote alimentado. (Lote: $S_0=10 \text{ g L}^{-1}$  ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_0= 200 \text{ mL}$ ,  $T = 32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ , agitación=200 rpm, Lote alimentado:  $F = 6.15 \text{ mL h}^{-1}$  ,  $S_a=65 \text{ g L}^{-1}$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones)..... 61

Figura 15 Fermentación de celobiosa en régimen de operación por lote alimentado. (Lote:  $S_0=15 \text{ g L}^{-1}$  ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_0= 200 \text{ mL}$ ,  $T = 32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,

agitación=200 rpm, Lote alimentado:  $F = 5.54 \text{ mL h}^{-1}$  ,  $S_a=62.5 \text{ g L}^{-1}$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones) ..... 62

Figura 16 Producción de etanol a partir de celobiosa en régimen de alimentación exponencial. (Lote:  $S_0=15 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_0= 140 \text{ mL}$ ,  $T = 32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ , Agitación = 300 rpm, Lote alimentado:  $S_a=65 \text{ g L}^{-1}$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones) ..... 65

Figura 17 Producción de etanol a partir de celobiosa en régimen de alimentación exponencial (Lote :  $S_0=15 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_0= 140 \text{ mL}$ ,  $T = 32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ , Agitación = 300 rpm,, Lote alimentado:  $S_a=80 \text{ g L}^{-1}$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 replicas) ..... 67

Figura 18 Producción de azúcares durante la sacarificación enzimática del bagazo de caña pretratado con NaOH al 2 %. ( $T= 35^\circ\text{C}$ , regulador citratos 100 mM  $\text{pH} =6$ , 300 rpm)..... 71

Figura 19 Proceso SimSF para la obtención de etanol a partir de bagazo de caña (2%) por *S. cerevisiae* RP2-BGL. ( $T= 35^\circ\text{C}$ , 300 rpm, sin aireación, 5000 FPU de Celluclast)..... 72

Figura 20 Proceso SimSF para la obtención de etanol a partir de bagazo de caña (3%) por *S. cerevisiae* RP2-BGL. ( $T= 35^\circ\text{C}$ , 300 rpm, sin aireación, 5000 U de Celluclast)..... 73

Figura 21 Proceso SimSF para la obtención de etanol a partir de bagazo de caña (6,8 y 10%) por *S. cerevisiae* RP2-BGL. ( $T= 35^\circ\text{C}$ , 300 rpm, sin aireación, 5500 , 5750 y 6000 U de Celluclast) ..... 75

## Índice de Tablas

Tabla 1 Diseño experimental en variables naturales para la estandarización de las condiciones de operación del proceso de obtención de etanol a partir de celobiosa por <i>S. cerevisiae</i> RP2-BGL .....	41
Tabla 2. Celobiosa residual, etanol y rendimiento del proceso de obtención de etanol a partir de celobiosa por <i>S. cerevisiae</i> RP2-BGL evaluado bajo condiciones establecidas mediante un diseño de superficie de respuesta .....	42
Tabla 3 Parámetros cinéticos de <i>S. cerevisiae</i> RP2-BGL obtenidos mediante el ajuste a un modelo de tipo Haldane con doble inhibición.....	56
Tabla 4 Comparación de la productividad de los distintos regímenes de operación trabajados.....	66
Tabla 5 Comparación de parámetros de producción de etanol a partir de cepas de <i>S. cerevisiae</i> expresando $\beta$ -glucosidasas recombinantes.....	69
Tabla 6 Composición del bagazo de caña crudo y tratado alcalinamente con NaOH 2%.....	70
Tabla 7 Productividades y rendimientos del proceso SimSF a partir de bagazo de caña por <i>S. cerevisiae</i> RP2-BGL y coctel enzimático Celluclast.....	77
Tabla 8 Producción de etanol mediante procesos SimSF a partir de sustratos celulósicos de segunda generación con <i>S. cerevisiae</i> . .....	78

## Abreviaturas y símbolos

$\gamma$  = Coeficiente de mantenimiento celular

$x$  = Concentración de biomasa

$S_c$  = Concentración de celobiosa

$E_t$  = Concentración de etanol

$k_{ic}$  = Constante de inhibición por celobiosa

$k_{iEt}$  = Constante de inhibición por etanol

$K_d$  = Constante de muerte celular

$Y_{\frac{x}{s}}$  = Rendimiento biomasa-sustrato

$Yg_{\frac{x}{s}}$  = Rendimiento global biomasa-sustrato

$Yg_{\frac{p}{s}}$  = Rendimiento global producto-sustrato

$Y_{\frac{p}{s}}$  = Rendimiento producto-sustrato

$r_s$  = Velocidad de consumo de celobiosa

$r_{Et}$  = Velocidad de producción de etanol

$\alpha$  = Coeficiente de producción de etanol asociado al crecimiento

$\beta$ =Coeficiente de producción de etanol no asociado al crecimiento

$k_{S_c}$ =Constante de afinidad a la celobiosa

$r_x$ =Velocidad de crecimiento de biomasa

$\mu_{max}$ =Velocidad específica máxima de crecimiento

BC	Bagazo de Caña
CMCasa	Carboximetilcelulasa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
HMF	Hidroxi Metil Furfural
MTBE	metil ter-butyl éter
NO <sub>x</sub>	Óxidos de Nitrógeno
NTG	N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina
SD	Medio de cultivo, del inglés "Synthetic Defined"
SimSF	Sacarificación y fermentación simultánea
SO <sub>2</sub>	Óxido de Azufre
YPC	Medio de cultivo, del inglés "Yeast Peptone Celobiose"

## Resumen

La producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos como alternativa a los combustibles derivados del petróleo aún no es rentable debido a los costos que representa la conversión de la celulosa a etanol. Un acercamiento para solucionar esta problemática es la implementación de procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SimSF). Este tipo de procesos reducen los costos del proceso aumentando su rentabilidad. Para poder llevar a cabo este tipo de procesos se requieren organismos capaces de asimilar y fermentar los componentes de la lignocelulosa. Derivado de esto se han desarrollado plataformas microbianas como *Saccharomyces cerevisiae* RP2-BGL, la cual es capaz de asimilar y fermentar celooligosacáridos como la celobiosa en un solo paso. Sin embargo, para que esta cepa pueda ser utilizada en procesos rentables es necesario mejorar la productividad y rendimientos del proceso de obtención de etanol a partir de celobiosa.

En el presente trabajo se estandarizaron las condiciones de operación del proceso mencionado haciendo uso de una metodología de superficie de respuesta. Se evaluaron y optimizaron las variables que tenían un efecto significativo sobre el proceso. Al término de la estandarización se obtuvo una concentración final de etanol de  $12.71 \text{ g L}^{-1}$  y un rendimiento de  $0.5 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{celobiosa}}^{-1}$  los cuales representan un aumento del 400 y 20% respectivamente a lo reportado por Ríos-Fránquez (2017). Posterior a la estandarización se desarrolló un modelo matemático para describir el proceso y se evaluó el régimen de operación por lote alimentado con alimentaciones lineal y exponencial. Los mejores resultados se obtuvieron mediante la alimentación exponencial alcanzando  $28.5 \text{ g L}^{-1}$  de etanol y un rendimiento de  $0.514 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{celobiosa}}^{-1}$  el cual representa el 94% del rendimiento teórico máximo. *S. cerevisiae* RP2-BGL también fue usada para llevar a cabo un proceso SimSF a partir de bagazo de caña y con enzimas comerciales libre de  $\beta$ -glucosidasa obteniendo  $28.57 \text{ g L}^{-1}$  de etanol y un rendimiento de  $0.43 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{celulosa}}^{-1}$ .

## Abstract

Lignocellulosic bioethanol production as an alternative to fossil fuels isn't yet profitable due to the high cost that the conversion of cellulose to ethanol represents. An approach to this problem is the implementation of simultaneous saccharification and fermentation processes (SimSF). This type of processes increases the rentability by decreasing the operation costs. In order to achieve this, microorganisms capable of assimilate and ferment the components from cellulose are required. Due to this, microbial platforms were developed such as *Saccharomyces cerevisiae* RP2-BGL, which is able to assimilate and ferment celooligosaccharides like cellobiose in one step. However, in order to use this strain in profitable processes, productivity and overall yields of the ethanol production from cellobiose needs to be improved.

In the present work operational conditions were standardized by a surface response methodology. The variables that had a significant impact on the process were evaluated and optimized. At the end of the standardization a final ethanol concentration of  $12.71 \text{ g L}^{-1}$  and an ethanol yield on cellobiose of a  $0.50 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{Cellobiose}}^{-1}$  were achieved, which represents an increase of 400 and 20% respectively from that reported by Ríos-Fránquez, (2017). After the standardization, a mathematical model used to describe and predict the process was developed and fed-batch regime was evaluated with lineal and exponential feeding. The best results obtained were those with exponential fed-batch regime achieving  $28.5 \text{ g L}^{-1}$  of ethanol and a yield of  $0.514 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{Cellobiose}}^{-1}$  which represents the 94% of the theoretical maximum yield. *S. cerevisiae* RP2-BGL was also used in a SimSF process with sugarcane bagasse and  $\beta$ -glucosidase free commercial enzymes achieving  $28.57 \text{ g L}^{-1}$  of ethanol with a  $0.43 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{Cellulose}}^{-1}$  yield.

# 1.-Introducción

## 1.1 Bioetanol

El crecimiento en la población mundial, así como la constante industrialización y modernización de la civilización, tiene como consecuencia que el consumo global de energía haya incrementado 17 veces en el último siglo, así como las emisiones de CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub> (Demirbas, 2007). Actualmente se consumen 98.3 millones de barriles de petróleo crudo al día y se estima que para el año 2020 la demanda será de 112 millones de barriles diarios (IEA, 2018). La problemática que conlleva esta tendencia en el consumo energético principalmente de combustibles fósiles, es la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera. En las últimas dos décadas aumentó 38% la cantidad de CO<sub>2</sub> liberado alcanzando en el 2013 un total de 32190 millones de toneladas de CO<sub>2</sub>. El sector transportista es uno de los principales contribuyentes en la emisión de gases de efecto invernadero, aportando el 19% del CO<sub>2</sub> total emitido Goldemberg,2008.

Debido al consumo continuo de las reservas de combustibles fósiles y los efectos negativos que provocan su combustión se deben de generar fuentes de energía alternas, las cuales provean energía limpia y renovable, además de ser sostenibles, eficientes y económicamente rentables (Prasad, 2006). La Comisión Europea tiene como objetivo el reemplazo progresivo de los combustibles convencionales, de tal manera que para el año 2020 el 20% del combustible total utilizado en el sector de los transportes sea de fuentes alternativas (EC, 2000).

Los biocombustibles son una alternativa viable para disminuir el impacto ambiental derivado de la dependencia de los combustibles fósiles, así como para mantener el costo de la energía a niveles asequibles (Li, 2012). Se define como biocombustible a todo aquel gas o líquido obtenido a partir de biomasa vegetal los cuales son empleados con propósito de transporte (Stöcker, 2008; IEA,2011).

Actualmente el biocombustible más utilizado es el bioetanol, en forma de agente oxigenante de la gasolina mediante la formulación de metil ter-butyl éter (MTBE) aumentando la eficacia de la combustión y reduciendo los efectos contaminantes

de los hidrocarburos que no se oxidan completamente (Sánchez, 2005). A su vez, se puede utilizar en mezclas con gasolinas conteniendo hasta un 20% de etanol sin necesidad de alguna modificación a los motores convencionales (Hahn-Hägerdalet, 2006). La mayoría de la producción de bioetanol se realiza en países como Estados Unidos (57.6 %) y Brasil (27.6 %) a partir de almidón de maíz y caña de azúcar respectivamente (AFDC, 2016). Sin embargo el uso de estas materias primas representa una amenaza contra la autosuficiencia alimentaria y limita la viabilidad de producción en países como México, India y Tailandia.

Una alternativa a la utilización de cultivos de interés para el consumo humano son los residuos agroindustriales ricos en lignocelulosa, los cuales poseen el potencial de reducir el impacto en la autosuficiencia alimentaria y minimizar la huella de carbono general (Waldron, 2010).

Numerosos estudios se han llevado a cabo para desarrollar tecnologías que permitan la producción a gran escala de etanol celulósico, sin embargo, el principal factor limitante es el alto grado de complejidad inherente al procesar este tipo de materias primas lignocelulósicas.

## **1.2 Lignocelulosa**

La lignocelulosa es el principal componente de la biomasa vegetal, la cual comprende alrededor del 50% de la masa de las plantas producida por fotosíntesis (fotomasa), lo cual representa la materia prima orgánica renovable más abundante en el planeta.

Este polímero está compuesto principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina los cuales se encuentran altamente entrecruzados y unidos químicamente mediante fuerzas no covalentes y enlaces covalentes (Fig. 1). El porcentaje de cada uno de estos componentes es variable y dependiente de diversos factores como el tipo y edad del cultivo, sin embargo, estos valores oscilan entre el 20-50%, 20-40% y 10-20% para la celulosa, hemicelulosa y lignina respectivamente (Sánchez, 2009).

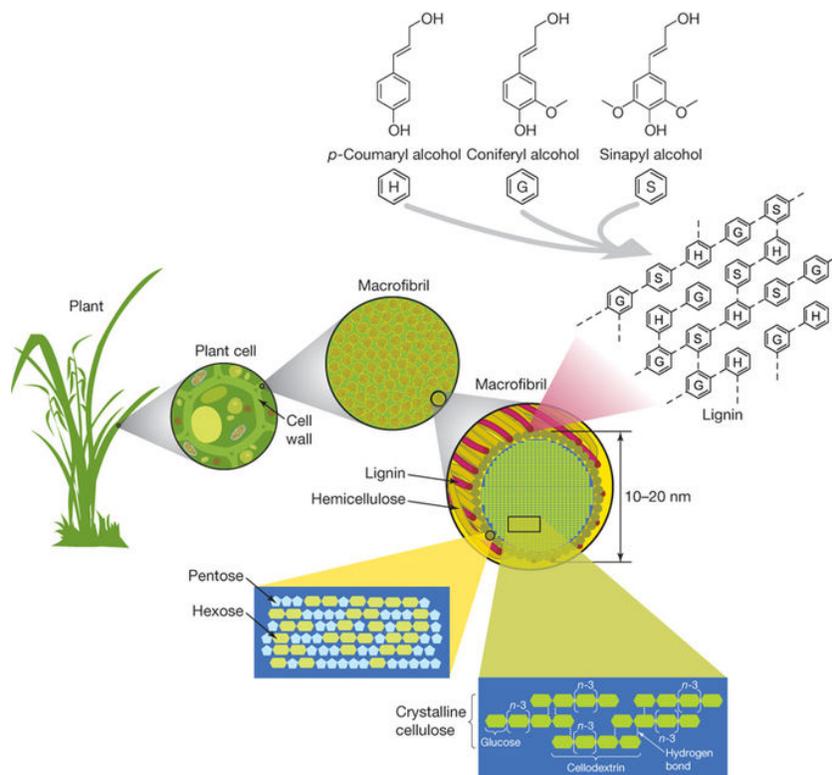


Figura 1 Estructura de la lignocelulosa (Rubin, 2008)

La celulosa es un homopolímero lineal compuesto por moléculas de D-glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 los cuales a su vez forman dímeros de celobiosa. Esto forma cadenas largas también denominadas fibrillas elementales, que se mantienen unidas gracias a las interacciones de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Gran parte de la celulosa se encuentra en su forma cristalina debido a la organización de las fibrillas y solamente existe una pequeña cantidad (5-10 %) de fibrillas no organizadas dando lugar a regiones amorfas de la celulosa, las cuales son más susceptibles a la degradación enzimática (Pérez *et al.*, 2002).

La hemicelulosa es un heteropolisacárido de menor peso molecular que la celulosa, está compuesto por azúcares como D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico. Estos generalmente se encuentran unidos mediante enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 aunque también se pueden encontrar uniones en formas de

enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,3. La principal diferencia entre la celulosa y la hemicelulosa es que esta última posee cadenas laterales cortas compuestas de diferentes azúcares, mientras que la celulosa consiste de oligómeros lineales de cadena larga. La hemicelulosa rodea las fibrillas de la celulosa y funge como un agente de unión entre la celulosa y la lignina, que a su vez crea una compleja red de enlaces que provee de fuerza estructural (Rubin, 2008).

El tercer componente principal es la lignina el cual es un heteropolímero tridimensional amorfo, insoluble en agua y ópticamente inactivo compuesto por unidades de fenilpropanoides unidos mediante enlaces éter y carbono-carbono. La naturaleza de estos enlaces le confieren la característica de ser difícilmente hidrolizables. La función de la lignina es proveer de soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al estrés oxidativo y ataques microbianos (Del río *et al.*, 2007).

De los tres compuestos mencionados anteriormente, el de mayor importancia para la producción del bioetanol de segunda generación es la celulosa. Sin embargo este polímero debe ser hidrolizado previamente para tener los azúcares libres que puedan ser fermentados. Para llevar a cabo lo anterior en la naturaleza existen enzimas específicas que se encargan de hidrolizar los enlaces presentes en la estructura de la celulosa. A estas enzimas se les denominan celulasas.

### **1.3 Celulasas**

La degradación enzimática de la celulosa para la obtención de monómeros de glucosa es llevada a cabo por un conjunto de enzimas denominadas celulasas, las cuales son producidas por una gran variedad de microorganismos: hongos, bacterias aerobias, bacterias anaerobias y actinobacterias. Las celulasas pueden ser extra celulares o unidas a la membrana, pero sin importar su localización estas se clasifican dependiendo de su actividad catalítica (Sharma *et al.*, 2016). Las celulasas más utilizadas son:

- Endoglucanasa (EC 3.2.1.4): Este grupo de enzimas atacan de manera aleatoria los sitios internos de la región amorfa de la celulosa, generando nuevos extremos y oligosacáridos de diversas longitudes.
- Exoglucanasa (EC 3.2.1.91): Este grupo de enzimas puede actuar tanto en extremos reductores como no reductores de la cadena de celulosa. Dependiendo del producto que libere en mayor concentración es llamada glucanohidrolasa (liberación de glucosa) o celobiohidrolasa (liberación de celobiosa). Atacan únicamente la región cristalina.
- $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21): Actúan sobre los extremos no reductores e hidroliza los celooligosacáridos y la celobiosa en glucosa. Esta enzima es inactiva en las regiones cristalina y amorfa de la celulosa.

Para poder llevar a cabo la hidrólisis completa de la celulosa se requiere de la acción conjunta de los tres grupos de enzimas. Sin embargo, si se tiene únicamente celulosa en su forma amorfa se puede prescindir de la actividad de exoglucanasa (Ozioko *et al.*, 2013).

Existe una gran variedad de microorganismos nativos productores de celulasas, entre los que se incluyen géneros de hongos como *Trichoderma* spp., *Plerouts* spp., bacterias como *Cellulomonas* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.. (Viteri-Flórez, *et al.*, 2015). Así mismo también existe un gran número de estudios para la creación de organismos hiper productores de celulasas y recombinantes (Guo *et al.*, 2011; Wong-Heong & Yong-Su, 2017).

### 1.3.1 *Cellulomonas flavigena* PR-22

*Cellulomonas flavigena* es un bacilo, Gram positivo, mesófilo, neutrófilo y aerobio el cual es reconocido por ser un organismo celulolítico productor de celulasas. Produce las enzimas de manera extracelular a excepción de la  $\beta$ -glucosidasa la cual se mantiene de forma intracelular en el espacio periplásmico de la bacteria.

Dentro del grupo del trabajo se realizaron trabajos previos con el objetivo de incrementar la producción de enzimas celulolíticas de la cepa nativa de *C. flavigena*. Mediante un proceso de mutación aleatoria con N-metil-N-nitro-N-

nitrosoguanidina (NTG), se obtuvo una mutante con elevada velocidad de crecimiento y 10 veces mayor actividad de  $\beta$ -glucosidasa comparada con la cepa materna, a esta cepa se le denominó PN-120 (Ponce-Noyola & de la Torre, 1995).

Posteriormente y con el objetivo de obtener una mutante desreprimida de *C. flavigena*, la cepa PN-120 se sometió a un nuevo proceso de mutación con NTG, derivado de esto se aisló la cepa PR-22 la cual mostró producir 2.2 veces más actividad de CMCasa en comparación con la cepa materna (Rojas-Rejón *et al.*, 2007).

Así mismo en trabajos anteriores se logró aislar y caracterizar la secuencia del gen de la  $\beta$ -glucosidasa de *C. flavigena* PN-120 denominado como *bgIA* (Río-Franquez, 2012). Esta secuencia se conservó durante la mutación en la cepa PR-22.

#### **1.4 Producción de etanol celulósico**

En la producción de etanol a partir de maíz y caña la materia prima representa un 40-70 % del costo total de producción (Sendelius, 2005), por lo cual el utilizar materiales lignocelulósicos como los residuos agroindustriales permitiría disminuir los costos ya que es una materia prima que se encuentra con amplia disponibilidad y es de fácil adquisición.

Existen diversos materiales lignocelulósicos que han sido evaluados para la producción de etanol, los cuales se pueden agrupar en seis categorías principales: residuos de cultivo (bagazo de caña, de agave, rastrojo de maíz), madera dura (aspen), madera suave (pino), desechos celulósicos (papel periódico, papel de oficina), biomasa herbal (pastos) y residuos sólidos municipales (Sánchez & Cardona, 2008). Dentro de estos materiales, el bagazo de caña es uno de los más estudiados debido a su alta disponibilidad, principalmente en países tropicales. Este residuo fibroso es obtenido después de la extracción del jugo de la caña de azúcar en el proceso de producción de azúcar (Martín *et al.*, 2007). El bagazo de caña es producido en altas cantidades en Brasil, Cuba, China y México (Hernández-Salas *et al.*, 2009). En el caso específico de México tan sólo en el

2017 se cosecharon 56 millones de toneladas (SAGARPA, 2017) lo cual indica el alto potencial que este país tiene como productor de etanol a partir de bagazo de caña.

A lo largo del tiempo se han ido creando y perfeccionando los procesos para la obtención de etanol celulósico. Por lo cual se han ido clasificando dependiendo de las etapas utilizadas dentro el mismo.

Los principales tipos de procesos son:

- Secuencial
- Simultáneo
- Consolidado

#### *1.4.1 Proceso secuencial*

La conversión de la lignocelulosa en etanol se puede lograr mediante una serie de etapas llevadas a cabo de manera secuencial. La primera etapa consta de un pretratamiento a la biomasa lignocelulósica para aumentar la disponibilidad de la celulosa mediante la remoción de lignina y hemicelulosa, así como reducir la cristalinidad de la celulosa para que sea más susceptible a enzimas celulolíticas (Keller *et al.*, 2003). Este tratamiento puede ser de naturaleza física (molienda, reducción de tamaño, explosión de vapor), química (adición de solventes, adición de ácidos, adición de álcali) o biológica (ligninasas) (Li *et al.*, 2002).

Una de las características deseadas dentro de los pretratamientos es que debe de preservar la utilidad de la hemicelulosa para su uso en otros procesos, así como evitar la formación de inhibidores de la fermentación como los furfurales (Laser *et al.*, 2002)

La sacarificación es la siguiente etapa, la cual consiste en la hidrólisis de la celulosa, obtenida en el pretratamiento, en monómeros de glucosa utilizando ácidos o enzimas. La hidrólisis ácida de la celulosa hace uso de ácidos fuertes como el ácido clorhídrico y el ácido sulfúrico, ya sea en forma concentrada o diluida. Las altas temperaturas requeridas para llevar a cabo la hidrólisis

empleando ácidos (200-240 °C) hace inevitable la formación de inhibidores como el hidroximetilfurfural (HMF) reduciendo así el rendimiento de la sacarificación y de la fermentación posterior.

