UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

“Producción de bioetanol a partir de bagazo de maguey mezcalero (*Agave angustifolia* **Haw), mediante sacarificación y fermentación simultánea”**

POR
GUADALUPE LÓPEZ MARTÍNEZ

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES

TORREÓN, COAHUILA **DICIEMBRE DE 2014**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

"Producción de bioetanol a partir de bagazo de maguey mezcalero (*Agave angustifolia* Haw), mediante sacarificación y fermentación simultánea"

POR
GUADALUPE LÓPEZ MARTÍNEZ

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES

APROBADA POR

ASESOR PRINCIPAL: _____
DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO

ASESOR: _____
M.C. CARLOS EFRÉN RAMÍREZ CONTRERAS

ASESOR: _____
DR. JOSÉ LUIS REYES CARRILLO

ASESOR _____
DR. ALFREDO OGAZ

_____
DRA. MA. TERESA VALDÉS PÉREZGASGA
COORDINADORA INTERINA DE LA DIVISIÓN DE
CARRERAS AGRONÓMICAS

Coordinación de la División de Carreras Agronómicas

TORREÓN, COAHUILA DICIEMBRE DE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

"Producción de bioetanol a partir de bagazo de maguey mezcalero (*Agave angustifolia* Haw), mediante sacarificación y fermentación simultánea"

POR
GUADALUPE LÓPEZ MARTÍNEZ

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES

APROBADA POR

PRESIDENTE: _____
DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO

VOCAL: _____
M.C. CARLOS EFREN RAMÍREZ CONTRERAS

VOCAL: _____
DR. JOSÉ LUIS REYES CARRILLO

VOCAL SUPLENTE: _____
DR. ALFREDO OGAZ

_____
DRA. MA. TERESA VALDÉS PÉREZGASGA
COORDINADORA INTERINA DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

Coordinación de la División de Carreras Agronómicas

TORREÓN, COAHUILA DICIEMBRE DE 2014

AGRADECIMIENTOS

A la universidad autónoma agraria Antonio Narro Unidad Laguna, por ser parte de mi formación académica.

Al Dr. Jesús Vásquez Arroyo por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación bajo su asesoría, por su paciencia y dedicatoria para poder sacar adelante este proyecto.

Al comité de asesoría: M.C. Carlos Efrén Ramírez Contreras, al Dr. José Luis Reyes Carrillo y al Dr. Alfredo Ogaz, por su tiempo y sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al Laboratorio de procesos Biotecnológicos del Instituto Tecnológico de Durango por las facilidades para llevar acabo mi proyecto de tesis muy especialmente al Dr. Javier López Miranda y a la M. en C. Perla Guadalupe por su apoyo incondicional y asesoría.

A la profesora María Cruz Teresa Moorillon Piedra, por su infinito apoyo incondicional e indispensable, por su valioso tiempo invertido en mi proyecto, muchas gracias.

A los ingenieros Oscar Rentería Martínez y Ana Karen Sánchez Castañeda por su incondicional asesoría indispensable para poder sacar adelante mi proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A DIOS

Por darme la oportunidad de vivir y la salud para lograr mis objetivos, por su amor incondicional y su infinita bondad, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte durante todo el periodo de estudio.

A MI MADRE FRANCISCA MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Por tu esfuerzo y dedicación apoyándome siempre a salir a delante, gracias por enseñarme a enfrentar los problemas con fe y carácter, por los sacrificios y el esfuerzo que realizaste para hoy yo poder ser quien soy, inculcándome siempre valores y principios. Me siento orgullosa de ser tu hija y agradecida con Dios por darme una madre como tú, mil gracias Mami.

A IGNACIO MIRANDA RAMÍREZ

Por tu apoyo y amor incondicional, por alentarme siempre a continuar cuando deseaba rendirme, gracias por ser mi inspiración y por estar siempre ahí para mí, por tu noble corazón e increíble bondad, gracias por todo.