La degradación de la celulosa mediante el uso de enzimas celulolíticas ha demostrado generar mejores resultados en la subsecuente fermentación debido a que no existe una degradación de los azúcares generados (Hernández-Salas, 2009), así mismo se evita la producción de compuestos inhibitorios. Sin embargo, esta etapa es económicamente limitante para la producción a gran escala de etanol lignocelulósico, debido al alto costo que representan las enzimas y su poca eficiencia de recuperación y reutilización en sacarificaciones consecutivas (Eriksson *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2007). Por lo cual esta etapa llega a representar hasta un 50% del costo total de producción (Howard *et al.*, 2003).

La siguiente etapa es la conversión de los monómeros de glucosa en etanol mediante organismos etanogénicos. Una de las cepas más utilizadas para la obtención de etanol es *Saccharomyces cerevisiae*, ya que posee la capacidad de fermentar una gran variedad de hexosas obteniendo buenos rendimientos, sin embargo, no posee de manera natural la habilidad de fermentar azúcares de cinco carbonos ni la celobiosa, que es un azúcar que se acumula mucho cuando no hay una buena degradación. En el método de producción secuencial la sacarificación y la fermentación son llevadas a cabo en reactores aislados, lo que permite que cada una de las etapas sea llevada bajo las condiciones óptimas de operación (Temperatura y pH) (Cardona & Sánchez, 2008).

#### 1.4.2 Proceso simultáneo

Un acercamiento para resolver la limitación económica que implica la sacarificación enzimática en el modelo secuencial es la implementación de un proceso de sacarificación y fermentación simultáneo (SimSF). En este proceso, la hidrólisis enzimática de la celulosa y la fermentación de los azúcares que se generan se realizan en una sola etapa en un solo reactor, lo cual implica una reducción de la inhibición por producto de las enzimas celulolíticas (Tomás-Pejo, *et al.*, 2009).

Sin embargo, este proceso representa un retroceso en términos de condiciones de operación, ya que las etapas de sacarificación y de fermentación poseen condiciones óptimas de temperatura y pH diferentes. Por ejemplo, generalmente la sacarificación enzimática se realiza a temperaturas cercanas a los 50 °C, mientras que la fermentación es llevada a cabo en un intervalo entre 30-37 °C (Alfani *et al.*, 2002).

#### *1.4.3 Proceso consolidado*

Un proceso consolidado de producción de etanol celulósico es aquel donde se lleva a cabo la sacarificación y fermentación de hexosas y pentosas de manera simultánea sin la necesidad de agregar enzimas exógenas. Para lograr esto, se requiere el uso de microorganismos etanologénicos que además posean la capacidad de hidrolizar residuos lignocelulósicos para disminuir el costo de la adición de las enzimas. Lo anterior puede ser llevado a cabo por la clonación de una o más enzimas celolíticas dentro del organismo productor de etanol haciendo uso de la ingeniería genética, reduciendo así la cantidad y variedad de enzimas requeridas en el proceso de sacarificación

Uno de los microorganismos de mayor interés industrial y biotecnológico para la obtención de etanol es *Saccharomyces cerevisiae* debido a que es una levadura inocua y con altas capacidades etanologénicas. Además de ser un buen productor de etanol, posee alta tolerancia a éste por lo que es ampliamente utilizado en la industria de fermentaciones. Derivado de esto, constantemente surgen nuevos estudios con el objetivo de mejorar y/o añadir capacidades fermentativas de este microorganismo dando origen a diversas cepas.

#### **1.5 *Saccharomyces cerevisiae* RP2-BGL**

*Saccharomyces cerevisiae* es reconocida por ser una levadura etanologénica con buenos rendimientos y tolerancia a la inhibición por sustrato y producto. Sin embargo, no posee la capacidad de asimilar residuos lignocelulósicos ni celooligosacáridos como la celobiosa. Derivado de esto recientemente en el grupo de trabajo se desarrolló una cepa de *S. cerevisiae* con la capacidad de expresar la

$\beta$ -glucosidasa proveniente de *C. flavigena* PR-22 mediante la optimización e inserción del gen *bglA*. La optimización de codones permite mejorar los niveles de expresión y actividad de proteínas heterólogas. Esta cepa se denominó *S. cerevisiae* RP2-BGL y mostró tener actividad volumétrica ( $155 \text{ UI L}^{-1}$ ) y específica ( $222 \text{ UI g}^{-1}$ ) de  $\beta$ -glucosidasa comparables con las obtenidas por *C. flavigena* PR-22. Esto le confiere la capacidad de asimilar y fermentar celooligosacáridos como la celobiosa en una sola etapa (Rios-Franquez *et al.*, 2017).

El rendimiento reportado por Rios-Franquez *et al.* (2017) para *S. cerevisiae* RP2-BGL para la producción de etanol fue de  $0.41 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{celobiosa}}^{-1}$ ; el cual equivale al 76% del rendimiento teórico, obteniendo una concentración de  $5 \text{ g L}^{-1}$  de etanol al término de 96 h de cultivo. Estos resultados fueron mayores que los reportados por Van Rooyen *et al.* (2005) y Yang *et al.* (2013). Sin embargo, la productividad volumétrica se debe de mejorar para poder llevar a cabo este proceso de obtención de etanol a partir de celobiosa o de residuos lignocelulósicos mediante la implementación de procesos SimSF.

Derivado de esto es que es necesario estandarizar las condiciones operativas con el objetivo de mejorar los rendimientos y productividades del proceso.

## **2.-Justificación**

Las tendencias globales respecto a la producción de energías alternas a los combustibles fósiles van en incremento, especialmente aquellas que involucran biocombustibles líquidos como el bioetanol. Derivado de esto han surgido tecnologías para la obtención de este compuesto a partir de materia lignocelulósica como los procesos SSF; sin embargo, es necesario mejorar los rendimientos y productividades de este tipo de procesos para llevar a cabo su aplicación en escalas mayores.

Por esta razón es conveniente llevar a cabo la estandarización de las condiciones operativas del proceso de obtención de etanol a partir de celobiosa por *S. cerevisiae* RP2-BGL para incrementar el rendimiento y la productividad de este.

### **3.-Hipótesis**

La estandarización de los parámetros operativos en el proceso de obtención de etanol a partir de celobiosa por *S. cerevisiae* RP2-BGL permitirá obtener mejores rendimientos y productividades finales del producto.

## 4.-Objetivos

### *General*

Establecer las condiciones del proceso de fermentación de sacarificados de bagazo de caña con *Saccharomyces cerevisiae* RP2-BGL

### *Específicos*

- Determinar los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* RP2-BGL en las condiciones reportadas previamente para la producción de etanol
- Estandarizar las condiciones de operación para la obtención de etanol a partir de celobiosa
- Establecer el régimen de operación para el proceso de obtención de etanol a partir de celobiosa
- Implementar un proceso de SimSF a partir de bagazo de caña utilizando celulasas y *S. cerevisiae* RP2-BGL

## **5.- Estrategia experimental**

### **Etapas 1**

1.1 Determinación de parámetros de operación significantes

### **Etapas 2**

2.1 Estandarización de las condiciones de operación

2.2 Validación de las condiciones de operación

### **Etapas 3**

3.1 Determinación de un modelo cinético

3.2 Evaluación del régimen de operación en lote alimentado

3.2.1 Evaluación de alimentación lineal

3.2.2 Evaluación de alimentación exponencial

### **Etapas 4**

4.1 Tratamiento y caracterización química del bagazo de caña

4.2 Evaluación de cócteles enzimáticos ricos en celulasas

4.3 Establecimiento de un proceso SimSF

## **6.- Materiales y Métodos**

### **6.1 *Microorganismos y medio de cultivo***

*Saccharomyces cerevisiae* RP2-BGL se reactivó partiendo de un cultivo conservado en glicerol. Las células se cultivaron a 30 °C, 200 rpm durante 24 h, en medio SD líquido (Ríos-Franquez *et al.*, 2017) con la siguiente composición (g L<sup>-1</sup>): extracto de levadura libre de aminoácidos 6.68, glucosa 2 y dropout mix libre de uracilo al 0.1 % disuelto en agua destilada.

*Cellulomonas flavigena* PR-22 se creció a 37 °C, 200 rpm en medio mineral (Ponce-Noyola & de la Torre, 1993) con la siguiente composición (g L<sup>-1</sup>): NaCl 5.5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5; PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> 3.5; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1; CaCl<sub>2</sub> 0.1, todo disuelto en agua de la llave adicionado con 0.02 % de extracto de levadura y como fuente de carbono bagazo de caña (BC) al 1% (p/v) pretratado alcalinamente (de la Torre & Casas-Campillo, 1984). Los cultivos se inocularon con una relación 10% (v/v)

### **6.2 *Preparación de Inóculo de S. cerevisiae RP2-BGL***

Todos los inóculos utilizados se cultivaron a 30 °C, 200 rpm durante 8 h bajo condiciones aerobias en medio YPC con la siguiente composición: extracto de levadura 1%, peptona de caseína 2% y celobiosa al 1% como fuente de carbono. Los cultivos se inocularon partiendo de una colonia tomada de placa.

### **6.3 *Fermentación control con S. cerevisiae RP2-BGL***

El crecimiento de *S. cerevisiae* RP2-BGL y la producción de etanol se realizó en frascos serológicos de 25 mL conteniendo 23 mL de medio YPC cultivados a 30 °C sin agitación para favorecer las condiciones microaerofilicas (Rios-Franquez *et al.*, 2017). Se inoculó el cultivo con una concentración inicial de biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, se evaluó el consumo de azúcares y producción de etanol durante 48 h, tomando muestra cada 3 h y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis posterior.

## **6.4 Estandarización de las condiciones de operación**

### **6.4.1 Análisis de factores preliminares**

Se analizó si la temperatura y el pH inicial tenían un impacto sobre la producción de etanol, esto se llevó a cabo en frascos serológicos de 25 mL conteniendo 23 mL de medio YPC. Se inoculó el cultivo a concentración inicial de biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>. Se evaluaron diferentes temperaturas (28, 30 y 32 °C) y pH inicial (5.5, 6 y 6.5). Se monitoreó el consumo de azúcares y producción de etanol durante 48 h, tomando muestra cada 12 h a partir de las 24 h de incubación y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis posterior.

### **6.4.2 Análisis de superficie de respuesta**

Se evaluó el impacto de la agitación, inóculo y concentración de sustrato sobre la producción de etanol por *S. cerevisiae* RP2-BGL. Se realizó mediante un diseño central compuesto con puntos estrella 2<sup>3</sup>. Las fermentaciones se llevaron a cabo en frascos serológicos de 25 mL conteniendo 23 mL de medio YPC, se cultivaron a 32 °C. Se evaluó el consumo de azúcares y producción de etanol durante 48 h, tomando muestra cada 12 h a partir de las 24 h de incubación y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis posterior.

### **6.4.3 Validación de la superficie de respuesta**

En la etapa de validación se utilizaron reactores de mesa de 0.5 L (Applikon®) con un volumen de operación de 0.4 L y agitación de 100 rpm. El cultivo se realizó en medio YPC (2.6% celobiosa), inoculando con 1.2 g L<sup>-1</sup> de biomasa. Se hizo pasar nitrógeno comercial durante 5 min para desplazar el oxígeno y favorecer condiciones de anaerobiosis. Se monitoreó la fermentación tomando muestra cada 3 h durante 48 h las cuales se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis. A cada muestra se le determinó azúcares, biomasa y etanol.

## **6.5 Construcción del modelo matemático**

La construcción del modelo se llevó a cabo con el uso del software Model Maker® 3.0.3, haciendo uso del método de optimización simplex mediante la integración Bulrich-Stoer. Se ajustaron los valores obtenidos de manera experimental.

### **6.6 Determinación del régimen de operación**

La evaluación del régimen de operación se llevó a cabo en reactores de mesa de 0.5 L (Applikon®) con un volumen de operación de 0.4 L, con agitación variable a 32 °C. El cultivo se realizó en medio YPC, inoculando con 1.2 g L<sup>-1</sup> de biomasa, se hizo pasar nitrógeno comercial durante 5 min para desplazar el oxígeno y favorecer condiciones de anaerobiosis. Se monitoreó la fermentación tomando muestra cada 3 h durante 62 h y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis. A cada muestra se le determinó azúcares, biomasa y etanol.

### **6.7 Sacarificación enzimática de bagazo de caña**

El ensayo de sacarificación enzimática se realizó en matraces Erlenmeyer de 25 mL. Se pesaron 0.2 g de BC y se les añadió 9 mL de regulador de citratos 100 mM pH=6. Se esterilizó durante 15 min a 121°C y 15 psi. Posteriormente se le añadió la solución de cóctel enzimático. Se incubó durante 15 h a 35 °C y 300 rpm.

### **6.8 Sacarificación y fermentación simultánea (SimSF)**

El proceso se llevó a cabo en reactores de mesa Applikon® de 0.5 L con un volumen de operación de 0.3 L. Se utilizó BC pretratado enriquecido con extracto de levadura al 0.2% como única fuente de carbono. Se inoculó con un cultivo fresco de *S. cerevisiae* RP2-BGL, se incubó a 35 °C, en condiciones anaerobias y 300 rpm durante 72 h. Se tomó muestra cada 6 h y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis. A cada muestra se le determinó etanol, azúcares y crecimiento.

### **6.9 Determinación de crecimiento celular**

El crecimiento celular fue cuantificado por dos maneras:

#### **6.9.1 Densidad óptica**

Para *S. cerevisiae* RP2-BGL se cuantificó de manera espectrofotométrica, midiendo la densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm. La absorbancia obtenida se extrapola a una curva estándar de peso seco (g L<sup>-1</sup> de biomasa):

$$\text{Biomasa (gL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Abs} - 1441}{2.7133}$$

#### 6.9.2 Proteína celular

Para *C. flavigena* y *S. cerevisiae* (en el proceso SimSF) se cuantificó la proteína celular, determinada por el método de Lowry (1951), modificado por Herbert (1971). La determinación se realizó con 50 µL de la suspensión obtenida de lavar el botón celular de 1 mL de cultivo de *C. flavigena* o *S. cerevisiae*, resuspendido en el mismo volumen de agua destilada estéril (1 mL).

### 6.10. Pretratamiento del bagazo de caña

El pretratamiento alcalino del BC se llevó a cabo con hidróxido de sodio (NaOH) al 1.5 %, a una relación de 100 g de BC seco y molido por cada litro de solución de NaOH. El tratamiento se llevó a cabo en una olla de peltre dentro del autoclave por 30 min, 121 °C y 15 psi. El bagazo pretratado se lavó con agua de la llave hasta alcanzar un pH cercano al neutro (7), se secó a temperatura ambiente y se molió mecánicamente para disminuir el tamaño de partícula y favorecer su sacarificación.

### 6.11 Caracterización del bagazo de caña pretratado

La caracterización del bagazo pretratado se realizó determinando la composición porcentual (glucano, xilano, lignina, humedad y cenizas) contra un control de BC crudo.

#### 6.11.1 Determinación de celulosa

La determinación de celulosa se realizó pesando 0.2 g de BC en un tubo de rosca. Se adicionó 3 mL de mezcla HNO<sub>3</sub>/Ac. Acético adicionando primeramente 1 mL, se homogeneiza y se añaden los 2 mL restantes. Se colocaron los tubos en baño

María durante 30 min. Posteriormente se filtró en un filtro de vidrio poro C arrastrando todo el material en el tubo con ayuda de agua destilada para posteriormente removerla con vacío. Se adicionó 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 67 % (v/v) y se dejó reposar sin succionar durante 1 h. Posteriormente se determinaron azúcares totales por el método de Dubois (1956).

#### 6.11.2 Determinación de holocelulosa

La determinación de holocelulosa se realizó removiendo la lignina de la muestra mediante cloración. En un filtro de vidrio poro C a peso constante (Peso V) se depositaron 0.3 g de muestra de BC (Peso M) seco y molido. La muestra se dejó clorar toda la noche con hipoclorito de sodio comercial (NaClO) al 5 % (v/v). El NaClO se removió por filtración y se añadió etanol al 95 %. Después de un minuto se removió por succión y se lavó con agua destilada fría. Se añadió a las muestras solución alcohol-monoetanolamina a 75 °C hasta cubrir la materia completamente, se agitó y se dejó en reposo por 2 min, para después eliminarla por succión. Se eliminó cualquier rastro del solvente lavando con alcohol y agua destilada fría. Las muestras se secaron a 80 °C por 12 h y se pesaron los filtros con muestra (Peso S).

$$\text{Holocelulosa (\%)} = \frac{\text{Peso S} - \text{Peso V}}{\text{Peso M}} * 100$$

#### 6.11.3 Determinación de hemicelulosa

La hemicelulosa fue determinada mediante la sustracción del contenido de glucano al contenido de holocelulosa.

#### 6.11.4 Determinación de lignina

La lignina se determinó digiriendo todo el material celulósico de la muestra con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y calor. Se pesaron 0.200 g de una muestra de BC (Peso M) seco y molido, se colocaron en un tubo de ensaye con rosca al que se le añadieron 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 % frío. La muestra se mantuvo durante una hora en un baño de agua a 30 °C agitando frecuentemente los tubos para asegurar una homogeneización completa de la muestra. La suspensión obtenida se diluyó con 56 mL de agua

destilada y se transfirió el contenido del tubo a un matraz Erlenmeyer de 125 mL para llevar a cabo una hidrólisis secundaria en autoclave, a 121 °C por 1 h. El contenido de cada matraz se filtró en filtros de vidrio de poro C, lavando el residuo con agua destilada hasta remover completamente el ácido. Las muestras se secaron a 80 °C por 4 h (Peso S) y después se secaron a 60 °C hasta alcanzar peso constante (Peso C).

$$\text{Lignina (\%)} = \frac{\text{Peso S} - \text{Peso C}}{\text{Peso M}} * 100$$

#### 6.11.5 Humedad y Cenizas

Para determinar el contenido de humedad y cenizas de las muestras se pesaron 0.5 g de muestra (Peso M) en una cápsula de porcelana llevada a peso constante (Peso V), se colocó posteriormente dentro de un horno a 80 °C por 12 h para llevar a sequedad y se registró el peso (Peso S). La muestra se calcinó a 550 °C por 2 h en una mufla y se registró el peso de las cápsulas de porcelana a temperatura ambiente (Peso C).

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{[(\text{Peso M} + \text{Peso V}) - (\text{Peso S})]}{\text{Peso M}} * 100$$

$$\text{Ceniza base seca (\%)} = \frac{\text{Peso C} - \text{Peso V}}{\text{Peso S} - \text{Peso V}} * 100$$

#### 6.12 Determinación de la actividad de $\beta$ -glucosidasa

La actividad de la  $\beta$ -glucosidasa se cuantificó midiendo espectrofotométricamente la liberación de  $p$ -nitrofenol (pNP) mediante la hidrólisis de  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG).

El extracto enzimático (100  $\mu$ L) se mezcla con 1 mL de pNPG 1 mM en regulador de fosfatos 25 mM pH 6.2. Se incuba la mezcla a 40 °C durante 15 min deteniendo la reacción con la adición de 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M (modificado de Kim & Pack, 1989). La Abs se lee a 405 nm y se calcula la actividad enzimática. Una unidad de

actividad de  $\beta$ -glucosidasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de pNP por minuto bajo las condiciones estándar del ensayo

### **6.13 Determinación de azúcares y etanol**

Los azúcares y el etanol fueron cuantificados por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con una columna Agilent Hi-Plex, un detector de índice de refracción utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM como fase móvil a un flujo de  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$

### **6.14 Herramientas estadísticas**

Para los análisis estadísticos se utilizaron los softwares Design Expert X® para el diseño y evaluación de la superficie de respuesta y PASW Statistics 18® para los ANDEVAs y pruebas post-ANDEVA.

## 7. Resultados y Discusión

### Etapa 1

#### 7.1.1 Evaluación de parámetros de operación

Dentro del proceso de obtención de etanol a partir de celobiosa por *S. cerevisiae* RP2-BGL existen diversos parámetros de operación (temperatura, pH, agitación, concentración de sustrato e inóculo) los cuales pueden ser modificados para mejorar el proceso. Para poder llevar a cabo la estandarización de estos parámetros fue necesario determinar el nivel de significancia que tienen sobre el proceso, derivado de esto se realizó una evaluación para determinar el impacto de dos parámetros de operación (Temperatura (°C) y pH).

Se obtuvieron 3 variables de respuesta para determinar si los factores a evaluar tenían una diferencia significativa por si solos en el proceso de producción de etanol a partir de celobiosa. Estas variables fueron: azúcares reductores residuales, concentración de etanol y rendimiento producto-sustrato. Así mismo estas variables se obtuvieron a tres tiempos distintos: 24, 36 y 48 h para poder observar su comportamiento a lo largo del tiempo.

En la **Fig. 2** se observa la concentración de celobiosa residual en forma de azúcares reductores. A pesar de que pareciera que a la vista existe una diferencia entre los tratamientos A y B en la muestra de 24 h que corresponden a pH distintos, el análisis estadístico indica que pertenecen al mismo grupo, de igual manera con los tratamientos C y D. Estos resultados muestran que ni la temperatura ni el pH tienen un efecto significativo sobre el consumo de azúcares.

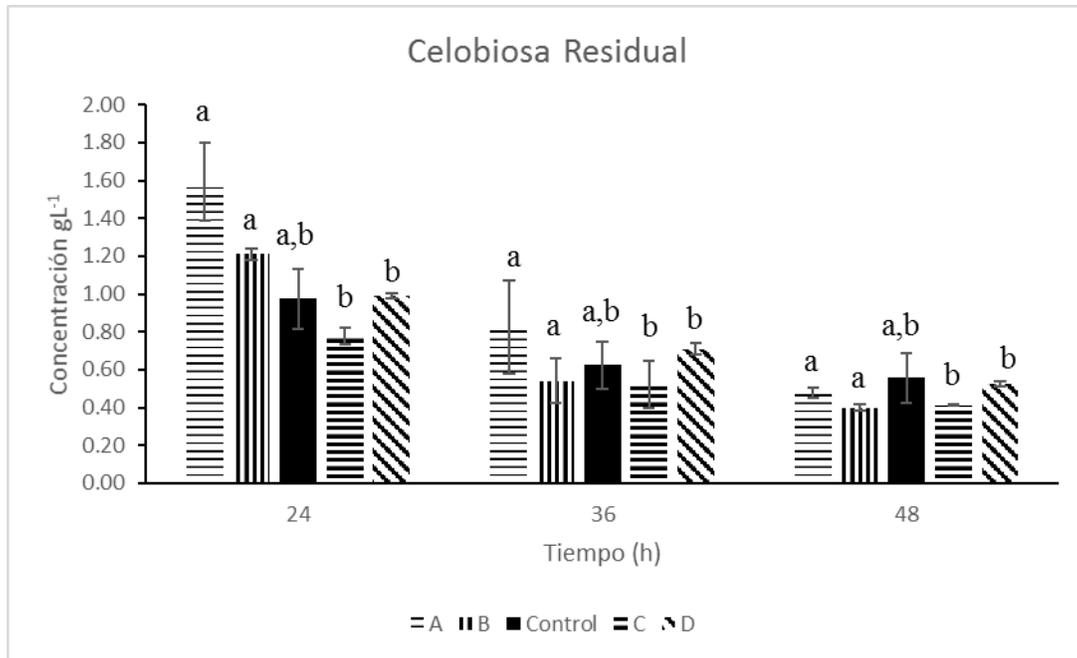


Figura 2. Celobiosa residual a las 24, 36 y 48 horas en el proceso fermentativo de *S. cerevisiae* RP2-BGL en medio YPC bajo las siguientes condiciones: A,B: T= 30 °C, sin agitación, X<sub>o</sub>= 0.5 g/L, S<sub>o</sub>=10 g/L, pH inicial= 5 y 6 respectivamente. C,D: T= 32 °C y 28° C respectivamente, sin agitación, X<sub>o</sub>= 0.5 g/L, S<sub>o</sub>=10 g/L, pH inicial= 6.5. Control: T= 30 °C, sin agitación, X<sub>o</sub>= 0.5 g/L, S<sub>o</sub>=10 g/L, pH inicial= 6.5. Letras y números iguales sobre las barras indican pertenecer al mismo grupo estadístico

En cuanto a la producción de etanol, a diferencia del caso de la celobiosa residual, existe una diferencia que sobrepasa el 10% de nivel de significancia establecido para el análisis estadístico. Sin embargo este comportamiento no se presenta de manera constante a lo largo del tiempo, únicamente es apreciable al término de la fermentación a las 48 h. Así mismo se puede observar que esta diferencia es negativa, puesto que la producción de etanol a las 48 h en el tratamiento D es menor que la que corresponde al tratamiento C y al control por alrededor de 15 y 20% respectivamente (**Fig. 3**).

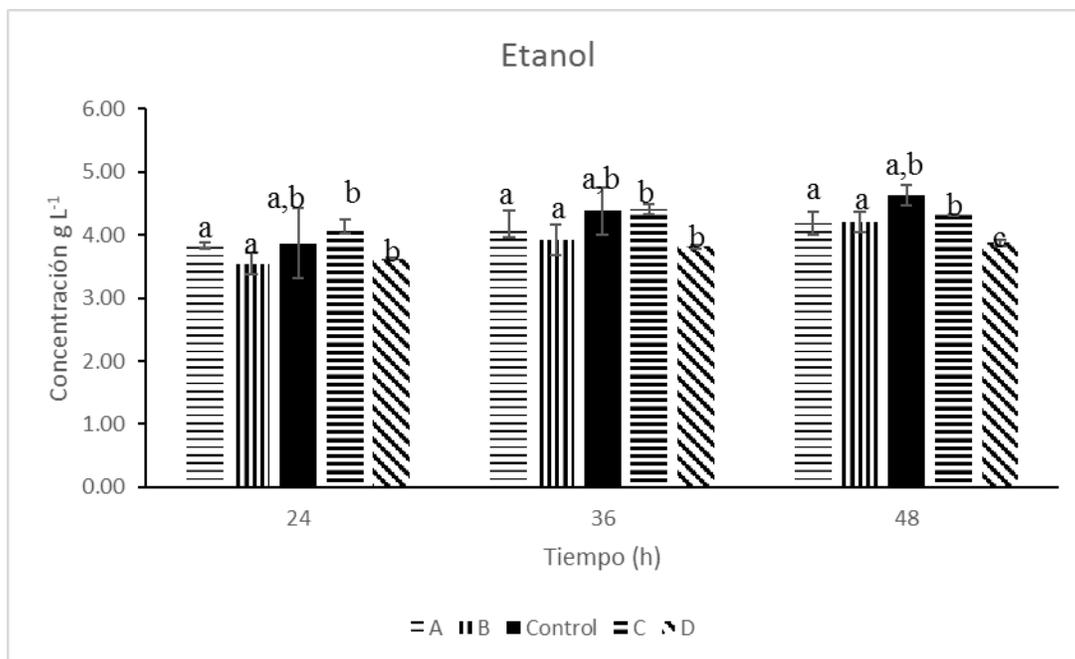


Figura 3 Producción de etanol a las 24, 36 y 48 horas en el proceso fermentativo de *S. cerevisiae* RP2-BGL en medio YPC bajo las siguientes condiciones: A,B: T= 30 °C, sin agitación, X<sub>o</sub>= 0.5 g/L, S<sub>o</sub>=10 g/L, pH inicial= 5 y 6 respectivamente. C,D: T= 32 °C y 28° C respectivamente, sin agitación, X<sub>o</sub>= 0.5 g/L, S<sub>o</sub>=10 g/L, pH inicial= 6.5. Control: T= 30 °C, sin agitación, X<sub>o</sub>= 0.5 g/L, S<sub>o</sub>=10 g/L, pH inicial= 6.5. Letras y números iguales sobre las barras indican pertenecer al mismo grupo estadístico

Un punto a destacar es que en el tratamiento C se alcanzó la mayor concentración de etanol (4.40 g L<sup>-1</sup>) a las 36 h, a diferencia del tratamiento control que lo obtuvo hasta las 48 h. Esto indica que un incremento en la temperatura acelera la producción de etanol, más no tiene un impacto sobre la concentración final (**Fig. 3**).

Derivado de los resultados representados en las **Figuras 2 y 3** se obtuvieron los datos de la **Figura 4** los cuales corresponden al rendimiento del proceso, es decir la cantidad de etanol que se produce por celobiosa consumida. Al igual que en el caso de la producción de etanol, el tratamiento D resultó estar dentro de un grupo estadístico distinto. Sin embargo en esta ocasión se dio a las 36 h de la fermentación, ya que a las 48 h todos los tratamientos se encontraban dentro del mismo grupo. Nuevamente la diferencia de grupos resultó ser negativa, ya que el rendimiento de ese tratamiento fue menor que los demás. Estos resultados indican que un descenso en la temperatura del proceso fermentativo conlleva a

consecuencias negativas como rendimientos y concentraciones finales menores de etanol.

El factor pH, representado por los factores A y B no generaron un impacto estadísticamente significativo en ninguna de las variables medidas, por otra parte, el nivel bajo de la temperatura representado por el factor D generó resultados negativos en el proceso. Por el otro lado, un incremento en la temperatura no tuvo efecto significativo en el proceso, sin embargo se observó una reducción en el tiempo en el cual se alcanzó la concentración máxima de etanol.

Derivado de estas observaciones se determinó que los factores de temperatura y pH no representaron efectos significativos sobre el proceso, por lo cual no fueron tomados en cuenta en la etapa de estandarización. Dado que el incremento en la temperatura aceleró el proceso fermentativo, se decidió utilizar el nivel alto como nivel fijo para la etapa de superficie de respuesta.

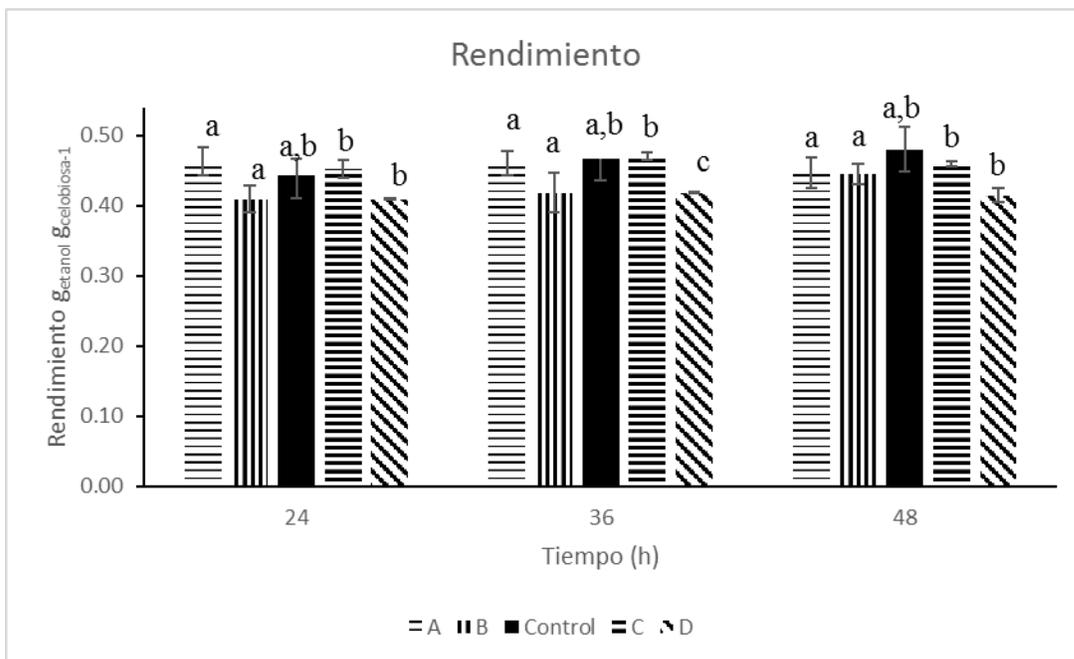


Figura 4 Rendimiento producto-sustrato a las 24, 36 y 48 horas en el proceso fermentativo de *S. cerevisiae* RP2-BGL en medio YPC bajo las siguientes condiciones: A,B: T= 30 °C, sin agitación, X<sub>0</sub>= 0.5 g/L, S<sub>0</sub>=10 g/L, pH inicial= 5 y 6 respectivamente. C,D: T= 32 °C y 28° C respectivamente, sin agitación, X<sub>0</sub>= 0.5 g/L, S<sub>0</sub>=10 g/L, pH inicial= 6.5. Control: T= 30 °C, sin agitación, X<sub>0</sub>= 0.5 g/L, S<sub>0</sub>=10 g/L, pH inicial= 6.5. (Letras y números iguales sobre las barras indican pertenecer al mismo grupo estadístico)

## **Etapa 2**

### **7.2.1 Estandarización de las condiciones de operación**

Una vez que se determinó que ni la temperatura ni el pH son variables significativas en el proceso de producción de etanol, se realizó un diseño central compuesto conteniendo tres parámetros operacionales (concentración de celobiosa inicial, agitación, concentración del inóculo) para desarrollar una superficie de respuesta y estandarizar los valores de estos parámetros.

El diseño experimental utilizado se representa con los valores reales en la **Tabla 1**.

Las fermentaciones se realizaron utilizando medio YPC como medio de cultivo, la temperatura utilizada fue de 32°C como se mencionó en la sección anterior y el pH de 6.5. Todo se llevó a cabo en frascos serológicos para asegurar las condiciones de anaerobiosis o microaerofílicas y tuvo una duración de 42 h.

Tabla 1 Diseño experimental en variables naturales para la estandarización de las condiciones de operación del proceso de obtención de etanol a partir de celobiosa por *S. cerevisiae* RP2-BGL

<b>Corrida</b>	<b>Agitación (rpm)</b>	<b>Celobiosa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Inóculo (g L<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	100	40	0.5
<b>2</b>	50	25	0.75
<b>3</b>	0	10	1
<b>4</b>	100	10	1
<b>5</b>	0	10	0.5
<b>6</b>	50	25	0.33
<b>7</b>	50	25	1.17
<b>8</b>	50	25	0.75
<b>9</b>	50	50	0.75
<b>10</b>	0	40	0.5
<b>11</b>	100	40	1
<b>12</b>	50	0	0.75

<b>13</b>	0	40	1
<b>14</b>	100	10	0.5
<b>15</b>	0	25	0.75

Se consideraron las mismas tres variables de respuesta que en la sección anterior (celobiosa residual, producción de etanol y rendimiento). Estas variables son las que se buscó maximizar o minimizar según el caso necesario. Los valores obtenidos se concentran en la **Tabla 2**. La máxima concentración de etanol alcanzada ( $15.30 \text{ g L}^{-1}$ ) corresponde con la corrida (9) con mayor concentración de celobiosa inicial ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ). Sin embargo, en esa misma corrida al término de la fermentación se obtuvo una concentración de celobiosa residual de  $18.04 \text{ g L}^{-1}$  la cual corresponde al 36% de lo suministrado.

El análisis estadístico para la optimización de los parámetros de operación se realizó mediante análisis de varianza para cada una de las variables previamente mencionadas con ayuda del software *Design Expert X®*.

Tabla 2. Celobiosa residual, etanol y rendimiento del proceso de obtención de etanol a partir de celobiosa por *S. cerevisiae* RP2-BGL evaluado bajo condiciones establecidas mediante un diseño de superficie de respuesta

<b>Corrida</b>	<b>Celobiosa residual (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Etanol (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Rendimiento (<math>\text{g}_{\text{EtOH}} \text{g}_{\text{Celobiosa}}^{-1}</math>)</b>
<b>1</b>	16.7810	9.9492	0.3898
<b>2</b>	2.6156	10.9643	0.4898
<b>3</b>	0.6809	4.7949	0.5145
<b>4</b>	0.0264	4.9387	0.4952
<b>5</b>	0.3979	4.7924	0.4991
<b>6</b>	9.8052	6.8734	0.4524
<b>7</b>	2.3724	11.5644	0.5111

<b>8</b>	2.9754	10.8653	0.4933
<b>9</b>	18.0457	15.3014	0.4789
<b>10</b>	21.6925	7.6121	0.4158
<b>11</b>	12.1009	10.8737	0.3898
<b>12</b>	0.000	0.000	0.000
<b>13</b>	13.2895	9.7807	0.3662
<b>14</b>	0.4906	4.7224	0.4966
<b>15</b>	2.6156	10.7411	0.4966

(Los valores reportados son promedios de 2 mediciones)

Para el caso de la celobiosa residual se determinó un modelo cuadrático que describe el comportamiento de los datos con coeficiente de determinación  $R$  de 0.92 (**Anexo 1**). Dentro de este modelo únicamente resultaron factores significantes la concentración de celobiosa, concentración de inóculo, sus respectivos coeficientes cuadráticos y la interacción entre la concentración de celobiosa e inóculo. Esto encuentra una posible explicación a fenómenos inhibitorios a causa de la concentración de sustrato y la baja concentración de biomasa.

Así mismo, el modelo se ajusta de manera adecuada a los datos y su ecuación **[1]** es favorable para la navegación dentro del espacio establecido en el diseño experimental, es decir en el intervalo de concentraciones evaluadas. Dentro de esta ecuación se observa que los coeficientes pertenecientes a la agitación son valores bajos por los que pueden ser despreciables.

$$\text{Celobiosa residual} = 11.66 - 0.03A + 0.23B - 37C - 9.2E^{-4}AB + 0.03AC - 0.43BC + 2.17E^{-4}A^2 + 0.011B^2 + 25.81C^2$$

**[1]**

Donde:

A= Agitación

B= Celobiosa

C=Inóculo

Para el caso de la concentración final de etanol, el ANOVA (**Anexo 2**) determinó de igual manera un ajuste de modelo cuadrático debido a los posibles alias en los términos cúbicos. El valor del estadígrafo p- del modelo es <0.0001. Dentro de esta evaluación los factores que resultaron significativos son la concentración de celobiosa, de inóculo y sus respectivos coeficientes cuadráticos, en este caso no existe ninguna interacción significativa. Los resultados señalan que la producción máxima de etanol está asociada a la cantidad de celobiosa disponible en el medio y la biomasa que la procesa, por lo tanto es lógico que estos dos factores sean los que poseen un mayor impacto en esta variable evaluada. El valor de  $R$  fue de 0.77 el cual es un valor bajo, sin embargo, aceptable para poder continuar con el análisis.

El gráfico de superficie 3D (**Fig. 5**) representa la producción de etanol tomando en cuenta la interacción entre la concentración de celobiosa inicial y la concentración de biomasa los cuales resultaron ser los factores significativos. El comportamiento convexo que se observa en el gráfico de superficie está asociado a un máximo local dentro del intervalo evaluado, confirmando de esta manera la eficacia del análisis estadístico realizado. Las concentraciones máximas de etanol alcanzadas en el intervalo evaluado, tomando en cuenta los 3 factores principales se muestran en la **Fig. 6**.

De igual manera la ecuación [2] que describe el comportamiento posee la capacidad de predicción dentro del espacio evaluado:

$$\text{Etanol} = -8.58 + 0.02A + 0.46B + 24.87C + 5.6E^{-4}AB - 0.01A + 0.09BC - 2.92E^{-4}A^2 - 6.81E^{-3}B^2 - 15.65C^2$$

[2]

El ANOVA realizado a la variable de respuesta rendimiento (**Anexo 3**), arrojó como resultado que el modelo cuadrático utilizado es no significativo con un valor p- de 0.2225. Esto indica que existe una probabilidad del 22.25% que el estadígrafo F obtenido se deba meramente al ruido experimental. Dentro de los

factores, únicamente dio como significativo a la interacción cuadrática de la concentración inicial de celobiosa. Esto puede ser a causa de que la obtención de esta variable es una derivada de las dos primeras. Debido a esto es que no se considerará para la etapa de maximización y por ende no se mostrará la ecuación que describe el comportamiento del rendimiento.

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Etanol (g/L)  
15.6749  
0

X1 = B: Celobiosa  
X2 = C: Inoculo

Actual Factor  
A: Agitación = 50

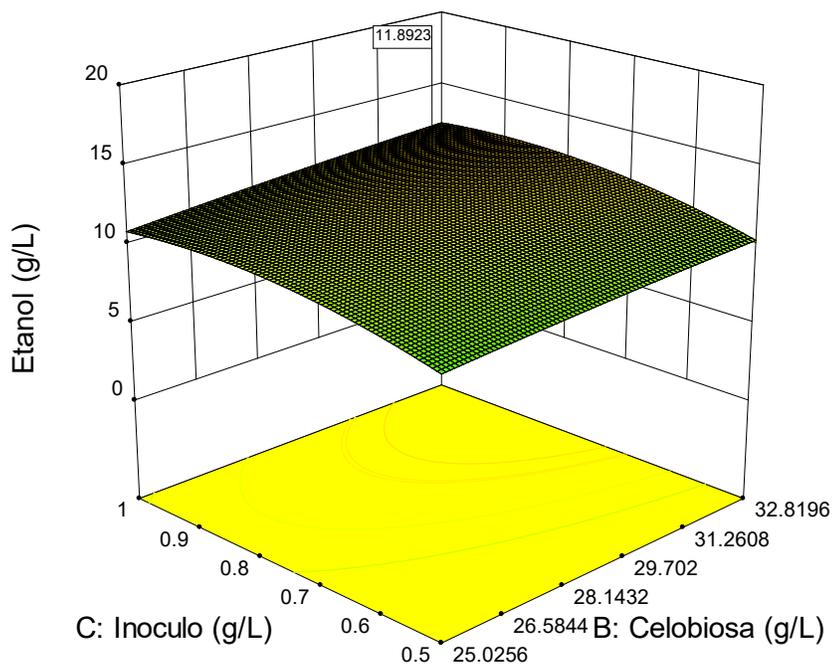


Figura 5 Concentración de etanol tomando en cuenta los factores significativos

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Etanol (g/L)  
 X1 = B: Celobiosa  
 X2 = C: Inoculo  
 X3 = A: Agitación

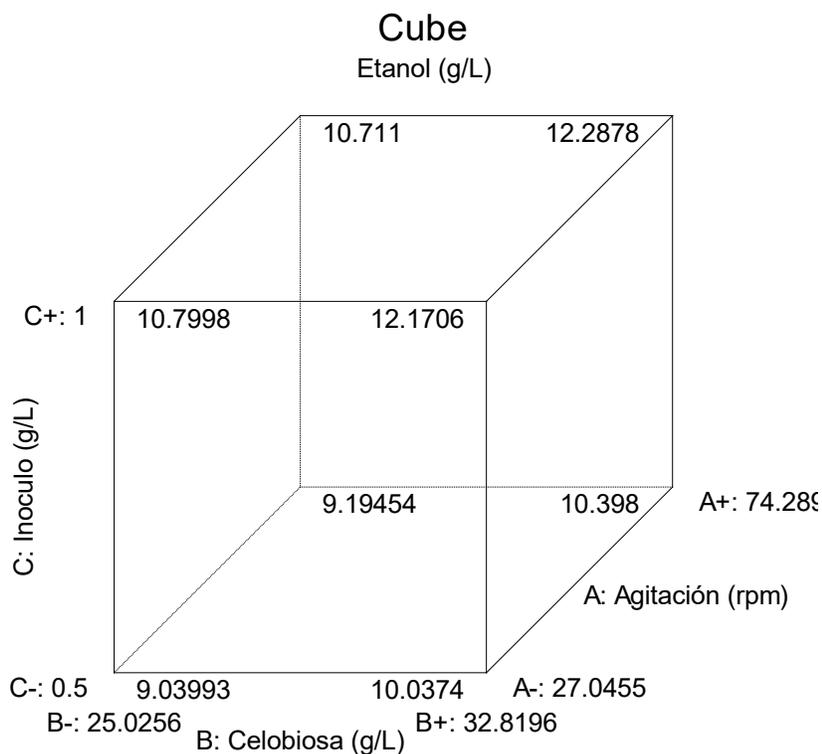


Figura 6 Concentraciones máximas de etanol obtenidas bajo las condiciones evaluadas considerando los factores principales.

Una vez obtenidas las ecuaciones que describen el comportamiento de las variables de respuesta tomando en cuenta los factores evaluados, se estandarizaron utilizando la herramienta de optimización numérica incluida en el paquete estadístico del software Design Expert X®.

Para ello se determinó utilizar las siguientes condicionales:

#### Celobiosa Residual

- Minimizar
- Intervalo 0-10 g L<sup>-1</sup>
- Relevancia: 4

#### Etanol

- Maximizar
- Intervalo: 0-20 g L<sup>-1</sup>
- Relevancia:5

## Rendimiento

Debido a la falta de ajuste y significancia mencionado anteriormente, no será considerado para este proceso.