A MIS AMIGOS

Por compartir junto a mi buenos y malos momentos, por su apoyo incondicional, por su complicidad, por creer en mí y alentarme a continuar siempre.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO iii

ÍNDICE DE FIGURAS v

ÍNDICE DE CUADROS vi

RESUMEN vii

ABSTRACT viii

CAPITULO I 1

INTRODUCCIÓN 1

1.1 Objetivos 3

1.1.2 Objetivo general 3

1.1.3 Objetivo específico 3

1.1.4 Hipótesis 3

CAPITULO II 4

REVISIÓN DE LITERATURA 4

2.1 El cultivo del *Agave* 4

2.1.2 Diagrama del proceso de elaboración de mezcal 6

2.2 Generación del bagazo de *agave* 9

2.3 Composición de la materia lignocelulósica 10

2.3.1 Material lignocelulósico 10

2.3.2 Celulosa 11

2.3.3 Hemicelulosa 11

2.3.4 Lignina 12

2.4 Pretratamiento 13

2.4.1 a) Ácido 13

2.4.2 b) Alcalino 14

2.5 Hidrolisis enzimática 15
2.5.1 Celulasas 15
2.6 Microorganismos para la producción de etanol 16
2.7 Fermentación alcohólica 17
2.8 Energías alternativas 18
2.8.1 Biocombustibles 18
2.8.2 Biogás 19
2.8.3 Biodiesel 20
2.8.4 Bioalcohol 20
2.9 Aplicación del bioetanol 22
2.10 Sacarificación y fermentación simultanea 22
CAPÍTULO III 24
MATERIALES Y MÉTODOS 24
3.1 Lugar de estudio 24
3.2 Materia prima 24
3.3. Material biológico 24
3.4. Preparación y caracterización de la materia prima 25
3.4.1 Molienda 25
3.4.2 Determinación de contenido lignocelulósico 25
3.5 Determinación de humedad y cenizas 26
3.5.1 Humedad 26
3.5.2 Cenizas 26
3.6 Pretratamiento 26
3.7 Determinación de azúcares reductores 27
3.7.1 Curva patrón de glucosa 27

3.7.2 Determinación de la concentración de azúcares reductores 28
3.8 Determinación de la actividad enzimática..... 28
3.9 Activación de la Levadura..... 30
3.10 Sacarificación y fermentación simultanea..... 30
3.10.1 Diseño Experimental..... 31
3.11 Determinación de etanol..... 31
3.11.1 Curva tipo para determinación de etanol 32
CAPÍTULO IV 33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 33
4.1 Molienda y tamizado..... 33
4.2 Propiedades físico- químicas de la materia prima 33
4.3 Pretratamiento 34
4.4. Azúcares reductores del bagazo de *Agave angustifolia* Haw. 35
4.5 Activación de la levadura y preparación de inóculo 35
4.6 Sacarificación y fermentación simultánea..... 36
4.7 Determinación de etanol del experimento realizado 37
CONCLUSIÓNES 39
REFERENCIAS 40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Maguey *angustifolia* de la variedad espadín (Berumen-Barbosa, 2009) 4
Figura 2.-Diagrama de flujo de la producción de mezcal a partir de *Agave angustifolia* Haw. en México (Vázquez-Beltran, 2006). 8
Figura 3 -Estructura de la pared celular de la planta (Robledo-Olivo *et al.*, 2012). 10
Figura 4.Estructura química de la celulosa (Aroca, 2009). 11
Figura 5. Estructura química de la hemicelulosa (Aroca, 2009). 12

Figura 6 Estructura química de la lignina (Robledo-Olivo *et al.*, 2012). 12
Figura 7. Esquema que representa el cambio de la estructura del material lignocelulósico posterior a un tratamiento (Bhatia, 2012). 14
Figura 8. Mecanismo de acción de las celulasas (Aroca, 2009). 16
Figura 9. Integración de las etapas del proceso de producción de etanol (Vázquez-Ortega, 2013). 23

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Composición del bagazo residual de la industrial del mezcal (*agave angustifolia* haw.) (Rodríguez-Macías *et al.*, 2010). 5
Cuadro 2.- Principales estados productores de *agave* mezcalero en México (SAGARPA - SIAP, Marzo 2012). 6
Cuadro 3. Diluciones necesarias para la elaboración de la curva tipo. 28
Cuadro 4. Diseño experimental 31
Cuadro 5. Concentraciones necesarias para la curva tipo de etanol..... 32
Cuadro 6. Contenido lignocelulósico de diferentes especies..... 33
Cuadro 7. Contenido lignocelulósico una vez pretratado. 34
Cuadro 8. Promedio y desviación estándar de azúcares residuales 36
Cuadro 9. Resultados promedio (desviación estándar) de la producción de etanol a partir de bagazo de *Agave angustifolia.* 37