Con base en estos parámetros las condiciones óptimas que arrojó el software fueron las siguientes:

- Agitación: 60 rpm
- Celobiosa inicial: 27 g L<sup>-1</sup>
- Inóculo: 1.2 g L<sup>-1</sup>

Dando como resultado las siguientes estimaciones (**Fig. 7**):

- Celobiosa residual: 3.31 g L<sup>-1</sup>
- Etanol: 10.65 g L<sup>-1</sup>
- Rendimiento: 0.495

Validez: 75% de las condiciones establecidas para la optimización

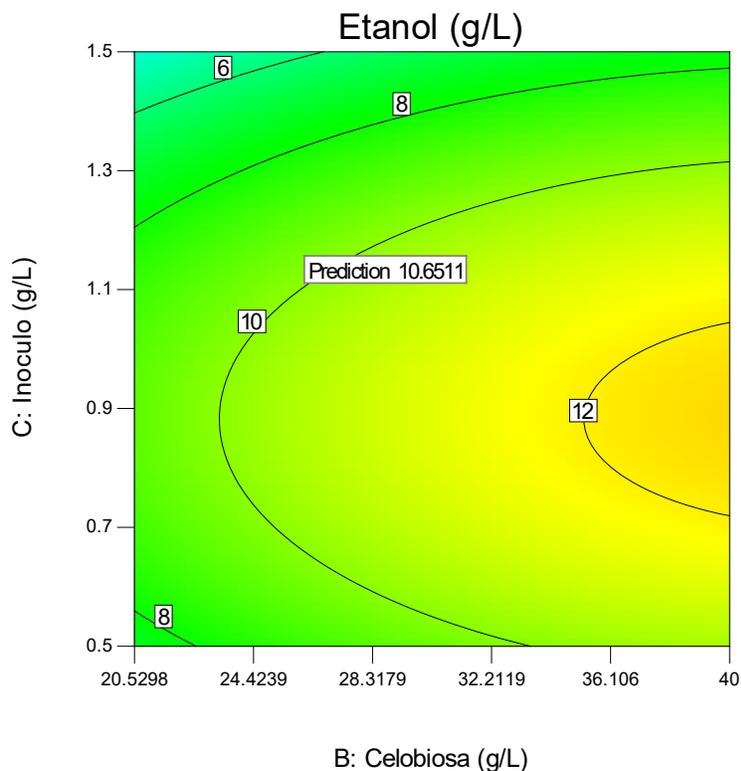


Figura 7 Gráfica de contorno para la predicción de la concentración final de etanol usando el algoritmo de optimización numérica (Design Expert X®)

### 7.2.2 Validación de las condiciones de operación

Se realizaron fermentaciones bajo las condiciones obtenidas mediante el modelo de superficie de respuesta para llevar a cabo la validación de éstas ( $S_0= 27 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0=1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $T= 32^\circ\text{C}$ ,  $\text{Agitación}= 60 \text{ rpm}$ ,  $\text{pH}_0= 6$ ). Así mismo con base en el análisis estadístico de la variable agitación y debido a su bajo nivel de impacto en el proceso, se realizó una fermentación eliminando esta variable para determinar si existía diferencia significativa en el proceso. En la **Fig. 8** se observa el comportamiento de los diferentes parámetros de la fermentación bajo las condiciones determinadas previamente. Al término de las 48 h se obtuvo un consumo del 99% de la celobiosa inicial, así como una concentración final de  $12.54 \text{ g L}^{-1}$  de etanol,  $3.43 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa y un rendimiento de  $0.49 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{celobiosa}}^{-1}$ . Sin embargo, a las 30 h hubo un consumo del 98% de la celobiosa y concentraciones de etanol y biomasa de  $12.1 \text{ g L}^{-1}$  y  $3.36 \text{ g L}^{-1}$  respectivamente además de un rendimiento de  $0.48 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{celobiosa}}^{-1}$ . Estas concentraciones no tuvieron diferencia significativa comparadas con las obtenidas a las 48 h del proceso, lo cual es un indicativo de que el tiempo del proceso fermentativo se puede reducir a 30 h, aumentando de esta manera la productividad.

Cuando se llevó a cabo el proceso fermentativo en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero sin agitación, a las 48 h se obtuvo un consumo máximo del 96% de los azúcares,  $12.6 \text{ gL}^{-1}$  de etanol,  $3.1 \text{ gL}^{-1}$  de biomasa y un rendimiento de  $0.50 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{celobiosa}}^{-1}$ ; así mismo a las 36 h del proceso existió un consumo del 95% de los azúcares,  $12.4 \text{ gL}^{-1}$  de etanol y un rendimiento de  $0.50 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{celobiosa}}^{-1}$  (**Fig. 9**). Estos valores comparados con los obtenidos bajo las primeras condiciones no presentan diferencia significativa respecto a la producción de etanol, sin embargo, sí impacta en el consumo de celobiosa y tiempo del proceso como se puede observar en la **Fig. 10**. Esto se puede apreciar a las 24 h donde fue menor el consumo de celobiosa y producción de etanol bajo las condiciones sin agitar. Derivado de esto, el tiempo del proceso sugerido es de 36 h, ya que a ese tiempo no existe diferencia entre ambas condiciones, así mismo se sugiere no agitar el reactor lo que genera un ahorro en el consumo de energía.

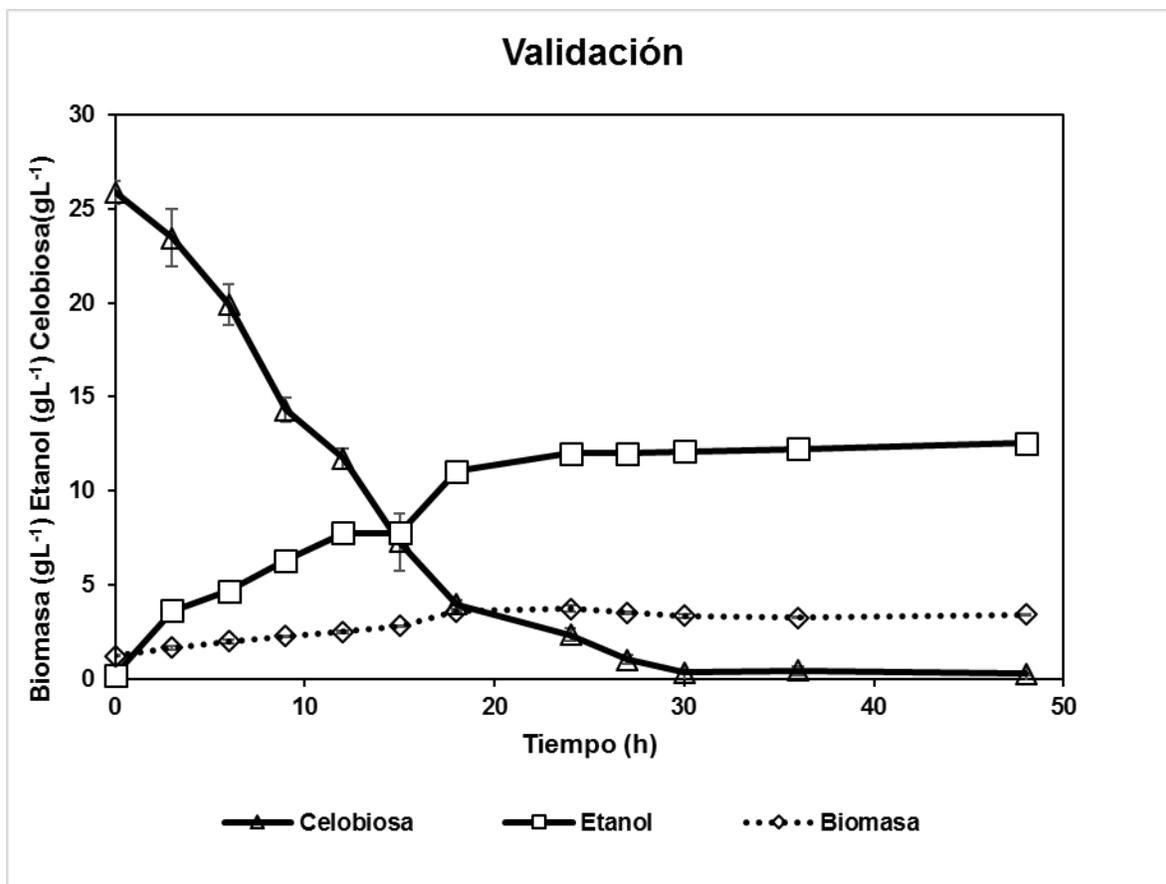


Figura 8 Fermentación de etanol a partir de celobiosa por *S. cerevisiae* RP2-BGL bajo las condiciones estandarizadas mediante el modelo de superficie de respuesta. ( $S_0=27 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$ , Agitación = 60 rpm,  $T= 32 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}_0 = 6$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones independientes)

Los resultados obtenidos bajo las condiciones estandarizadas (**Fig. 8, Fig. 9**) fueron mejores que los proyectados por el modelo obtenido mediante superficie de respuesta. Se obtuvo 19% más de etanol y 77% menos de celobiosa residual como se observa en la **Fig. 11**, esto se puede deber al cambio de escala, ya que el proceso de estandarización se llevó a cabo en frasco serológico pero la validación de las condiciones se realizó en reactores de 0.5 L, favoreciendo el ambiente para la fermentación de la celobiosa en etanol bajo las condiciones estandarizadas.

La concentración final de etanol ( $12.71 \text{ g L}^{-1}$ ) y rendimiento (.50) obtenidos mediante la estandarización de condiciones operativas representa un incremento del 400% y 20% respectivamente de lo reportado por Ríos-Fránquez (2017) con la

misma cepa y fuente de carbono. A su vez, el rendimiento representa un 93% del teórico reportado.

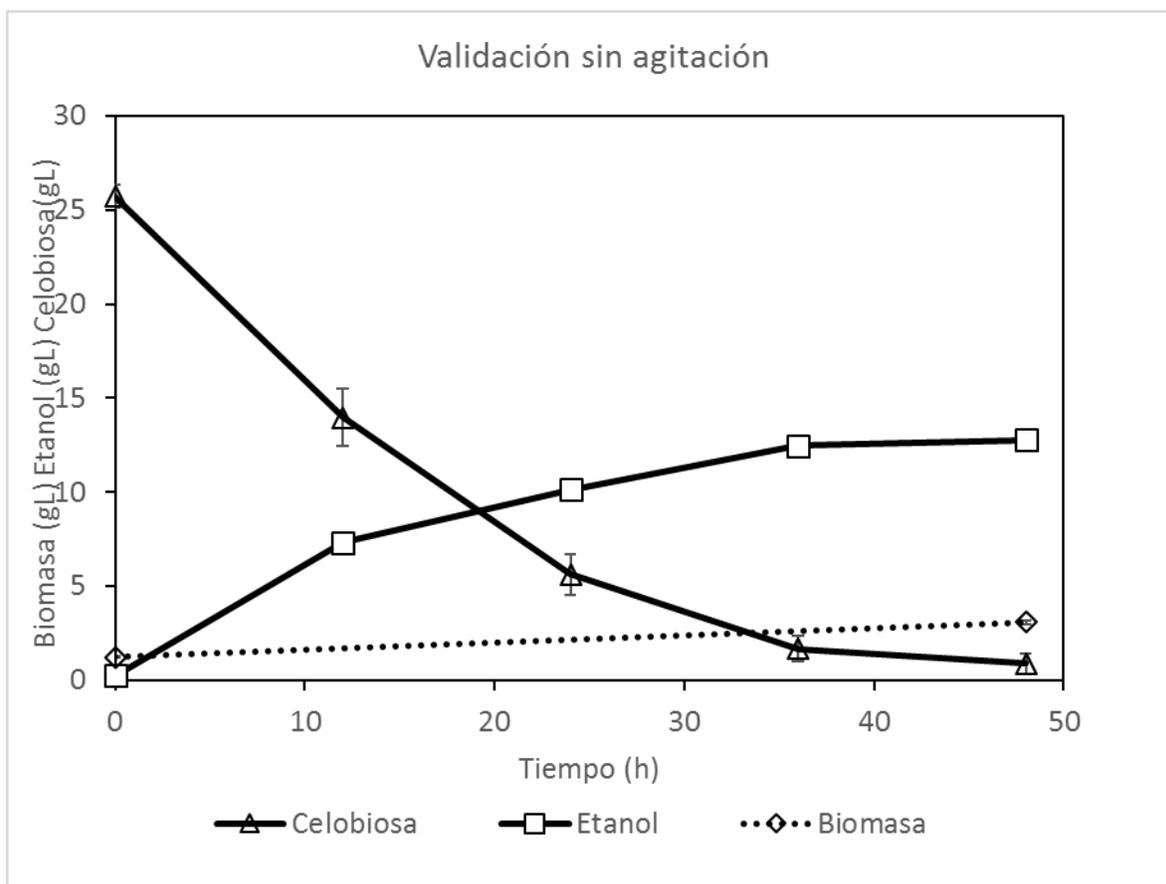


Figura 9 Producción de etanol a partir de celobiososa por *S. cerevisiae* RP2-BGL bajo las condiciones estandarizadas mediante el modelo de superficie de respuesta. ( $S_0=27 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$ , Sin agitación,  $T= 32 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}_0 = 6$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones independientes).

Los resultados aquí obtenidos reafirman lo reportado en la literatura sobre el éxito de la implementación de modelos de superficie de respuesta para la optimización de los procesos.

Iulian-Zoltan *et al.* (2017) realizaron una optimización en dos etapas del proceso de obtención de etanol de segunda generación a partir de hidrolizados de madera suave. Al igual que en el presente trabajo, primero se determinaron las variables que influían directamente sobre el proceso para posteriormente realizar un modelo de superficie de respuesta. Mediante esta optimización, lograron incrementar en un 15% el rendimiento obtenido al término del proceso.

Por otro lado, Tat *et al.* (2009) lograron incrementar a 97.6% del teórico máximo el rendimiento en la obtención de biodiesel a partir de aceite de palma haciendo uso de un modelo obtenido mediante la metodología de superficie de respuesta.

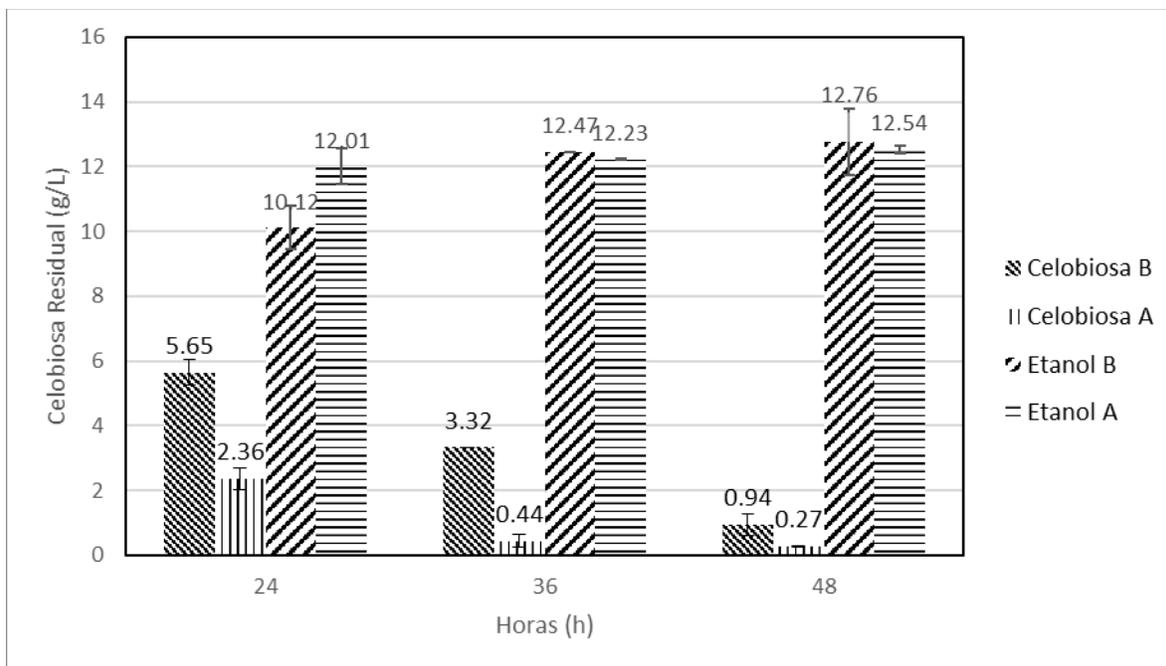


Figura 10 Concentraciones de celobiosa residual y etanol final bajo condiciones estandarizadas mediante el modelo de superficie de respuesta. A: Con agitación B: Sin agitación (Los resultados son promedios de tres mediciones)

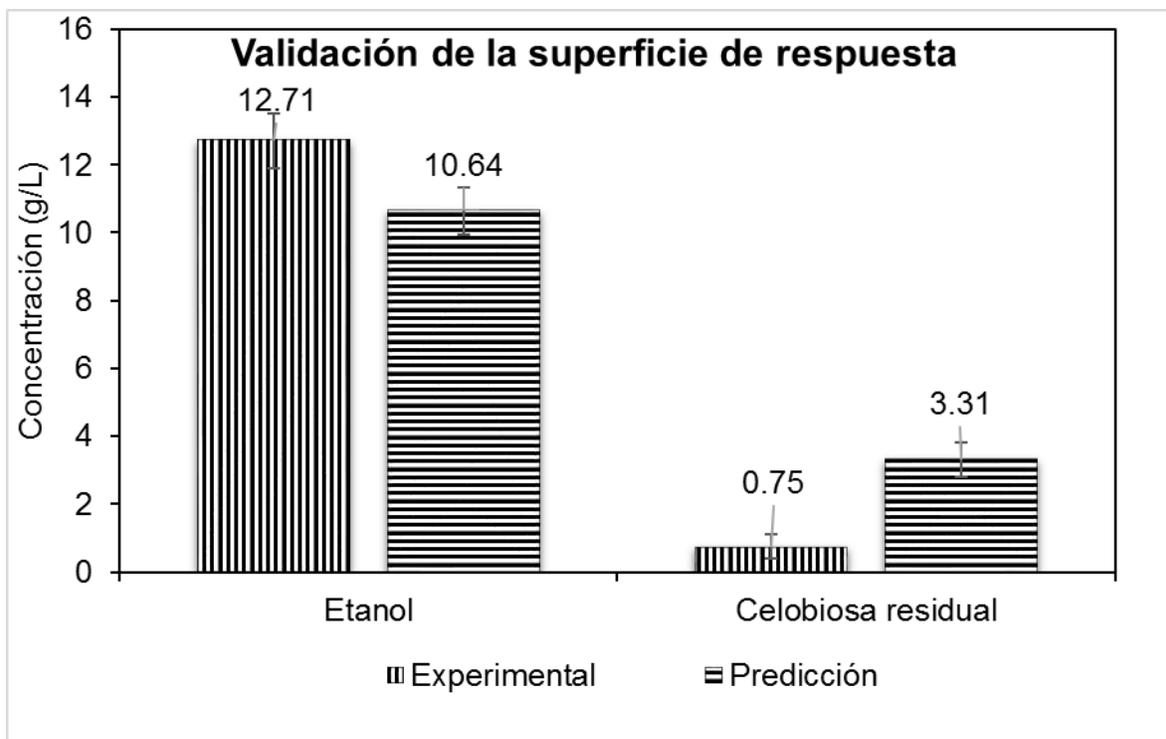


Figura 11 Comparación entre los valores predichos para la concentración final de etanol y celobiosa residual por el modelo de superficie de respuesta y los valores obtenidos experimentalmente.

### Etapa 3

#### 7.3.1 Elaboración de un modelo cinético

El uso de modelos cinéticos predictivos es una herramienta que facilita el monitoreo y diseño de bioprocesos (Imamoglu & Vardar, 2013). Además de que permite mejorar los rendimientos y productividades de diversos procesos. El modelar procesos biológicos representa un reto a comparación de los procesos físicos y químicos ya que, a diferencia de los últimos, el comportamiento de los componentes biológicos presentes en la reacción puede tener un sinfín de interacciones entre sí, dificultando la capacidad predictiva de los modelos (Gutierrez *et al.*, 2005).

Para este trabajo se realizó un modelo tipo Haldane con doble término de inhibición (sustrato y producto) usando como base los datos presentados en la **Fig. 8**. El ajuste paramétrico se llevó a cabo con el programa Model Maker® 3.0.3

(Cherwell, 1997), utilizando un método de optimización simplex mediante la integración Bulrich-Stoer, obteniendo como resultado los datos presentados en la **Tabla 3**.

El modelo diseñado consta de tres ecuaciones, una para cada uno de las variables evaluadas (sustrato, biomasa y producto).

La acumulación de la biomasa está dada por la velocidad de crecimiento, donde se incorporan los términos inhibitorios característicos del modelo de Haldane. Esta acumulación está descrita por la **Ec. [3]**.

$$r_x = x \left[ \left( \left( \frac{\mu_{max} * S_c}{k_{S_c} + S_c + \left( \frac{S_c^2}{k_{ic}} \right)} \right) * \left( 1 - \left( \frac{Et}{k_{iEt}} \right) \right) \right) - (K_d) \right] \quad [3]$$

Donde:

$r_x$  = Velocidad de crecimiento de biomasa ( $g_{biomasa} h^{-1} L^{-1}$ )

$x$  = Concentración de biomasa ( $g L^{-1}$ )

$\mu_{max}$  = Velocidad específica máxima de crecimiento ( $g_{biomasa} g_{biomasa}^{-1} h^{-1}$ )

$S_c$  = Concentración de celobiosa ( $g L^{-1}$ );

$k_{S_c}$  = Constante de afinidad a la celobiosa ( $g L^{-1}$ )

$k_{ic}$  = Constante de inhibición por celobiosa ( $g L^{-1}$ )

$Et$  = Concentración de etanol ( $g L^{-1}$ )

$k_{iEt}$  = Constante de inhibición por etanol ( $g L^{-1}$ )

$K_d$  = Constante de muerte celular ( $g_{biomasa} g_{biomasa}^{-1} h^{-1}$ )

Debido a lo observado en experimentos previos, se tomó la consideración de que la producción de etanol está parcialmente asociada al crecimiento del microorganismo, derivado a que bajo condiciones anaerobias el metabolismo dirige el flujo de carbono hacia la producción de etanol para la obtención de energía, pero a su vez existe crecimiento (Ortega, 2016). Por lo anterior su comportamiento está basado en la ecuación de Luedeking-Piret descrito en la **Ec. [4]**

$$r_{Et} = X \left[ \left( \alpha \left( \frac{\mu_{max} * S_c}{k_{S_c} + S_c + \left( \frac{S_c^2}{k_{ic}} \right)} \right) * \left( 1 - \left( \frac{Et}{k_{iEt}} \right) \right) \right) - (K_d) \beta \right] \quad [4]$$

Donde:

$r_{Et}$  = Velocidad de producción de etanol ( $g_{etanol} h^{-1} L^{-1}$ )

$\alpha$  = Coeficiente de producción de etanol asociado al crecimiento ( $g_{etanol} g_{biomasa}^{-1}$ )

$\beta$  = Coeficiente de producción de etanol no asociado al crecimiento ( $g_{Et} g_{biomasa}^{-1} h^{-1}$ )

Por último, para el consumo de sustrato se tomó la consideración de que existe un término de mantenimiento celular adicional al sustrato consumido para el crecimiento y la producción de etanol, siendo este último el de mayor peso debido a la naturaleza del proceso. La tasa neta de consumo de sustrato se basa sobre 3 contribuciones descrito en la **Ec. 5**

$$r_s = - \left( \frac{r_x}{Y_{x/s}} + \frac{r_{Et}}{Y_{p/s}} + X \gamma \right) \quad [5]$$

Donde:

$r_s$  = Velocidad de consumo de celobiosa ( $g_{celobiosa} h^{-1} L^{-1}$ )

$\frac{Y_x}{s}$  = Rendimiento biomasa-sustrato ( $g_{\text{biomasa}} g_{\text{celobiosa}}^{-1}$ )

$\frac{Y_p}{s}$  = Rendimiento producto-sustrato ( $g_{\text{EtOH}} g_{\text{celobiosa}}^{-1}$ )

$\gamma$  = Coeficiente de mantenimiento celular ( $g_{\text{celobiosa}} g_{\text{biomasa}}^{-1} h^{-1}$ )

Por último, al ser un proceso biológico y debido al dinamismo mencionado anteriormente, los rendimientos no se mantienen constantes a lo largo del tiempo por lo que su comportamiento está descrito por las **Ec. 6** y **Ec. 7**

$$\frac{Y_x}{s} = \frac{Y_{gx} * Sc}{K_{sc} + Sc + \left(\frac{Sc^2}{K_{ic}}\right)} \quad [6]$$

$$\frac{Y_p}{s} = \frac{Y_{gp} * Sc}{K_{sc} + Sc + \left(\frac{Sc^2}{K_{ic}}\right)} \quad [7]$$

Donde:

$\frac{Y_{gx}}{s}$  = Rendimiento global biomasa-sustrato ( $g_{\text{biomasa}} g_{\text{celobiosa}}^{-1}$ )

$\frac{Y_{gp}}{s}$  = Rendimiento global producto-sustrato ( $g_{\text{EtOH}} g_{\text{celobiosa}}^{-1}$ )

Con los datos obtenidos con el conjunto de ecuaciones establecidas [3-7], se realizó la integración y análisis de ajuste dando como resultado un coeficiente de correlación  $r^2 = 0.97$  y un residual  $x^2 = 31.18$ . Además se obtuvo un valor del estadígrafo  $p < 0.001$  lo cual indica que el modelo se ajusta de manera correcta a los datos experimentales y que la probabilidad de que el ajuste derivado del error es menor a 0.1 % (**Fig. 12**). El modelo se validó y se determinó que posee la capacidad descriptiva y predictiva, por lo cual puede ser utilizado como acercamiento en un cambio de régimen operativo (Anexo 4).