RESUMEN

El bagazo de *agave*, es un subproducto de la industria mezcalera, y como tal, causa contaminación del ambiente. Dicho recurso puede ser aprovechado para la producción de etanol por la vía de segunda generación. El objetivo de la presente investigación fue obtención de productos de valor agregado a partir de residuos lignocelulósicos de origen agropecuario. Se trabajó bajo las condiciones de sacarificación y fermentación simultánea para la producción de etanol. Se efectuó la caracterización química de la biomasa inicial y pretratada. Se aplicó un pretratamiento alcalino de hidróxido de sodio al 2%, calentando a 100°C durante 60 minutos. Para la SFS se utilizaron 2 g del bagazo pretratado, agregando 15, 20 y 25 UPF mL^{-1} de un complejo enzimático comercial (Celluclast 1.5 L NOVOZYMES®). Se inoculó el medio con una concentración inicial de $1x10^7$ células mL^{-1} de *Saccharomyces cerevisiae* con un volumen final de reacción de 30 mL^{-1}, pH de 4.7 y se agregaron 24.7, 24.3 y 23.9 mL^{-1} de medio extracto de levadura y peptona de caseína, incubando durante 48 horas a tres temperaturas (36, 38 y 40°C), con una agitación de 120 rpm. Se determinó la concentración de etanol producida por SFS mediante cromatografía de gases. La mayor producción de etanol se obtuvo con 25 UPF mL^{-1}, 36 ºC por 48 h (18.98 g L^{-1}).

Palabras claves: Biomasa**,** Lignocelulosa, Sacarificación, Fermentación, Bioetanol.

ABSTRACT

Agave bagasse is a byproduct from the industry of mezcal, and as such, it causes pollution to the environment. This product could be used as a raw material in ethanol production by way of second generation. The objective of this research was to obtain value-added products from lignocellulosic residues of agricultural origin. It was worked under conditions simultaneous saccharification and fermentation (SSF) for the production of ethanol. Chemical characterization of initial and pretreated biomass was performed. Alkaline pretreatment was applied using sodium hydroxide 2%, and heating at 100°C for 60 minutes. To carry out the process of SSF, 2 g of pretreated bagasse was used, adding 25, 20 and 25 FPU/mL^{-1} of a commercial enzyme complex (Celluclast 1.5 L NOVOZYMES®). The media was inoculated with an initial concentration of $1x10^{7}$ cells/ mL^{-1} of *Saccharomyces cerevisiae*. Leaving a final volume reaction of 30 mL^{-1}, 4.7 pH and 4.7 and 24.732, 24.322 y 23.92 mL^{-1} yeast extract and peptone media were added, incubating for 48 hours at three temperatures (36, 38 and 40°C, with an agitation of 120 rpm. The greatest production of ethanol obtained was 18.98 g L^{-1}, which was determined by gas chromatography method.

Key words: Biomass Lignocellulosic, Saccharification, Fermentation, Ethanol.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La problemática mundial que viene generando el carácter no renovable de los combustibles fósiles los cuales generan energía que es requerida diariamente en diversos sectores como son el transporte, la industria extractiva y de transformación, provocando la mayor contaminación atmosférica en los centros urbanos. Se ha generado preocupaciones en torno a la seguridad energética e impulsado fuertemente el desarrollo de procesos que usen materias primas renovables. La biomasa lignocelulósica es una fuente de energía primaria renovable y adecuada, ya que puede proporcionar algunas alternativas de combustibles para el transporte como el bioetanol a corto plazo (Ye Sun y Cheng, 2002).

En México el consumo en el sector de transporte creció en 10 años un 44.7%, equivalente a 306.4 millones de barriles de petroleo crudo equivalente (mbdpce). Para 2012, se ubicó en 992.0 mbdpce, 1.3% mayor respecto al consumo de 2011. Se estima que el 60 % del consumo mundial de energía industrial se produce en los países en desarrollo y economías en transición (Sener, 2013).

Dado el constante y necesario uso de la energía y frente al inminente agotamiento de las principales fuentes de energías, se han ido desarrollando soluciones como las conocidas energías alternativas las cuales son fuentes de energías renovables entre las cuales se encuentran: la energía eólica, solar, geotérmica, hidráulica, maremotriz, por mencionar algunas y la biomasa (Estupiñán-García, 2008).

La biomasa lignocelulósica y los residuos agroindustriales, incluyendo residuos de cultivos, pastos, aserrín y astillas de madera, lodos y excremento animal son una

alternativa de bajo costo para ser utilizadas como materia prima, la cual puede ser transformada enzimáticamente a azúcares fermentables para la subsecuente producción de biocombustibles. La biomasa, considerada como la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. Estos recursos pueden agruparse de forma general como subproductos agrícolas y forestales (Juri-Awad, 2011).

La industria mezcalera de Oaxaca produce anualmente 122, 696 toneladas de bagazo o desecho, que es vertido en ríos, arroyos o utilizado mínimamente como combustible en hornos ladrilleros (Berumen-Barbosa, 2009).

A pesar de la gran cantidad de bagazo producido por año en el estado de Oaxaca, actualmente no se tienen estudios de la utilización de este material como bioetanol combustible. Sin embargo, por sus características físicas y químicas, además de su disponibilidad anual y abundancia, tiene amplias posibilidades de ser utilizado como biomasa.

1.1 Objetivos

1.1.2 Objetivo general

Obtención de productos de valor agregado a partir de residuos lignocelulósicos de origen agropecuario.

1.1.3 Objetivo específico

Obtención de etanol mediante SFS a partir de bagazo de maguey mezcalero *agave angustifolia* Haw.

1.1.4 Hipótesis

Ho = El bagazo de maguey es un sustrato apropiado para la producción de bioetanol, para la producción de bioetanol como biocombustible.

Ha = El bagazo de maguey no es un sustrato apropiado para la producción de bioetanol, para la producción de bioetanol como biocombustible.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cultivo del *Agave*

Las agaváceas, comúnmente llamadas “magueyes”, forman parte de la familia de las monocotiledóneas, cuenta con nueve géneros y aproximadamente 330 especies, siendo endémica del continente Americano (Produce, 2012).

En este entorno geográfico, es precisamente México, el país que tiene la mayor riqueza y diversidad, localizándose 251 especies, es decir, 76 por ciento de las descritas en el mundo y 177 especies con endemismo. Bajo este marco, es el estado de Oaxaca, el más rico en agaváceas en el país, con 58 especies, de ellas 13 son especies endémicas, equivalente al 22 por ciento (Figura 1) (Berumen-Barbosa, 2009).

Figura 1.- Maguey *angustifolia* de la variedad espadín (Berumen-Barbosa, 2009)

En los Valles Centrales y Sierra Sur del estado de Oaxaca, México, se encuentra la principal región del mezcal, donde se cultivan aproximadamente 15,503 Ha. con *agave* spp. principalmente *A. angustifolia* Haw., cuya producción de 130 240 t de materia

prima sirven para la elaboración de 2.9 millones de litros de mezcal (Chagoya-Méndez, 2004).

Durante el proceso de extracción del mezcal, al final de la etapa de fermentación y destilación del tallo o piña, se elimina el bagazo de maguey. En el Cuadro 1 se puede apreciar el contenido lignocelulósico del bagazo de maguey.

Cuadro 1.- Composición del bagazo residual de la industrial del mezcal (*agave angustifolia* haw.) (Rodríguez-Macías *et al.*, 2010).

COMPONENTE	**%**
Celulosa	43
Hemicelulosa	19
Lignina	15
Nitrógeno total	3
Pectina	1
Azucares residuales	10
Otros	9
Total	100

México es el principal productor de mezcal, en el Cuadro 2 se muestras los principales estados productores del *agave* mezcalero con sus respectivas superficies, como podremos ver Oaxaca es el estado con la mayor producción del *agave* mezcalero y por tanto el mayor productor del mezcal en el país.