Tabla 3 Parámetros cinéticos de *S. cerevisiae* RP2-BGL obtenidos mediante el ajuste a un modelo de tipo Haldane con doble inhibición

<b>Parámetro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Valor</b>
$\mu_{max}$	Tasa específica máxima de crecimiento	0.08 h <sup>-1</sup>
$K_{sc}$	Constante de afinidad de sustrato	0.47 g L <sup>-1</sup>
$\gamma$	Mantenimiento celular	1 x 10 <sup>-8</sup> g <sub>celobiosa</sub> g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$\alpha$	Coefficiente de producción de etanol asociado al crecimiento	0.33 g <sub>Et</sub> g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup>
$\beta$	Coefficiente de producción de etanol no asociado al crecimiento	0.18 g <sub>Et</sub> g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
$K_{ic}$	Constante de inhibición por sustrato	43.76 g L <sup>-1</sup>
$K_{iEtOH}$	Constante de inhibición por producto	41.08 g L <sup>-1</sup>
$K_d$	Constante de muerte celular	2.5 x 10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>
$Y_{g_{x/s}}$	Rendimiento máximo biomasa-sustrato	0.16 g <sub>biomasa</sub> g <sub>celobiosa</sub> <sup>-1</sup>
$Y_{g_{p/s}}$	Rendimiento máximo producto-biomasa	0.51 g <sub>EtOH</sub> g <sub>celobiosa</sub> <sup>-1</sup>

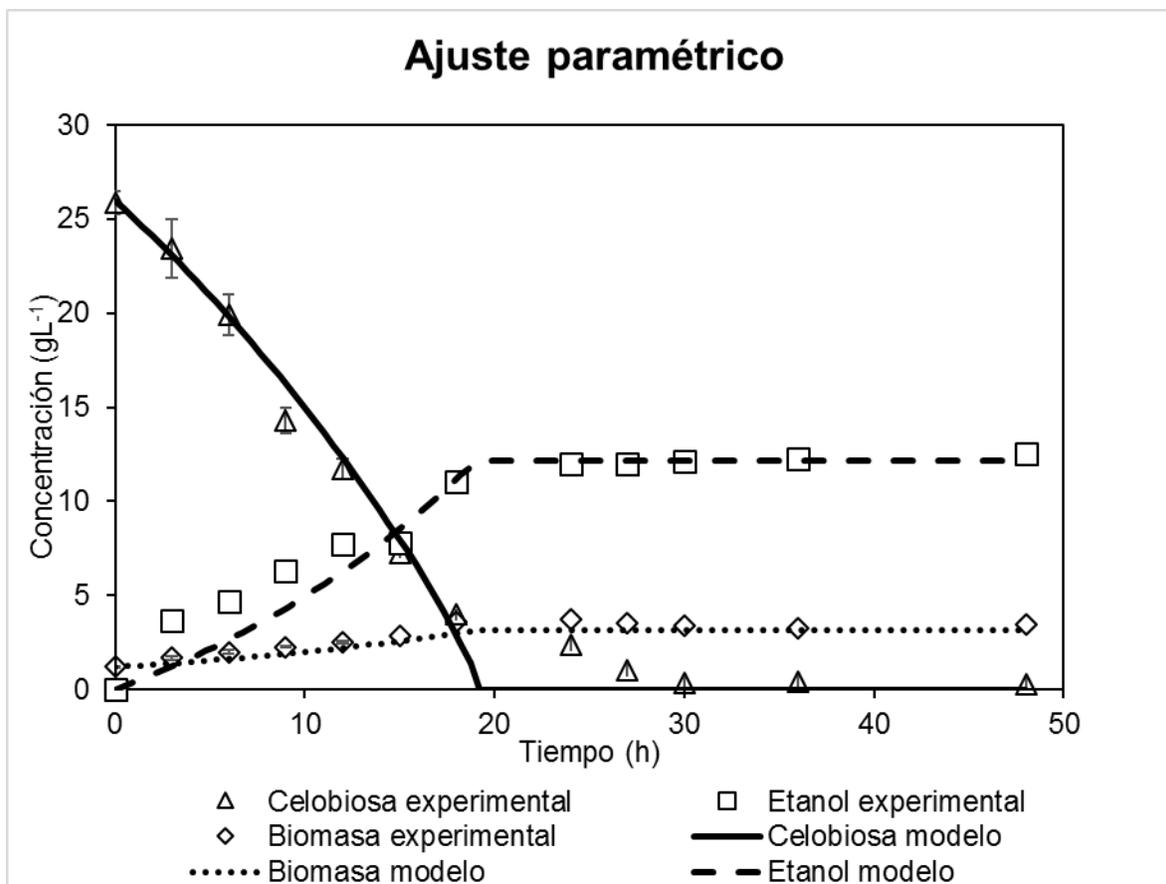


Figura 12 Comparación entre los valores predichos mediante un modelo de Haldane con producción de etanol parcialmente asociada al crecimiento y término de mantenimiento celular contra datos experimentales. ( $S_0=27 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$  agitación= 150 rpm,  $T= 32 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}_0 = 6$ )

Martynova *et al.*, (2017) diseñaron un modelo para el proceso de obtención de etanol a partir de lactosa e inulina por la levadura *Kluyveromyces marxianus*. El término de crecimiento implementado en el modelo también posee constantes de inhibición tanto para sustrato como por producto. En la tasa neta de consumo de sustrato no se tomó en cuenta la utilización del sustrato para la producción de etanol, es decir únicamente tienen términos debidos al crecimiento y mantenimiento celular. De igual manera que en el presente trabajo, la producción de etanol se modeló utilizando términos de Luedeking y Piret.

Martynova reportó una velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{Max}}$ ) de  $0.75 \text{ h}^{-1}$ , mientras que con el ajuste realizado a los datos de este trabajo se obtiene un valor de  $0.8 \text{ h}^{-1}$ . Por otro lado, el rendimiento biomasa-sustrato es más bajo que el obtenido, esto se puede deber a la velocidad de crecimiento máxima que reportan.

En lo que corresponde a los términos de producción de etanol asociados y no asociados al crecimiento Martynova *et al.* Reportan valores de 5 y 0.41 respectivamente, siendo 12 y 2 veces mayores que los obtenidos en este trabajo.

En el modelo desarrollado por Martynova *et al.*, las constantes de inhibición poseen valores más bajos siendo de 13.96 gL<sup>-1</sup> para el sustrato y 21.23 gL<sup>-1</sup> para el producto.

Las diferencias encontradas en los valores de los parámetros utilizados en ambos modelos, se puede deber a que son microorganismos y sustratos diferentes. Además, de que en el presente trabajo se considera un término de consumo de sustrato destinado a la producción de etanol.

### **7.3.2 Evaluación del régimen de lote alimentado**

El cambio de régimen de operación de un proceso fermentativo es una alternativa para aumentar los rendimientos y productividades de diversos procesos, principalmente en casos donde el microorganismo presente problemas de inhibición por sustrato, ya que permite aumentar la cantidad de este de manera gradual sin llegar a concentraciones inhibitorias. (Phukoetphim *et al.*, 2017)

Debido a esto es que se evaluó el cambio de régimen de lote a lote alimentado con acercamientos a alimentación lineal y exponencial.

#### **7.3.2.1 Evaluación de alimentación lineal**

El primer acercamiento al régimen de operación de alimentación continua, utilizando un sistema de alimentación constante, se inició con un cultivo en lote con el 50% del volumen de operación a una concentración inicial de celobiosa de 10 g L<sup>-1</sup> y la alimentación comenzó a las 10 h con un flujo constante de 6.15 mL h<sup>-1</sup>, donde de acuerdo con lo predicho por el modelo desarrollado en la sección anterior, se esperaba tener 0.326 g (1.63 g L<sup>-1</sup>) de sustrato y alrededor de 0.77 g (3.84 g L<sup>-1</sup>) de etanol al final del proceso en lote (**Fig. 13**). Este acercamiento se realizó sin agitación debido a lo observado en la sección anterior, donde se determinó que no era factor significativo para la producción de etanol. La concentración de celobiosa en la alimentación se encontraba a 62.5 g L<sup>-1</sup>.

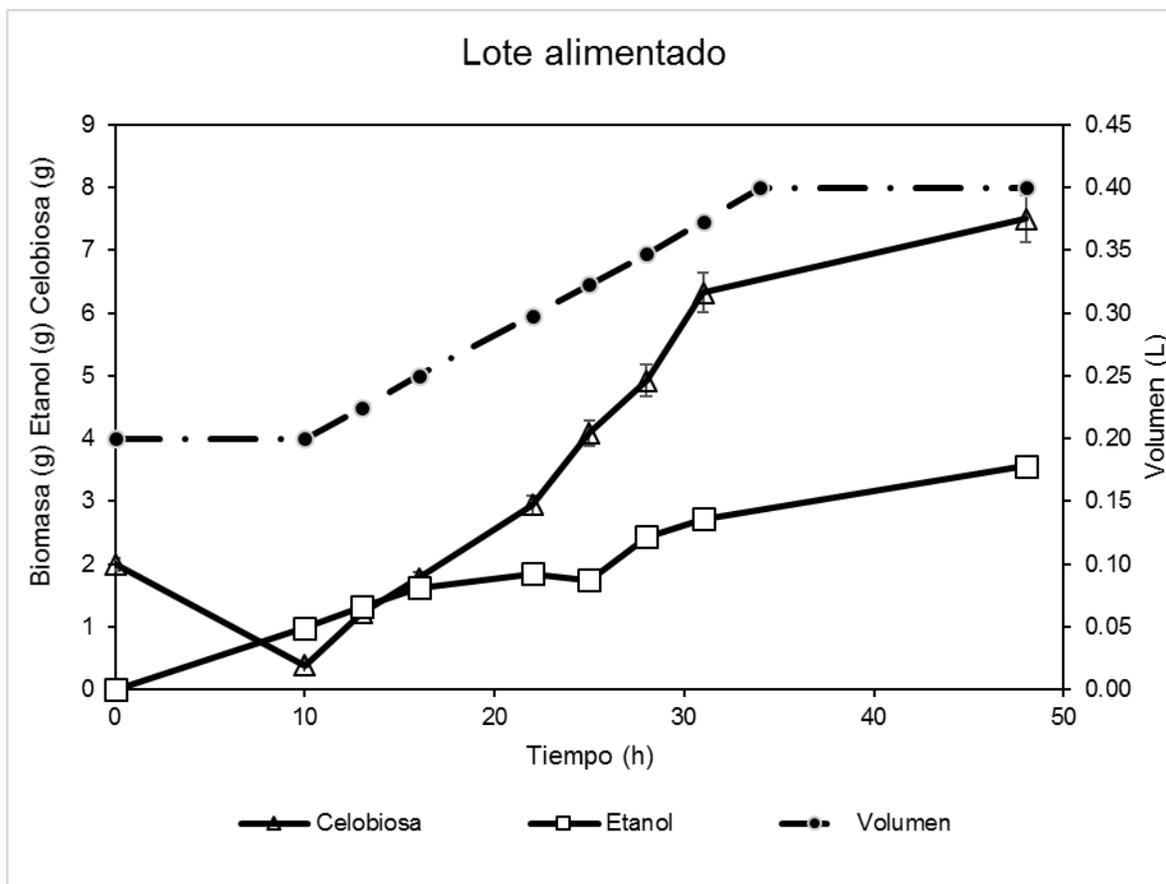


Figura 13 Fermentación de celobiosa en régimen de operación de lote alimentado. (Lote:  $S_0=10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_0= 200 \text{ mL}$ ,  $T = 32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ , sin agitación, Lote alimentado:  $F = 6.15 \text{ mL h}^{-1}$ ,  $S_a=65 \text{ g L}^{-1}$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones)

Los valores de celobiosa y etanol a las 10 h al término del cultivo por lote fueron de 0.38 g ( $1.85 \text{ g L}^{-1}$ ) y 0.98 g ( $4.3 \text{ g L}^{-1}$ ) respectivamente, lo cual reafirma lo dicho en el apartado anterior sobre la capacidad descriptiva del modelo en el intervalo evaluado.

Lo que se puede observar en la **Fig. 13** es una producción lenta de etanol y una tendencia marcada de acumulación de sustrato, quedando 7.49 g de celobiosa equivalente a una concentración final de  $18.8 \text{ g L}^{-1}$  a las 48 h lo cual representa un consumo de únicamente el 45% de los azúcares totales suministrados, de los azúcares suministrados durante la etapa de alimentación el consumo fue del 42%. Este porcentaje de consumo es bajo y completamente no deseado ya que no se está aprovechando de manera adecuada la celobiosa. Por otro lado, se alcanzó obtener 3.5 g de etanol ( $8.9 \text{ g L}^{-1}$ ) la cual es una concentración menor que la

alcanzada en el régimen por lote descrito anteriormente. La productividad alcanzada fue de  $0.18 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Una posible explicación a esta acumulación del sustrato y baja producción de etanol es la falta de agitación que tiene como consecuencia un sistema no homogéneo generando gradientes de concentración llegando a causar inhibición por sustrato.

Derivado de estas observaciones se determinó repetir las condiciones anteriores, pero en presencia de agitación una vez terminada la etapa en lote para evitar el efecto de acumulación de sustrato. Así mismo se incrementó el tiempo de la fermentación.

En la **Fig. 14** se observa que bajo las mismas condiciones usadas anteriormente, pero en presencia de agitación se mantiene el comportamiento acumulativo de celobiosa, sin embargo, existe una mayor producción de etanol que en el caso anterior. El consumo de azúcares fue del 68 % de la celobiosa total suministrada al término de las 48 h, mismo porcentaje que se consumió durante la etapa de alimentación. Al término de la fermentación, se consumió el 71% de los azúcares, lo cual representa un incremento del 3% respecto a las 48 h. El etanol obtenido fue de 5.4 y 5.7 g ( $13.69$  y  $14.25 \text{ g L}^{-1}$ ) para las 48 y 62 h respectivamente. Estas concentraciones son mayores a las obtenidas en el proceso en lote con las condiciones estandarizadas, sin embargo, la celobiosa residual fue de 4.3 g ( $11 \text{ g L}^{-1}$ ) lo cual afecta la eficiencia global del proceso. Si bien ésta se ve afectada, el rendimiento demostró ser mayor que los anteriores ( $0.51 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{celobiosa}}^{-1}$ ). Las productividades fueron de  $0.29$  y  $0.23 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a las 48 y 62 h.

Como se seguía observando una tendencia a la acumulación del sustrato, se determinó cambiar la alimentación, tanto la concentración de sustrato suministrado como la velocidad a la que se suministra, para darle más tiempo al microorganismo de procesar la celobiosa y producir etanol. Además, se incrementó la concentración de sustrato al inicio del cultivo en lote para darle la capacidad al microorganismo de adaptarse a concentraciones más elevadas de sustrato.

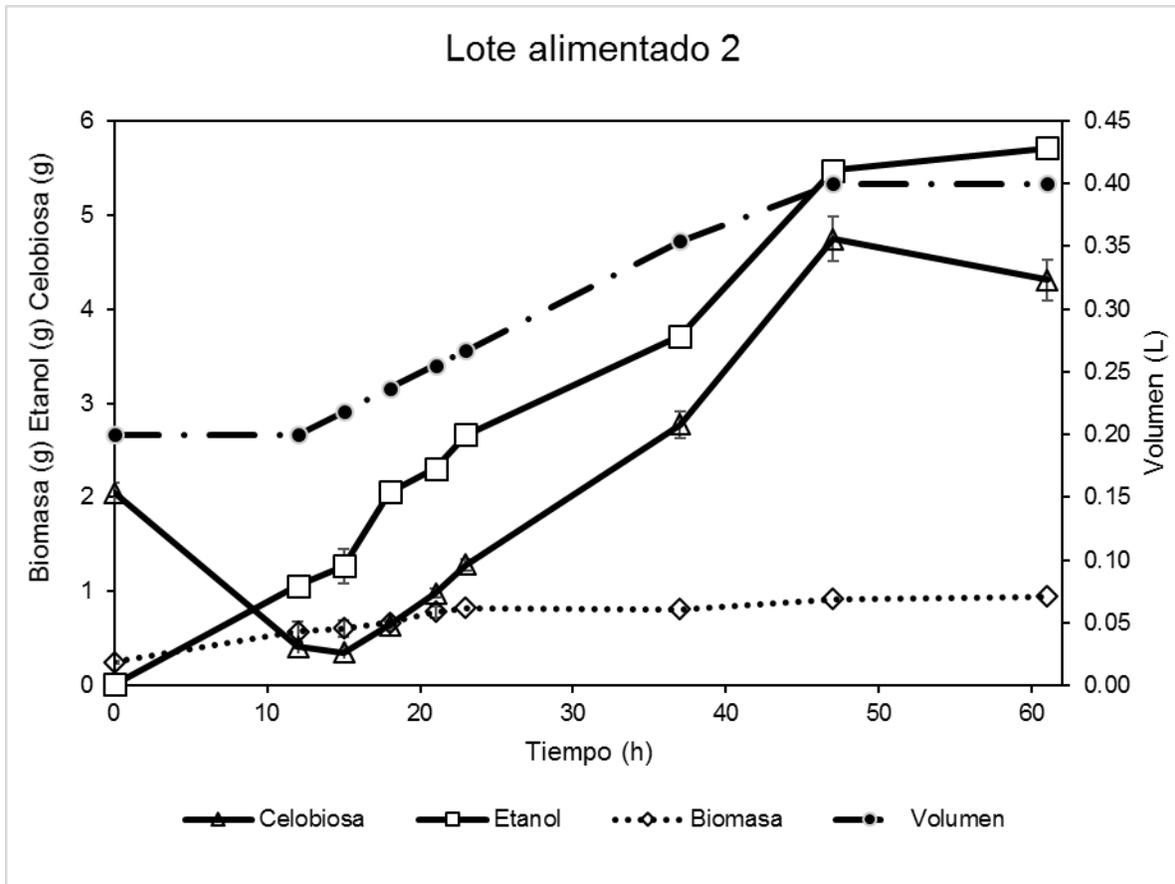


Figura 14 Fermentación de celobios en régimen de operación por lote alimentado. (Lote:  $S_0=10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0=1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_0=200 \text{ mL}$ ,  $T=32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\text{agitación}=200 \text{ rpm}$ , Lote alimentado:  $F=6.15 \text{ mL h}^{-1}$ ,  $S_a=65 \text{ g L}^{-1}$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones)

El efecto de las modificaciones mencionadas anteriormente se ve reflejado en la **Fig. 15**, donde se puede observar que la tendencia acumulativa del sustrato disminuyó de manera notable, si bien no se logró consumir toda la celobios sí se mantuvo a un nivel casi constante no mayor a 1.5 g de celobios lo cual es indicativo de que la velocidad a la cual se suministra el sustrato es muy cercana a la velocidad de consumo de éste por el microorganismo. En esta ocasión hubo un consumo global del 92% de los azúcares, representando un consumo similar al observado en el régimen por lote. La producción de etanol fue de 6.8 y 7.2 g ( $17.03$  y  $18.16 \text{ g L}^{-1}$ ) a las 48 y 62 h respectivamente alcanzando productividades de  $0.36$  y  $0.29 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , siendo ambos parámetros mayores que las reportadas bajo las condiciones anteriores.

Al igual que en la **Fig. 14** la biomasa se mantiene casi constante, no mostrando incrementos significativos en su cantidad a pesar de las modificaciones a la alimentación, lo cual es indicativo de que el metabolismo del microorganismo se está dirigiendo preferentemente a la producción de etanol como manera de generar energía para el mantenimiento celular. El rendimiento obtenido bajo estas condiciones fue de  $0.512 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{celobiosa}}^{-1}$ .

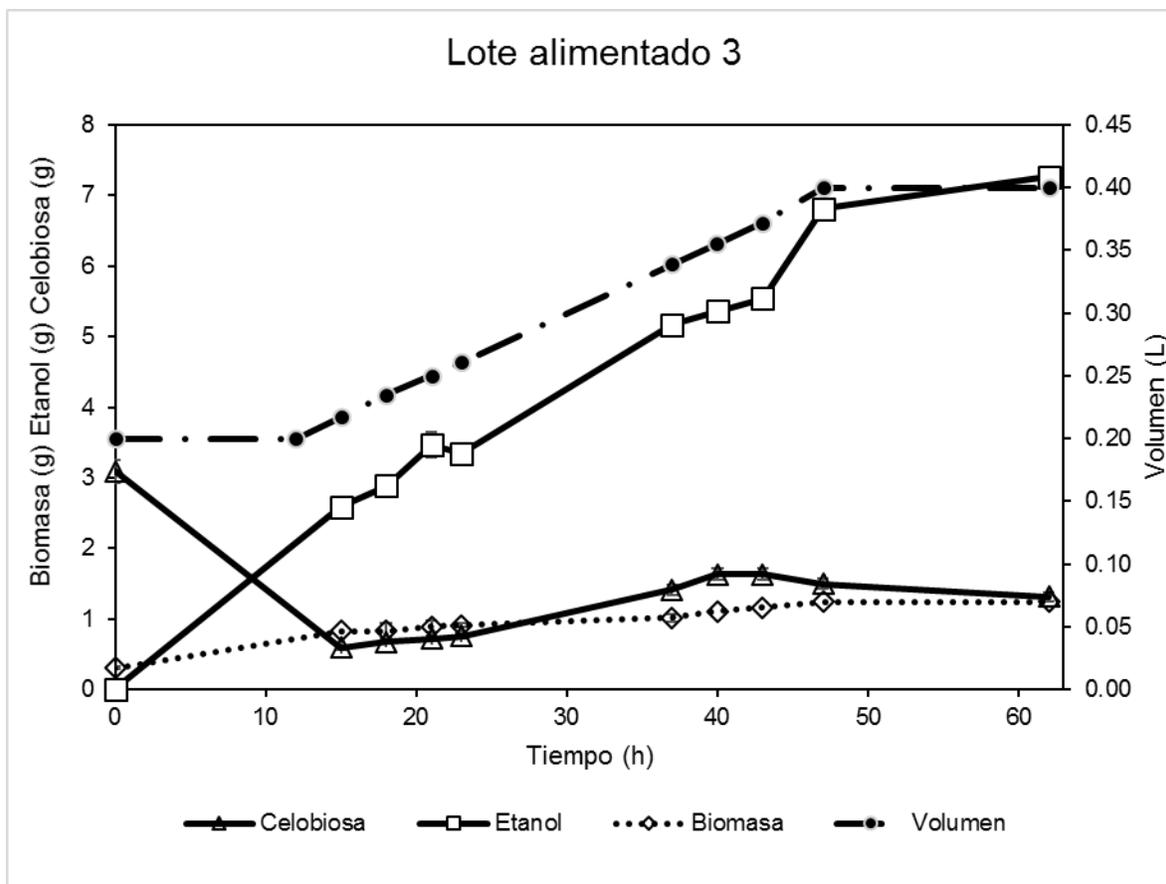


Figura 15 Fermentación de celobiosa en régimen de operación por lote alimentado. (Lote:  $S_0=15 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0=1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_0=200 \text{ mL}$ ,  $T=32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\text{agitación}=200 \text{ rpm}$ , Lote alimentado:  $F=5.54 \text{ mL h}^{-1}$ ,  $S_a=62.5 \text{ g L}^{-1}$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones)

### 7.3.2.2 Evaluación de alimentación exponencial

En el cultivo por lote alimentado un régimen de alimentación exponencial permite alargar las fases del proceso que uno desee, en este caso la producción de etanol asociada al crecimiento. Para poder llevar a cabo la alimentación exponencial se determinó de manera empírica la cédula de alimentación.

La prolongación de la fase exponencial de crecimiento se obtiene suministrando la cantidad de celobiosa requerida por el microorganismo. Esto se logra igualando la velocidad de consumo de sustrato a la velocidad de suministro de celobiosa. La alimentación, al igual que la demanda de sustrato varía respecto al tiempo por lo cual el flujo se modifica de manera paralela para poder satisfacer los requerimientos del microorganismo. Bajo esta premisa, un lote alimentado de manera exponencial trabajando de manera ideal y estable posee una concentración de sustrato residual constante por lo que las velocidades de formación de biomasa y producto, así como los rendimientos, permanecen constantes.

Al ser una alimentación exponencial se determinó comenzar con un volumen menor para el comienzo de la fermentación, antes de iniciar la alimentación, por lo que el volumen inicial fue de 0.14 L (30% menor que en la alimentación lineal).

El primer acercamiento fue con una concentración de la alimentación de 65 g L<sup>-1</sup> y 15 g L<sup>-1</sup> de celobiosa para la etapa inicial del lote para intentar mantener una  $\mu_{\max}=0.08 \text{ h}^{-1}$  aproximadamente. La alimentación se comenzó después de transcurridas 13 h de fermentación en lote (**Fig. 16**), debido a que es el tiempo teórico que tomaría en consumir la celobiosa suministrada en el proceso en lote de acuerdo con el modelo desarrollado en apartados anteriores. Se puede observar que existe una acumulación de celobiosa durante las 28 h que duró la alimentación, alcanzándose la mayor cantidad de celobiosa 4.60 g (12.45 g L<sup>-1</sup>) a las 37 h. Esto pudo ser debido a que la velocidad de consumo de sustrato determinada mediante el modelado sobreestimó la capacidad de asimilación de la celobiosa o bien a que al inicio de la alimentación el microorganismo ya se encontraba en una fase de desaceleración.

Durante la alimentación no se observaron efectos considerables de inhibición por sustrato o producto, ya que durante la etapa de alimentación el crecimiento se mantuvo constante a una velocidad específica de crecimiento de 0.043 h<sup>-1</sup> asimismo la producción de etanol .

Posterior al punto máximo de acumulación de sustrato y tras el término de la alimentación (38 h), el proceso entró en una segunda etapa por lote donde la velocidad de crecimiento y producción de etanol se vieron disminuidas, pero no nulificadas. Este fenómeno permitió que el microorganismo pudiera asimilar el resto de la celobiosa presente en el medio de cultivo.

Al término del proceso se obtuvo un aprovechamiento global del 98.9% del sustrato, produciendo 9.5 g de etanol equivalente a una concentración de 23.76 g L<sup>-1</sup> con un rendimiento de 0.514 g<sub>EtOH</sub> g<sub>celobiosa</sub><sup>-1</sup>. Durante la etapa de alimentación se consumió el 72% de la celobiosa suministrada. La productividad global del proceso fue de 0.38 g<sub>etanol</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

El segundo acercamiento realizado fue con una concentración de la alimentación de 80 g L<sup>-1</sup> y 15 g L<sup>-1</sup> de celobiosa para la etapa inicial del lote, usando como base el mismo valor de  $\mu_{max}$ . Al igual que con la fermentación anterior la etapa inicial de lote tuvo una duración de 13 h, donde posteriormente se comenzó la alimentación.

Se puede observar el mismo fenómeno de acumulación de celobiosa durante las 37 horas que duró la alimentación, siendo el punto de mayor cantidad de celobiosa 5.8 g (14.3 g L<sup>-1</sup>) a las 50 h, el cual coincide con el fin de la alimentación (**Fig. 17**).

Esta concentración de celobiosa es 25% mayor a la encontrada bajo la alimentación con 6.5%, por lo que se observa que es un fenómeno similar y el incremento puede ser causado por el aumento en la concentración de celobiosa en la alimentación.

Durante esta fermentación la velocidad específica de crecimiento se mantiene constante a lo largo de todo el proceso con un valor de 0.27 h<sup>-1</sup>.

La concentración final de etanol fue de 28.5 g L<sup>-1</sup> a las 69 horas con un consumo del 98.9% de los azúcares disponibles obteniendo un rendimiento de 0.516 g<sub>EtOH</sub> g<sub>celobiosa</sub><sup>-1</sup>. Estos resultados representaron un incremento del 36% respecto a la alimentación lineal, de igual manera la productividad global al término del proceso (69 h) alcanzando un valor de 0.42 g<sub>etanol</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, siendo este un 10% mayor.

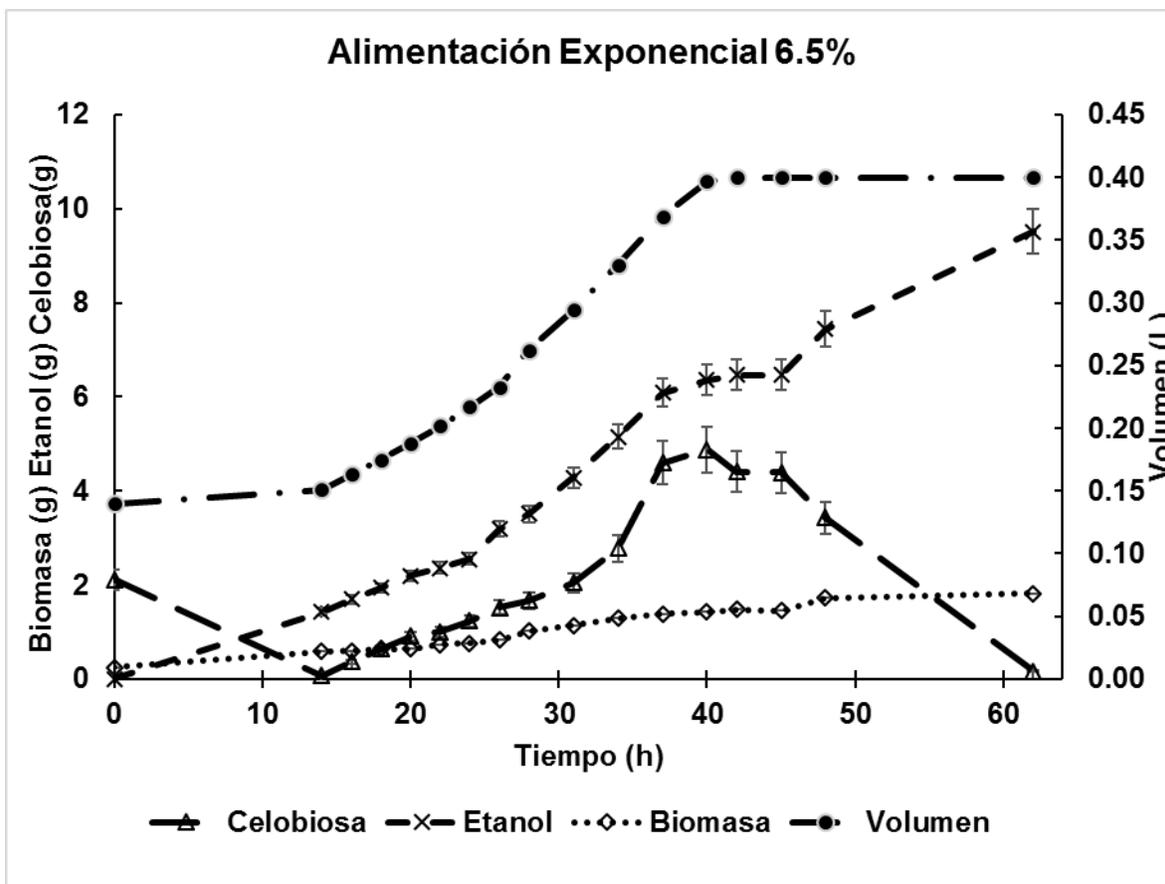


Figura 16 Producción de etanol a partir de celobiosa en régimen de alimentación exponencial. (Lote:  $S_0=15 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_0= 140 \text{ mL}$ ,  $T = 32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\text{Agitación} = 300 \text{ rpm}$ , Lote alimentado:  $S_a=65 \text{ g L}^{-1}$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 mediciones)

Un punto importante por destacar es que a las 63 h del proceso se obtuvieron 9.48 g de etanol ( $23.41 \text{ g L}^{-1}$ ), la cual es cercana a la obtenida al mismo tiempo cuando la alimentación fue de  $65 \text{ g L}^{-1}$  de celobiosa. Esto indica que el incremento en la cantidad de etanol obtenido es debido al incremento de la alimentación y que el proceso mantiene un comportamiento similar.

Los resultados obtenidos mediante el cambio de régimen de operación a un sistema por lote alimentado incrementaron en 63% la producción de etanol a comparación del lote alimentado lineal (**Tabla 4**). El rendimiento obtenido representa el 94% del valor teórico máximo. Así mismo se puede observar que el sistema por lote alimentado de manera exponencial con alimentación de  $65 \text{ g L}^{-1}$  de celobiosa es el régimen que obtuvo la productividad más elevada en la etapa

de alimentación, esto está asociado a que presentó una velocidad específica de crecimiento mayor.

Estos resultados, principalmente el incremento en la productividad volumétrica está asociado a que gracias a la implementación de una alimentación exponencial se puede trabajar con concentraciones de sustrato más elevadas disminuyendo los problemas inhibitorios por altas concentraciones de este (Hadiyanto *et al.*,2014).

Tabla 4 Comparación de la productividad de los distintos regímenes de operación trabajados

Régimen de alimentación	Concentración de alimentación (g L <sup>-1</sup> )	Cédula de alimentación (mL h <sup>-1</sup> )	Etanol (g L <sup>-1</sup> )	Productividad (g <sub>etanol</sub> h <sup>-1</sup> )	
				Global	Alimentación
<b>Lineal</b>	65	6.15	8.90	0.072	.08
	65	6.15	14.25	0.092	.12
	62.5	5.54	18.16	0.116	.12
<b>*Exponencial</b>	65	3.17e <sup>0.037x</sup>	23.76	0.152	0.18
	80	0.22e <sup>0.027x</sup>	28.5	0.168	0.14

\*La ecuación de la cédula de alimentación es dependiente del tiempo y se determinó de manera empírica.

El incremento de la productividad y rendimientos en los procesos de obtención de etanol mediante la implementación de un régimen de operación de lote alimentado han sido ampliamente reportados. Tomás-Pejo *et al.* (2009) obtuvo un 20% más de etanol a partir de rastrojo de trigo implementando una alimentación a partir de las 12 horas. Phukoetphim *et al.* (2017) mejoró en un 51% la productividad de etanol a partir de jugo de sorgo dulce en comparación del mismo proceso en lote alcanzando 40 g L<sup>-1</sup> de etanol.

Asimismo, los parámetros obtenidos en el presente trabajo son equiparables con los reportados en la literatura (**Tabla 5**), siendo el rendimiento obtenido con la

alimentación exponencial el valor más alto encontrado hasta el momento en proceso de producción de etanol a partir de celobiosa por microorganismos recombinantes con la expresión de la  $\beta$ -glucosidasa. Won-Heong *et al.* (2017) han reportado concentraciones 35% mayores a las de este trabajo ( $38.1 \text{ g L}^{-1}$ ), sin embargo, estas concentraciones se lograron bajo concentraciones de sustrato equivalentes a 8.5% en un proceso en lote.

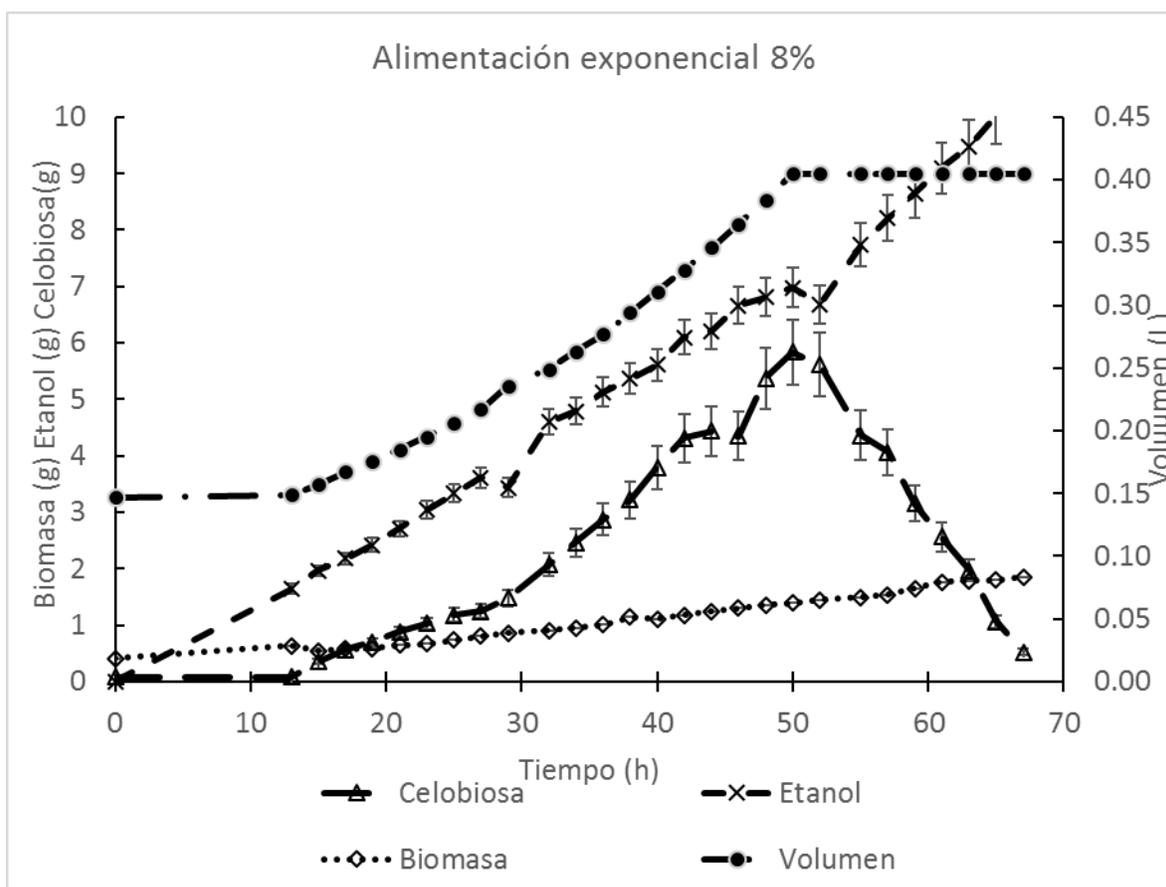


Figura 17 Producción de etanol a partir de celobiosa en régimen de alimentación exponencial (Lote :  $S_0=15 \text{ g L}^{-1}$ ,  $X_0= 1.2 \text{ g L}^{-1}$ ,  $V_0= 140 \text{ mL}$ ,  $T = 32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ,  $\text{Agitación} = 300 \text{ rpm}$ ., Lote alimentado:  $S_a=80 \text{ g L}^{-1}$ ) (Los resultados mostrados son promedios de 3 replicas)

Para poder determinar la cédula de alimentación óptima dentro de un proceso por lote alimentado se recomienda implementar ecuaciones que modelen y describan el flujo necesario para satisfacer la demanda de sustrato por parte del

microorganismo. En el presente trabajo se plantean dos ecuaciones diferentes las cuales se resumen en:

$$F = \frac{r'_s e^{r'_s t - r'_s t_0} X_0 V_0}{S_a - S} \quad [8]$$

Esta ecuación tiene como principal argumento que no existe acumulación de sustrato respecto al tiempo y se mantiene una velocidad específica de crecimiento constante (Anexo 5). El uso de esta expresión se dificulta cuando se implementa en procesos que poseen inhibición por sustrato o producto, debido a que la velocidad de crecimiento no puede ser constante durante todo el proceso.

Así mismo, se puede desarrollar una ecuación basada en datos experimentales donde la acumulación es constante y se conoce su valor para posteriormente realizar un ajuste y validación de la expresión la cual se reduce a:

$$\frac{dF}{dt} = m_4 F + t f + m_2 e^{m_s t} = 0 \quad [9]$$

Esta expresión matemática consta de una ecuación diferencial no lineal simple de primer orden, la cual es válida únicamente para determinar la rampa de un conjunto de datos experimentales (Anexo 6).

Tabla 5 Comparación de parámetros de producción de etanol a partir de cepas de *S. cerevisiae* expresando  $\beta$ -glucosidasas recombinantes.

Microorganismo	Régimen de operación	Sustrato inicial	Rendimiento ( $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{sustrato}}^{-1}$ )	Concentración etanol	Referencia	
<i>S. cerevisiae</i>	GSE16-T18	Hidrolizados de coco (20%)	0.41	3.5% (v/v)	Soares <i>et al.</i> (2017)	
	D-BTm	Lote	Celobiosa (8.5 %)	38.1 g L <sup>-1</sup>	Won-Heong L., Yong-su J. (2017)	
	DBT2M		Celobiosa (8%)	26.56 g L <sup>-1</sup>	Joong E. <i>et al.</i> (2017)	
	IBP1		Celobiosa (1%)	0.488	4.5 g L <sup>-1</sup>	Guo <i>et al.</i> (2011)
	RP2-BGL		Lote alimentado lineal	Celobiosa (1.5% + 6%)	0.512	18.1 g L <sup>-1</sup>
		Lote alimentado exponencial	Celobiosa (1.5% + 8%)	0.514	28.5 g L <sup>-1</sup>	Este trabajo

## Etapa 4

### 7.4.1 Tratamiento y caracterización del bagazo de caña

Se determinó la composición química del BC antes y después del tratamiento alcalino (NaOH 2%) para analizar los efectos de éste así como para conocer la celulosa disponible en el BC tratado durante la sacarificación. Se puede observar que hubo una disminución en el contenido de lignina y hemicelulosa en 50 y 36%

respectivamente (**Tabla 6**). Asimismo, se incrementó en 40% la celulosa disponible en el BC. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Banerjee *et al.* (2016) donde encontraron que se disminuyó en 18% la lignina total en tallos de mostaza después de un tratamiento con NaOH 1 N. De igual manera Ramadoss & Muthukuma (2015) reportaron una deslignificación del 60% mediante un pretratamiento de sales y peróxido de hidrógeno sobre BC.

Tabla 6 Composición del bagazo de caña crudo y tratado alcalinamente con NaOH 2%.

Tratamiento	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Total (%)
<b>Crudo</b>	23.27±0.39	47.4±1.54	17.98±1.27	2.58±0.43	2.75±0.26	94±3.89
<b>NaOH 2%</b>	15.37±0.66	65.83±3.64	12.52±1.52	2.37±0.27	1.85±0.19	98.17±3.4

Estos reportes confirman la importancia de llevar a cabo un pretratamiento ya que la sacarificación enzimática se puede ver favorecida al retirar la lignina e incrementar las zonas amorfas del bagazo de caña.

#### **7.4.2 Evaluación de cócteles enzimáticos ricos en celulasas**

Para poder llevar a cabo el proceso SimSF fue necesario la adición de un cóctel enzimático celulolítico. Se probaron 2 cócteles enzimáticos comerciales (Cellulast y Novozyme) y un extracto crudo libre de células de *C. flavigena* PR-22.

Se utilizaron 2 concentraciones para cada cóctel enzimático utilizado equivalente a 5000 y 7000 unidades de papel filtro (FPU). Las pruebas se realizaron en un regulador de citratos 100 mM pH 6 debido a que es el pH al que se trabajó durante la estandarización de las condiciones de operación.

La mayor concentración de celobiosa ( $3.4 \text{ g L}^{-1}$ ) y glucosa ( $5.8 \text{ g L}^{-1}$ ) en el sacarificado se obtuvo con Celluclast (**Fig. 18**). Con el extracto de *C. flavigena* PR-22 no se detectó glucosa debido a que este cóctel carece de  $\beta$ -glucosidasa por lo cual no puede realizar la hidrólisis de la celobiosa. Sin embargo, con este coctel es

que produce la mayor cantidad de xilosa por la presencia de xilanasas. Esto concuerda con lo reportado por Rojas-Rejón *et al.* (2011).

El incremento en la concentración enzimática no representó un impacto positivo sobre la producción de azúcares, únicamente en el caso del cóctel de Novozyme, donde se generó una mayor sacarificación, viéndose reflejado en la concentración de celobiosa, xilosa y glucosa (**Fig.18**).

Con base en los resultados obtenidos se determinó utilizar el cóctel de Celluclast usando 5000 FPU para el proceso SimSF, debido a que es el cóctel que generó la mayor cantidad de celobiosa y glucosa.

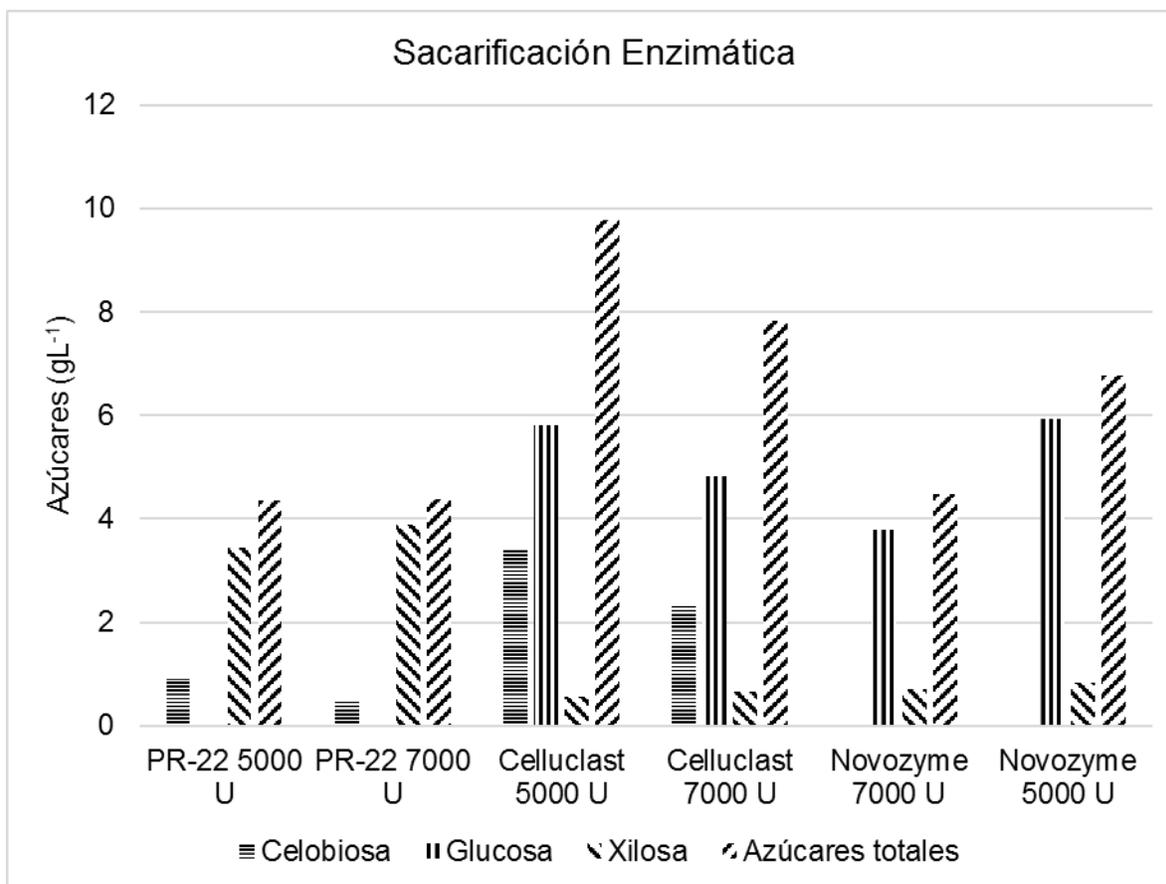


Figura 18 Producción de azúcares durante la sacarificación enzimática del bagazo de caña pretratado con NaOH al 2 %. (T= 35°C, regulador citratos 100 mM pH =6, 300 rpm)

### 7.4.3 Establecimiento del proceso SimSF

Para la implementación del proceso SimSF se utilizaron reactores de mesa de 0.5 L con un volumen de operación de 0.3 L, se utilizó bagazo de caña al 2% enriquecido con extracto de levadura al 0.3 % para favorecer el crecimiento de *S. cerevisiae* RP2-BGL y la asimilación de los azúcares derivados de la sacarificación.