Cuadro 2.- Principales estados productores de *agave* mezcalero en México (SAGARPA - SIAP, Marzo 2012).

Estado	Superficie sembrada (Ha)	Superficie cosechada (Ha)	Producción Ton.	% de la superficie sembrada
Durango	237	N/D	N/D	0.15 %
Guanajuato	15419.99	1179	93166	9.50
Guerrero	327.94	133	6302.1	0.20
Michoacán	7277.01	6.5	845	4.48
Oaxaca	14759	5874	356402.44	9.09
San Luis Potosí	90	N/D	N/D	0.06
Tamaulipas	9872.42	5	400	6.08
Zacatecas	3962	410.5	29992.9	2.44

2.1.2 Diagrama del proceso de elaboración de mezcal

A continuación se presenta el diagrama general del proceso de elaboración del mezcal (Figura 2), el cual da origen al bagazo residual de maguey, cuya materia prima servirá en la producción de bioetanol. Proceso de elaboración del mezcal (Vázquez-Beltran, 2006):

Cocción de *agave* mezcalero: el proceso dura aproximadamente 8 horas. Molienda: En la fase de molienda se emplea agua, energía eléctrica y se genera bagazo que es apilado sin darle ningún uso esperando a ser tirado.

Fermentación: Esta fase se puede decir que es la parte medular de todo el proceso de elaboración de mezcal ya que es en ella donde se generan los alcoholes que posteriormente serán destilados. La fase de fermentación también es conocida como de descomposición, por el hecho de romper las moléculas de azucares formados en la

fase de cocción del maguey en alcoholes por medio de microorganismos que son los generadores del rompimiento de las moléculas de azucares en alcoholes, la energía eléctrica que se utiliza en esta etapa para bombear los jugos y separar éstos de mosto, el cual es removido tanto en la entrada como en la salida de los recipientes donde se lleva a cabo la fermentación.

Destilación: este proceso que consiste en destilar el mezcal, para lo cual se requiere tener una mezcla homogénea de alcoholes permitidos para consumo humano, de una mezcla de varios componentes, que entre ellos se encuentran las cetonas, acetonas, acetatos, alcoholes primarios que como el n-butanol, y el n-pentanol.