La adición de las enzimas se realizó de manera simultánea al inóculo en el reactor. El primer acercamiento se realizó utilizando 20 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña, obteniendo 6 g L<sup>-1</sup> de etanol al término del proceso (**Fig. 19**). Tomando en cuenta la composición porcentual del BC descrita en el apartado anterior, la concentración aproximada de celulosa fue de 14 g L<sup>-1</sup>, por lo cual el rendimiento aproximado del proceso fue de 0.462 g<sub>EtOH</sub> g<sub>celulosa</sub><sup>-1</sup>

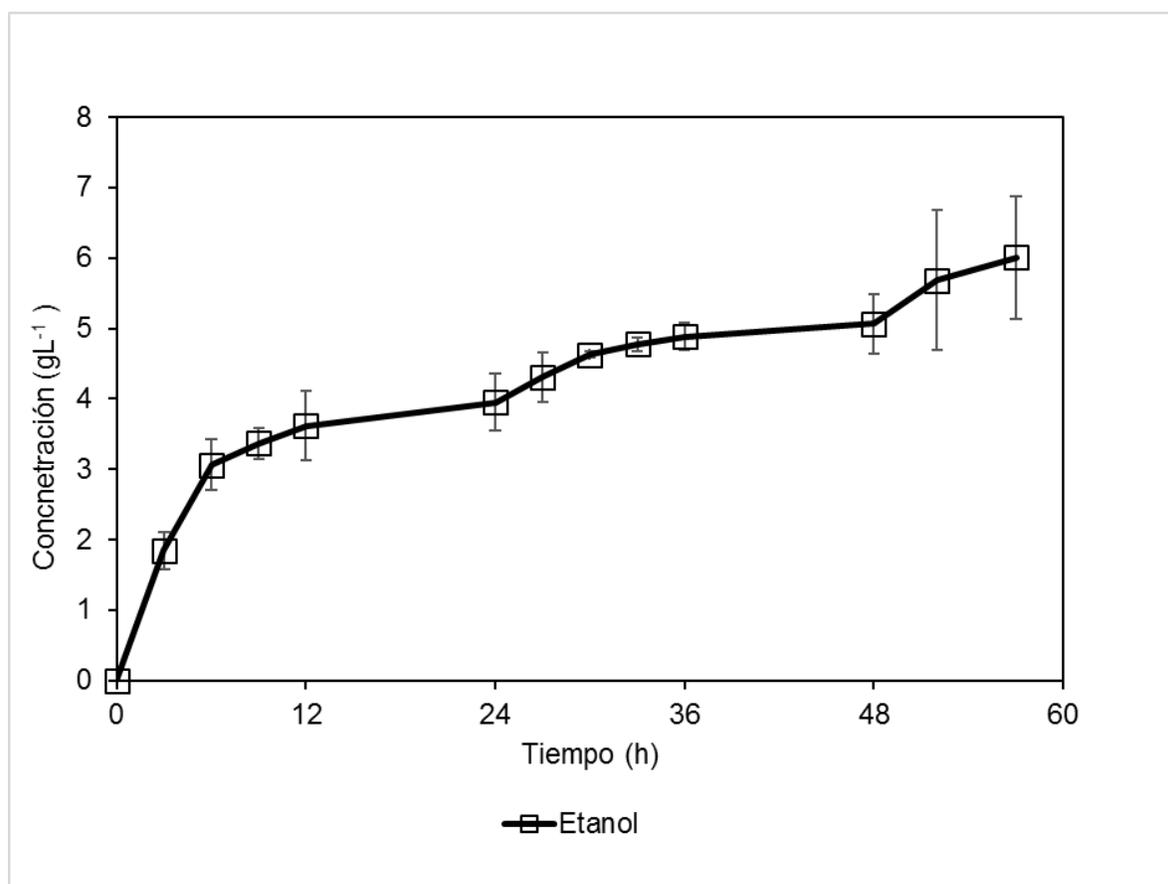


Figura 19 Proceso SimSF para la obtención de etanol a partir de bagazo de caña (2%) por *S. cerevisiae* RP2-BGL. (T= 35°C, 300 rpm, sin aireación, 5000 FPU de Celluclast)

La siguiente fermentación se llevó a cabo incrementando la concentración inicial de sustrato a 3% pero sin alterar la cantidad de enzima suministrada. En esta ocasión se alcanzó una concentración máxima de etanol de  $8.63 \text{ g L}^{-1}$  a las 54 h (**Fig. 20**) con un rendimiento de  $0.442 \text{ g}_{\text{EtOH}} \text{ g}_{\text{celulosa}}^{-1}$ , siendo este menor que el alcanzado con una concentración más baja (2%) de BC.

En ninguno de los dos casos ensayados anteriormente se detectó la acumulación de celobiosa ni glucosa en el medio, lo cual indica que los azúcares que son liberados son consumidos inmediatamente.

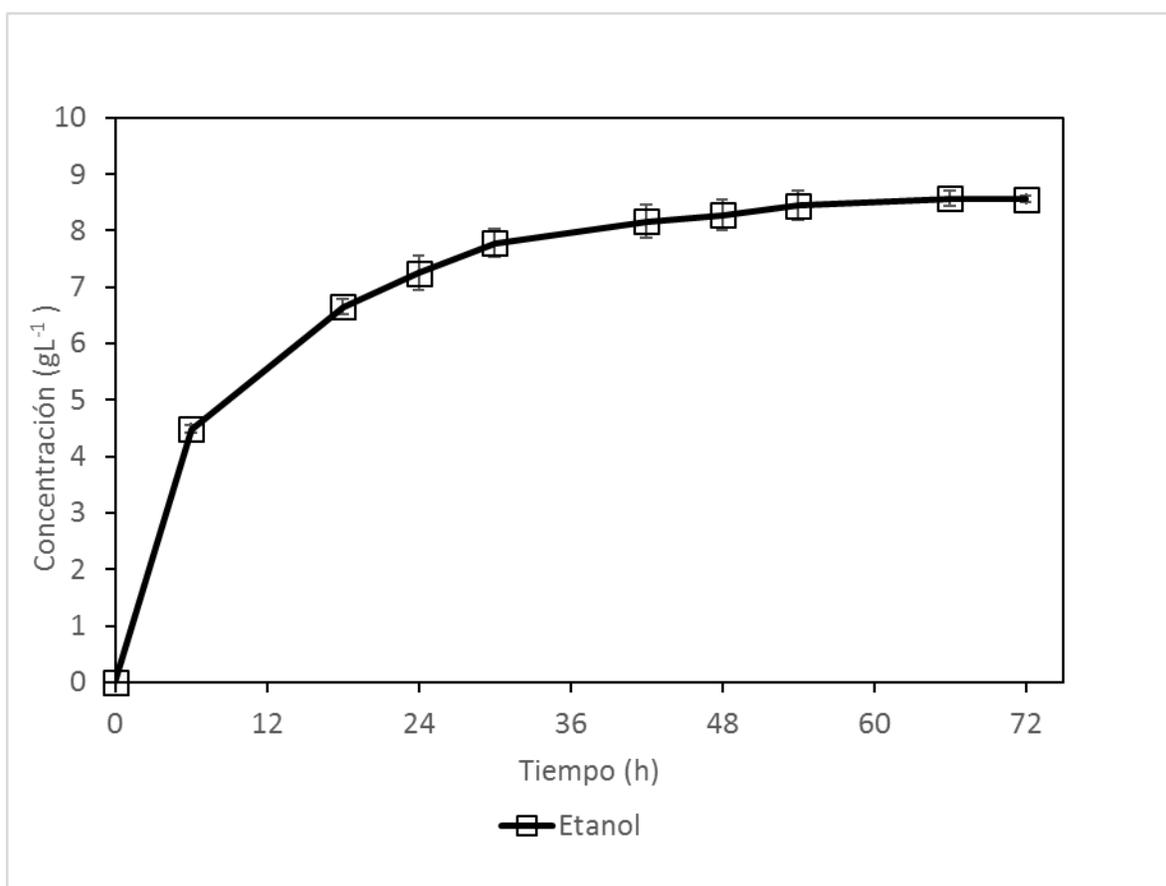


Figura 20 Proceso SimSF para la obtención de etanol a partir de bagazo de caña (3%) por *S. cerevisiae* RP2-BGL. (T= 35°C, 300 rpm, sin aireación, 5000 U de Celluclast)

El rendimiento obtenido bajo la segunda condición (3% BC) fue menor (4.2%) que el obtenido con una carga menor de sustrato sin llegar a ser significativo. Esto se puede deber a la relación enzima-sustrato por lo que se sugiere mantener o incrementar para mejorar la sacarificación.

En consecuencia, con la observación anterior, se incrementó la carga enzimática en un 10% para cada uno de los casos siguientes, con el objetivo de mantener la relación enzima-sustrato.

En la **Fig. 21** se observa el comportamiento del proceso SimSF incrementando al doble la concentración de bagazo de caña a comparación de la última fermentación (6%). El incremento en la carga de sustrato se realizó para evaluar la capacidad del proceso para trabajar con concentraciones superiores al 5% para obtener una mayor producción de etanol y facilitar la rentabilidad del proceso en términos de operaciones de purificación (Kumar *et al.* 2011). La concentración máxima de etanol se obtuvo a las 66 h del proceso siendo ésta de 16.39 g L<sup>-1</sup> con un rendimiento de 0.42 g<sub>EtOH</sub> g<sub>celulosa</sub><sup>-1</sup>. A pesar de mantener la relación enzima sustrato, se observa que el rendimiento es menor al conseguido con concentraciones más bajas de bagazo de caña. Esto se puede deber a la generación de compuestos inhibitorios del proceso fermentativo derivado de la sacarificación de la celulosa y hemicelulosa presentes en el medio como el ácido acético. Este fenómeno inhibitorio ha sido ampliamente reportado en procesos de obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos (Parawira & Tekere, 2010; Bellido *et al.*, 2011)

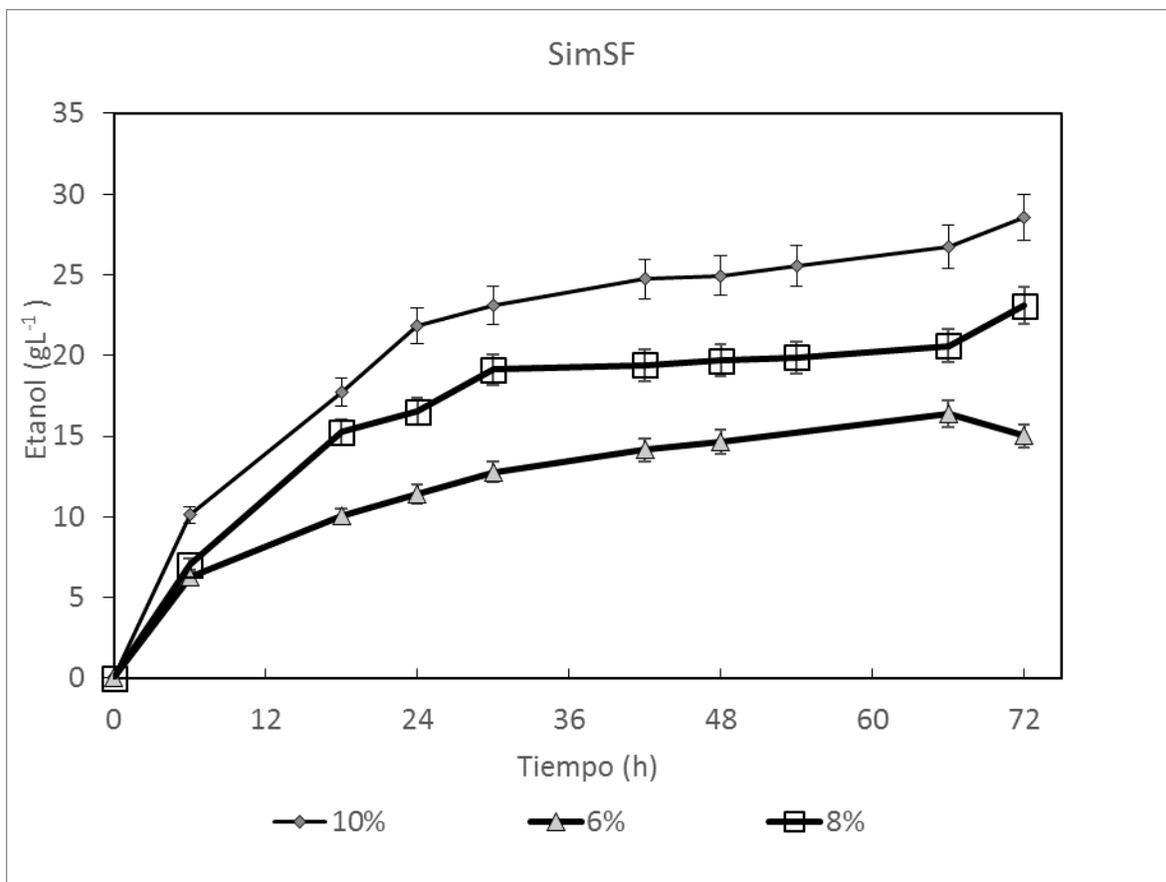


Figura 21 Proceso SimSF para la obtención de etanol a partir de bagazo de caña (6,8 y 10%) por *S. cerevisiae* RP2-BGL. (T= 35°C, 300 rpm, sin aireación, 5500 , 5750 y 6000 U de Celluclast)

De acuerdo a lo reportado en la literatura por Zhi-Hua & Hong-Zhang (2016) y Won-Heong & Yong-Su (2017), las cargas de material celulósico como rastrojo de maíz pueden alcanzar hasta una concentración de 20% para maximizar la producción de etanol y reducir costos de purificación. Con base en esto se determinó usar hasta un 10% de bagazo de caña ya que este material posee una menor densidad y cargas más elevadas pueden generar problemas de transferencia de masa dentro del reactor. Así mismo junto con el incremento de la carga de sustrato se aumentó la concentración enzimática para mantener la relación enzima-sustrato.

Antes de llevar a cabo el proceso con 10% de sustrato se realizó una fermentación previa conteniendo 8% de bagazo de caña. Bajo estas condiciones se alcanzó una concentración máxima de etanol equivalente a 23.08 g L<sup>-1</sup> de etanol a las 72 h del proceso (**Fig. 21**), con un rendimiento de 0.44 g<sub>EtOH</sub> g<sub>celulosa</sub><sup>-1</sup>. A diferencia de las

fermentaciones anteriores el máximo de etanol alcanzado se da hasta el final del proceso, esto pudo ser causado por la concentración elevada de sustrato, ya que la liberación de azúcares se lleva a cabo durante más tiempo. El rendimiento obtenido equivale al 88% del máximo teórico.

Finalmente, se realizó una fermentación conteniendo 10% de bagazo de caña. Bajo estas condiciones se alcanzó una concentración máxima de 28.57 g L<sup>-1</sup> de etanol a las 72 h (**Fig. 21**) con un rendimiento de 0.439 g<sub>EtOH</sub> g<sub>celulosa</sub><sup>-1</sup>. Este rendimiento confirma que al incrementar la concentración de sustrato se debe de aumentar la carga enzimática para mantener una relación enzima-sustrato adecuada. Sin embargo, se debe de realizar estudios posteriores para determinar la relación óptima.

Para verificar que la producción de etanol fuera debido a la implementación del proceso SimSF se realizaron controles con los cocteles enzimáticos y el microorganismo por separado, sin encontrarse producción de etanol en ninguno de los casos (datos no mostrados).

Las productividades obtenidas en el presente trabajo se muestran en la **Tabla 7**. El valor más alto obtenido corresponde al proceso SimSF con la mayor concentración (10%) de bagazo de caña con un valor de 0.39 g<sub>etanol</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> sin embargo el rendimiento más elevado fue aquel obtenido bajo la menor carga de sustrato, esto debido como se mencionó anteriormente a la posible liberación de compuestos inhibidores de la fermentación o a una baja relación enzima-sustrato.

Tabla 7 Productividades y rendimientos del proceso SimSF a partir de bagazo de caña por *S. cerevisiae* RP2-BGL y coctel enzimático Celluclast

<b>Concentración</b> (%)	<b>Productividad</b> (g <sub>etanol</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<b>Rendimiento</b> (g <sub>etanol</sub> g <sub>celulosa</sub> <sup>-1</sup> )
<b>2</b>	0.10	0.462
<b>3</b>	0.11	0.442
<b>6</b>	0.20	0.420
<b>8</b>	0.32	0.44
<b>10</b>	0.39	0.439

Los resultados obtenidos con la implementación de un proceso SimSF a partir de bagazo de caña y cóctel enzimático Celluclast® son equiparables a los obtenidos por Teran-Hilares *et al.* (2017) quienes obtuvieron un rendimiento de 0.48 g<sub>EtOH</sub> g<sub>celulosa</sub><sup>-1</sup> usando bagazo de caña (**Tabla 8**), sin embargo, en ese trabajo el coctel enzimático utilizado era rico en β-glucosidasa a diferencia del empleado en el presente trabajo, además de que también se fermentó la xilosa presente en la materia prima. La implementación de un cóctel libre de β-glucosidasa reduce provee la posibilidad de obtener un segundo producto en el proceso, un cóctel enzimático ahora enriquecido con β-glucosidasa. Así mismo, la concentración de etanol obtenida en este trabajo es 23 y 16% superior a lo reportado por Won-Heong & Yong-Su (2017) y Ding *et al.* (2018) respectivamente, el rendimiento del etanol obtenido independientemente del sustrato lignocelulósico usado, fue 15 y 13% superior a lo reportado por los mismos autores.

Tabla 8 Producción de etanol mediante procesos SimSF a partir de sustratos celulósicos de segunda generación con *S. cerevisiae*.

		<b>Sustrato</b>	<b>Etanol g L<sup>-1</sup></b>	<b>Rendimiento (g<sub>EtOH</sub> g<sub>celulosa</sub><sup>-1</sup>)</b>	<b>Productividad (g<sub>etanol</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Proceso SimSF</b>	<b><i>S. cerevisiae</i></b>	Rastrojo de maíz (10%)	14.6	0.247	0.21	Won-Heong & Yong-Su (2017)
			24	0.38	0.25	Ding <i>et al.</i> 2018
		Rastrojo de maíz (20%)*	59.8	0.39	0.63	Zhi-Hua & Hong-Zhang (2016)
		Bagazo de caña (5%)*	17.26	0.48	0.19	Terán- Hilares <i>et al.</i> (2017)
		Bagazo de caña (10%)	28.57	0.439	0.39	Este trabajo

## 8.- Conclusión

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

- El pH y la temperatura no tienen un impacto significativo en la producción de etanol a partir de celobiosa por *S. cerevisiae* RP2-BGL bajo las condiciones evaluadas.
- La estandarización de condiciones de operación permitió incrementar los rendimientos y productividades del proceso.
- El modelo matemático de tipo Haldane propuesto posee capacidad descriptiva por lo cual puede ser usado para la simulación del proceso bajo el intervalo de condiciones evaluadas.
- El cambio de régimen de operación de cultivo por lote a lote alimentado con alimentación exponencial favoreció el incremento en un 470% de la concentración de etanol ( $28.5 \text{ g L}^{-1}$ ) a partir de celobiosa.
- Con las condiciones de operación establecidas, se logró implementar el proceso SimSF alcanzando una concentración máxima de etanol de  $28.57 \text{ gL}^{-1}$  con un rendimiento de  $0.439 \text{ gEtOHg}_{\text{celulosa}}^{-1}$  y productividad de  $0.39 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a partir de bagazo de caña y *S. cerevisiae* RP2-BGL. Estos resultados son equiparables con los reportados en la literatura.

## 9.-Bibliografía

Alternative Fuels Data Center. Consultado en Enero 2018

Avanthi A, Lohit K, Srinivas G, Rintu B, (2017) Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production, In *Bioresource Technology*, Volume 245, Part A, Pages 530-539, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.140>.

Balat, M., & Balat, H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, 86(11), 2273–2282. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.03.015>

Cardona, C. A., & Sánchez O. J. (2008). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98(12), 2415–2457. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.002>

Cardona, C. A., Quintero, J. A., & Paz, I. C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource technology*, 101(13), 4754-4766.

Castillo Guerra, D. A., Viteri Flórez, P. A., & Viteri Rosero, S. E. (2015). DEVELOPMENT AND EVALUATION OF AN INOCULUM OF CELLULOLYTIC FUNGI. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(1), 217-226.

Cheng N., Koda K., Tamai Y., Yamamoto Y., Takasuja T., Uraki Y., (2017) Optimization of simultaneous saccharification and fermentation conditions with amphipatic lignin derivatives for concentrated bioethanol production, *Biores. Tech.*, 232, 126-132.

Demirbas, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33(1), 1–18. <http://doi.org/10.1016/j.peccs.2006.06.001>

Demirbas, A. (2011). Competitive liquid biofuels from biomass. *Applied Energy*, 88(1), 17–28. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.07.016>

Ding J.,Liang G., Zhang K., Hong J., Zou S., Lu H., Ma Y., Zhang M. Extra metabolic burden by displaying over secreting: Growth, fermentation and enzymatic activity in cellobiose of recombinant yeast expressing  $\beta$ -glucosidase, *Bioresour Technol*, Vol. 254, 107-114 DOI: 10.1021/jf0705264

Elliston A., Collins S., Wilson D., Roberts I., Waldron K., (2013) High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper, *Bior. Tech*, 134, 117-126.

Eriksson, T.; Borjesson, J.; Tjerneld, (2002)Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose.*Enzyme Microb. Technol.* , **31**, 353–364.

Eun Joong Oh, Suryang Kwak, Won-Heong Lee, Yong-Su Jin,(2017) Improved ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a mutated cellobiose transporter during simultaneous saccharification and fermentation, In *Journal of Biotechnology*, Volume 245, , Pages 1-8, ISSN 0168-1656, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.018>.

Guo, Z. P., Duquesne, S., Bozonnet, S., Cioci, G., Nicaud, J. M., Marty, A., & O'Donohue, M. J. (2017). Conferring cellulose-degrading ability to *Yarrowia lipolytica* to facilitate a consolidated bioprocessing approach. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 132.

Gutierrez J., Pérez J., Rueda C. (2005) Modelamiento de sistemas biológicos usando cálculos de procesos concurrentes. *Epíclis*

Haagensen, F., & Ahring, B. K. (2002). Enzymatic hydrolysis and glucose fermentation of wet oxidized sugarcane bagasse and rice straw for bioethanol production. *Riso-R-1517 (EN)*, 1, 184-195.

Hadiyanto, Ariyanti D., Puspita A., Pinundi D., (2014), Optimization of ethanol Production from Whey Through Fed-Batch Fermentation Using *Kluyveromyces marxianus*. In *Energy Procedia*, 47, 108-112.

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidn, G., & Zacchi, G. (2006). Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12), 549–556. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>

Howard, R. L., Abotsi, E. L. J. R., Van Rensburg, E. J., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 602-619.

IEA, Internacional Energy Agency, Oil Market Report Enero 2018

J. Goldemberg, The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for Biofuels* 2008, vol. 1, ch. 6, , DOI:10.1186/1754-6834-1-6,

J.M. Hernández-Salas, M.S. Villa-Ramírez, J.S. Veloz-Rendón, K.N. Rivera-Hernández, R.A. González-César, M.A. Plascencia-Espinosa, S.R. Trejo-Estrada,(2009) Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse, *Bioresource Technology*, Volume 100, Issue 3, , Pages 1238-1245, ISSN 0960-8524, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.062>.

José C. Del Río,\*†, Gisela Marques,†, Jorge Rencoret,†, Ángel T. Martínez,‡ and, and Ana Gutiérrez†(2007) Occurrence of Naturally Acetylated Lignin Units *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (14), 5461-5468

Kim, Yong-Su Jin, (2017) Transporter engineering for cellobiose fermentation under lower pH conditions by engineered *Saccharomyces cerevisiae*, In *Bioresource Technology*, Volume 245, Part B, , Pages 1469-1475, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.138>.

Li Z., Dewan A., Nazmul M. Optimization of Bioethanol Production in Fed-batch Fermentation 8<sup>th</sup> IFAC Symposium on Advanced Control of Chemical Processes (2012)

Martin, C., Almazan, O., Marcet, M., & Jonsson, L. J. (2007). A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. *International Sugar Journal*, 1297, 33.

Martynova J., Mednis M., Vigants A., Zikmanis P., (2017) Kinetic modeling of ethanol fermentation by yeast *Kluyveromyces marxianus* from lactose- and inulin- containing substrates. In *Engineering for Rural Development*

Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*, 31, 426-428.

Ozioko, P. C., Eze, S. O. O., & Chilaka, F. C. (2013). Partial purification and characterization of cellulases from digestive tracts of the African giant snail (*Achatina achatina*). *Turkish Journal of Biology*, 37(2), 199-205.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. et al. *Int Microbiol* (2002) 5: 53. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>

Ponce-Noyola, T., & De la Torre, M. (1995). Isolation of a high-specific-growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. *Applied microbiology and biotechnology*, 42(5), 709-712.

Prasad, S., Singh, A., & Joshi, H. C. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 50(1), 1–39. <http://doi.org/10.1016/j.resconrec.2006.05.007>

Ríos-Fránquez, F.J., González-Bautista, E., Ponce-Noyola, T. et al. *Arch Microbiol* (2017). doi:10.1007/s00203-016-1333-2

Rojas-Rejón, O.A., Poggi-Varaldo H.M., Ramos-Valdivia, A.C., Martínez-Jiménez A., Cristiani-Urbina, E., de la Torre Martínez M., Ponce-Noyola T. (2011). Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from PR-22 of *Cellulomonas flavigena*. *J Ind Biotechnol* Jan. 38:257-64.

Rubin EM (2008) Genomics of cellulose biofuels. *Nature* 4: 841-845.

Sánchez, O. J., & Cardona, C. A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 30(11), 22–47.

Sendelius, J. (2005). Steam pretreatment optimisation for sugarcane bagasse in bioethanol production. *Master of Science Thesis. Department of Chemical Engineering, Lund University, Sweden.*

Sharma, A., Tewari, R., Rana, S.S. et al. *Appl Biochem Biotechnol* (2016) 179: 1346. doi:10.1007/s12010-016-2070-3

Stöcker M (2008) Biofuels and Biomass-To-Liquid Fuels in the Biorefinery: Catalytic Conversion of Lignocellulosic Biomass Using Porous Materials *Angew Chem* Vol. 47 Issue 48.

Ruly Terán Hilares, João Vitor Ienny, Paulo Franco Marcelino, Muhammad Ajaz Ahmed, Felipe A.F. Antunes, Silvio Silvério da Silva, Júlio César dos Santos,(2017),Ethanol production in a simultaneous saccharification and fermentation process with interconnected reactors employing hydrodynamic cavitation-pretreated sugarcane bagasse as raw material,*Bioresource Technology*,Volume 243,Pages 652-659,ISSN 0960-8524,<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.159>.

Tomás-Pejó, E., Oliva, J. M., González, A., Ballesteros, I., & Ballesteros, M. (2009). Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel*, 88(11), 2142-2147.

Tu, M., Chandra, R. P., & Saddler, J. N. (2007). Recycling cellulases during the hydrolysis of steam exploded and ethanol pretreated lodgepole pine. *Biotechnology progress*, 23(5), 1130-1137.

van Rooyen R, Hahn-Hagerdal B, La Grange DC, van Zyl WH (2005) Construction of cellobiose-growing and fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Biotechnol* 120:284–295

Waldron KW (2010) Bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass. Woodhead Publishing Series in Energy: Number 3

Yang, P., Guo, L., Cheng, S., Lou, N., & Lin, J. (2011). Recombinant multi-functional cellulase activity in submerged fermentation of lignocellulosic wastes. *Renewable energy*, 36(12), 3268-3272.

Yu Shen, Yan Zhang, Tao Ma, Xiaoming Bao, Fengguang Du, Guoqiang Zhuang, Yinbo Qu,(2008) Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing  $\beta$ -glucosidase, *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 11, , Pages 5099-5103, ISSN 0960-8524, <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.046>.

Zhang, Y. H. P., Ding, S. Y., Mielenz, J. R., Cui, J. B., Elander, R. T., Laser, M., ... & Lynd, L. R. (2007). Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 97(2), 214-223.

Zhi-Hua Liu, Hong-Zhang Chen (2016, ), Simultaneous saccharification and co-fermentation for improving the xylose utilization of steam exploded corn stover at high solid loading,

Bioresource Technology, Volume 201, Pages 15-26, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.023>.

Zhong-peng Guo, Liang Zhang, Zhong-yang Ding, Zheng-hua Gu, Gui-yang Shi, (2011) Development of an industrial ethanol-producing yeast strain for efficient utilization of cellobiose, In *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 49, Issue 1, Pages 105-112, ISSN 0141-0229, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.02.008>.

## 10.- Anexos

### 10.1 Análisis de varianza celobiosa residual

#### ANOVA for Response Surface Quadratic model

##### Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	
Block	0.020	1	0.020			
Model	1535.46	9	170.61	40.70	< 0.0001	significant
<i>A-Agitaci</i>	2.55	1	2.55	0.61	0.4454	
<i>B-Celobiosa</i>	1256.21	1	1256.21	299.67	< 0.0001	
<i>C-Inoculo</i>	97.21	1	97.21	23.19	0.0001	
<i>AB</i>	7.67	1	7.67	1.83	0.1921	
<i>AC</i>	2.21	1	2.21	0.53	0.4763	
<i>BC</i>	41.61	1	41.61	9.93	0.0053	
<i>A<sup>2</sup></i>	3.82	1	3.82	0.91	0.3519	
<i>B<sup>2</sup></i>	125.14	1	125.14	29.85	< 0.0001	
<i>C<sup>2</sup></i>	46.35	1	46.35	11.06	0.0036	
Residual	79.65	19	4.19			
<i>Lack of Fit</i>	79.47	17	4.67	54.01	0.0183	significant
<i>Pure Error</i>	0.17	2	0.087			
Cor Total	1615.13	29				

## 10.2 Análisis de varianza etanol final

### Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Block	0.34	1	0.34			
Model	360.92	9	40.10	11.63	< 0.0001	significant
<i>A-Agitaci</i>	<i>0.051</i>	<i>1</i>	<i>0.051</i>	<i>0.015</i>	<i>0.9041</i>	
<i>B-Celobiosa</i>	<i>292.63</i>	<i>1</i>	<i>292.63</i>	<i>84.85</i>	<i>&lt; 0.0001</i>	
<i>C-Inoculo</i>	<i>18.37</i>	<i>1</i>	<i>18.37</i>	<i>5.33</i>	<i>0.0324</i>	
<i>AB</i>	<i>2.82</i>	<i>1</i>	<i>2.82</i>	<i>0.82</i>	<i>0.3775</i>	
<i>AC</i>	<i>0.27</i>	<i>1</i>	<i>0.27</i>	<i>0.077</i>	<i>0.7845</i>	
<i>BC</i>	<i>2.07</i>	<i>1</i>	<i>2.07</i>	<i>0.60</i>	<i>0.4485</i>	
<i>A<sup>2</sup></i>	<i>6.91</i>	<i>1</i>	<i>6.91</i>	<i>2.00</i>	<i>0.1731</i>	
<i>B<sup>2</sup></i>	<i>41.85</i>	<i>1</i>	<i>41.85</i>	<i>12.13</i>	<i>0.0025</i>	
<i>C<sup>2</sup></i>	<i>17.05</i>	<i>1</i>	<i>17.05</i>	<i>4.94</i>	<i>0.0385</i>	
Residual	65.53	19	3.45			
<i>Lack of Fit</i>	<i>65.47</i>	<i>17</i>	<i>3.85</i>	<i>123.55</i>	<i>0.0081</i>	<i>significant</i>
<i>Pure Error</i>	<i>0.062</i>	<i>2</i>	<i>0.031</i>			
Cor Total	426.79	29				

### 10.3 Análisis de varianza rendimiento

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Block	1.325E-003	1	1.325E-003			
Model	0.20	9	0.022	1.48	0.2255	not significant
<i>A-Agitaci</i>	2.314E-003	1	2.314E-003	0.16	0.6957	
<i>B-Celobiosa</i>	0.023	1	0.023	1.60	0.2211	
<i>C-Inoculo</i>	8.224E-005	1	8.224E-005	5.605E-003	0.9411	
<i>AB</i>	8.701E-004	1	8.701E-004	0.059	0.8102	
<i>AC</i>	1.059E-005	1	1.059E-005	7.216E-004	0.9788	
<i>BC</i>	2.675E-003	1	2.675E-003	0.18	0.6742	
<i>A<sup>2</sup></i>	5.366E-003	1	5.366E-003	0.37	0.5525	
<i>B<sup>2</sup></i>	0.11	1	0.11	7.69	0.0121	
<i>C<sup>2</sup></i>	6.607E-004	1	6.607E-004	0.045	0.8342	
Residual	0.28	19	0.015			
<i>Lack of Fit</i>	0.28	17	0.016	937.72	0.0011	significant
<i>Pure Error</i>	3.497E-005	2	1.749E-005			
Cor Total	0.48	29				

## 10.4 Validación del modelo

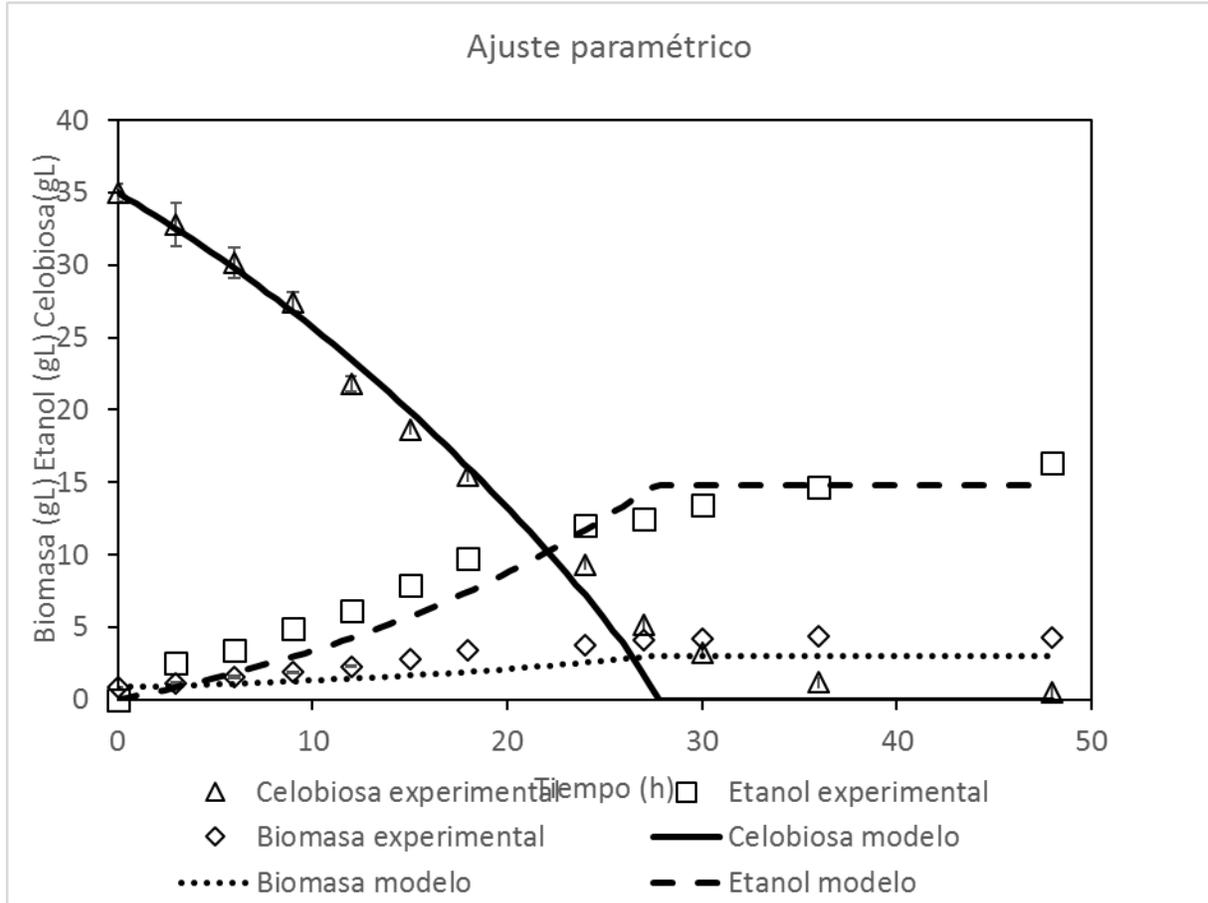


Figura A4. 1 Validación del modelo de Haldane con producción de etanol parcialmente asociada al crecimiento y término de mantenimiento celular contra datos experimentales ( $S_0=35 \text{ gL}^{-1}$ ,  $X_0= 0.85 \text{ gL}^{-1}$ )  $R^2=0.96$

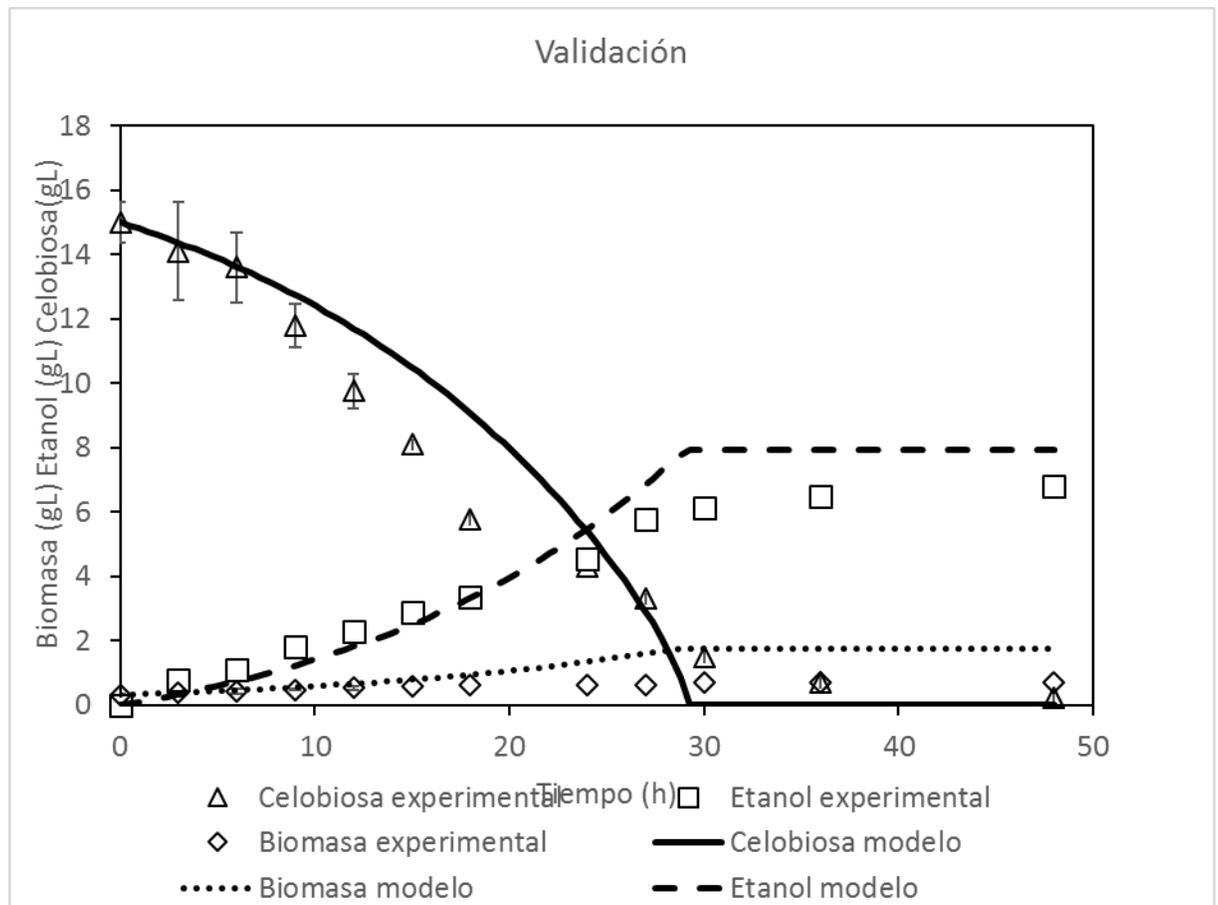


Figura A4. 2 Validación del modelo de Haldane con producción de etanol parcialmente asociada al crecimiento y término de mantenimiento celular contra datos experimentales ( $S_0=15 \text{ gL}^{-1}$ ,  $X_0= 0.33 \text{ gL}^{-1}$ )  $R^2=0.90$

### 10.5 Ecuación para la alimentación exponencial

$$r'_x = \left[ \frac{\mu_{max} S}{k_s + S + \left(\frac{S^2}{k_{is}}\right)} \left( 1 - \left(\frac{p}{k_{ip}}\right) \right) \right] - k_d \quad [1]$$

$$r'_p = \alpha(r'_x) + \beta \quad [2]$$

$$r'_s = \left( \frac{r'_x}{Y_{x/s}} \right) + \left( \frac{r'_p}{Y_{p/s}} \right) + \gamma \quad [3a]$$

$$r'_s = \left( \frac{\left[ \frac{\mu_{max} S}{k_s + S + \left(\frac{S^2}{k_{is}}\right)} \left( 1 - \left(\frac{p}{k_{ip}}\right) \right) \right] - k_d}{Y_{x/s}} \right) + \left( \frac{\alpha(r'_x) + \beta}{Y_{p/s}} \right) + \gamma \quad [3b]$$

Para determinar la alimentación en lote alimentado exponencial:

- $r'_x$  Es constante y fijada a un valor determinado.
- Se mantiene una concentración de sustrato constante\* ( $\frac{ds}{dt} = 0$ )

$$\frac{d(XV)}{dt} = r'_x XV \quad [4]$$

Reordenando [4]

$$\frac{d(XV)}{dt} \left( \frac{1}{XV} \right) = r'_x \quad [5]$$

Integrando [5]

$$\ln \frac{XV}{X_0 V_0} = r'_x t - r'_x t_0 \quad [6]$$

$$\frac{XV}{X_0 V_0} = e^{r'_x t - r'_x t_0} \quad [7]$$

$$XV = e^{r'_s t - r'_s t_0} X_0 V_0 \quad [8]$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = -|r'_s|XV + FS_\alpha \quad [9]$$

$$S \frac{dV}{dt} + V \frac{dS}{dt} = -|r'_s|XV + FS_\alpha \quad [10]$$

Definiendo:

$$\frac{dV}{dt} = F \quad [11]$$

Sustituyendo [11] y [8] en [10]

$$SF + V \frac{dS}{dt} = -r'_s e^{r'_s t - r'_s t_0} X_0 V_0 + FS_\alpha \quad [12]$$

Considerando que  $\frac{dS}{dt} = 0$

$$SF = -r'_s e^{r'_s t - r'_s t_0} X_0 V_0 + FS_\alpha \quad [13]$$

Reorganizando [13]

$$r'_s e^{r'_s t - r'_s t_0} X_0 V_0 = FS_\alpha - FS \quad [14]$$

Despejando F

$$F = \frac{r'_s e^{r'_s t - r'_s t_0} X_0 V_0}{S_\alpha - S} \quad [15]$$

## 10.6 Ecuación empírica para determinar la cédula de alimentación

Partiendo de las ecuaciones planteadas en el Anexo 5

$$r'_x = m$$

Con base en los datos experimentales se puede determinar el valor de la acumulación de sustrato respecto al tiempo cuando esta no es igual a 0 y obtener el valor constante de este de la siguiente forma:

$$\bar{S} \cong \frac{S_{j+1} - S_{j-1}}{2h} \quad [1]$$

Definiendo  $S$ :

$$S \cong S_0 + \bar{S}t \quad [2]$$

Partiendo del balance de masa para sustrato en un lote alimentado exponencialmente:

$$V\bar{S} = V_0X_0 - |r'_s|exp + F(S_a - S)$$

[3]

Definiendo:

$$V = \frac{dF}{dt}$$

[4]

$$\frac{dF}{dt} = \frac{V_0X_0 - |r'_s|exp + F(S_a - S)}{\bar{S}}$$

[5]

Desarrollando

$$\frac{dF}{dt} = -\frac{S_a F}{\bar{S}} + \frac{SF}{\bar{S}} + |r'_s|V_0X_0 \exp(mt) \quad [6]$$

Definiendo

$$\frac{S_a}{S} = m_1; \quad |r'_s|V_0X_0 = m_2; \quad \frac{S}{S} = m_3; \quad m_1 + m = m_4$$

Sustituyendo en [6]

$$\frac{dF}{dt} + m_4F + tF + m_2 \exp(m_5t) = 0 \quad [6]$$