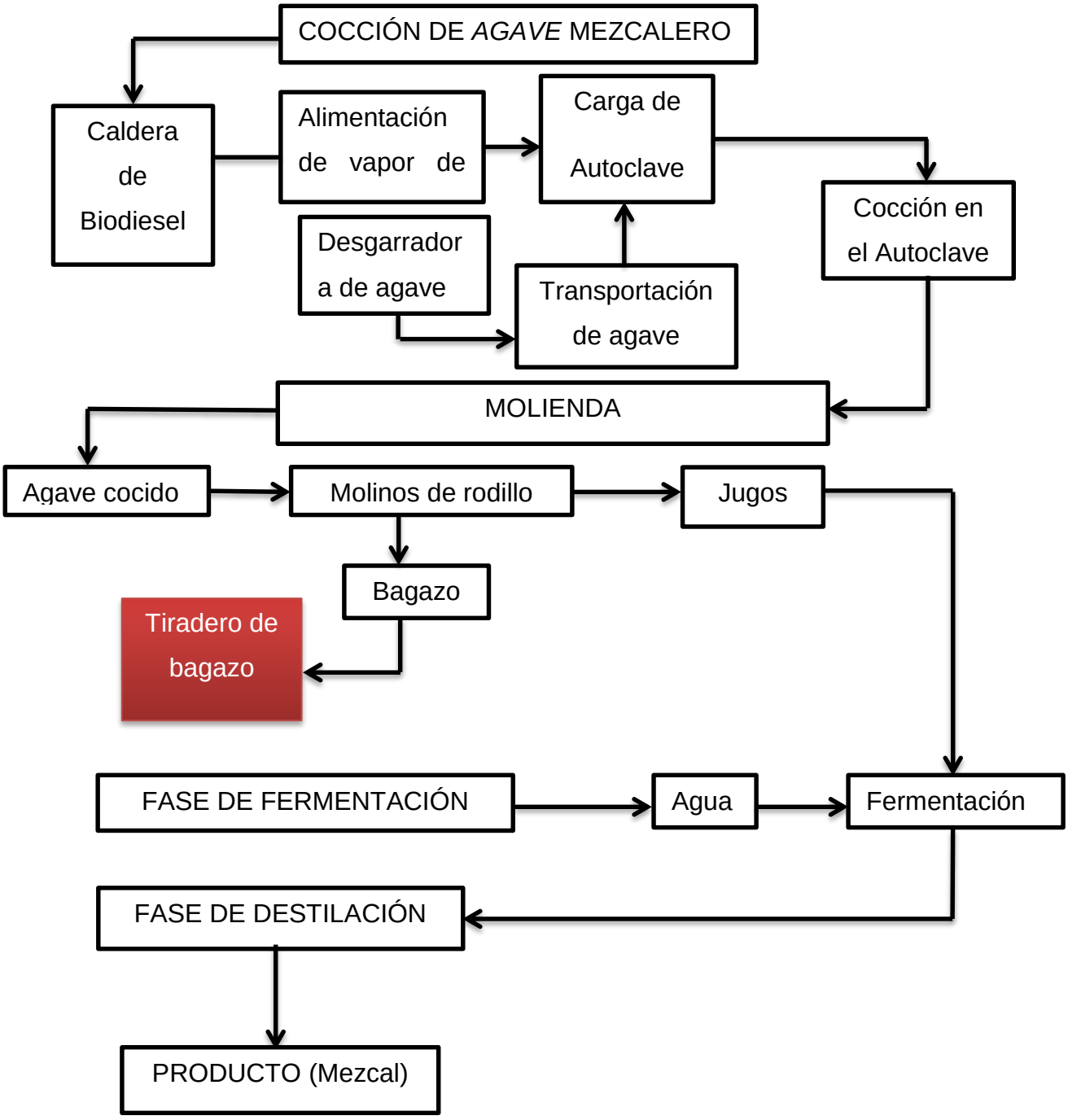

Figura 2.-Diagrama de flujo de la producción de mezcal a partir de *Agave angustifolia* Haw. en México (Vázquez-Beltran, 2006).

2.2 Generación del bagazo de *agave*

La industria mezcalera en México, particularmente en Oaxaca, es de suma importancia. La continua y creciente demanda del mezcal da lugar a la producción de millones de litros anuales de esta bebida. Sin embargo, aunado a este proceso de producción, se encuentra también la generación de residuos, siendo el bagazo de *agave* uno de los principales. Este desecho es la fibra residual que queda después de cocinar, moler y extraer el jugo fermentable de la piña del *Agave angustifolia* Haw. de la variedad espadín. El *agave angustifolia* Haw. llega a su estado de madures en un tiempo de 7 a 10 años, dependiendo de las condiciones del cultivo (López-Hernández, 2008).

La producción de bagazo de *agave* es equivalente al 40 % del peso de las cabezas de *agave* molidas. Si se considera que en el año 2008 se molieron 834 mil toneladas de *agave* (CRT 2008) se concluye que en tal sólo ese año se generaron 333600 toneladas de bagazo (Íñiguez *et al.*, 2011).

Anualmente se generan 4, 807,275 toneladas de bagazo o residuo, como material de desecho. Actualmente es vertido en áreas improductivas y/o arroyos. El volumen de este desecho es muy grande y esto se ha llegado a convertir en un problema ambiental y económico (Zarate -Altamirano, 2006).

Adicionalmente, el contenido de azucares remanentes es suficiente para la infestación por hongos y levaduras fermentadores, lo que genera malos olores y productos indeseables, siendo también un excelente hospedero para plagas (insectos y roedores) y enfermedades de plantas (Rodríguez *et al.*, 2010).

2.3 Composición de la materia lignocelulósica

2.3.1 Material lignocelulósico

Los materiales lignocelulósicos están integrados principalmente de tres constituyentes poliméricos: la celulosa, hemicelulosas (que en conjunto se les llama holocelulosa) y lignina los cuales están asociados los unos con los otros y son los que finalmente sirven de soporte estructural a la pared celular (Guarnizo-Franco *et al.*, 2009).

Estructura general de la pared celular de una planta (Figura 3). La lignocelulosa es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas *et al.*, 2007).

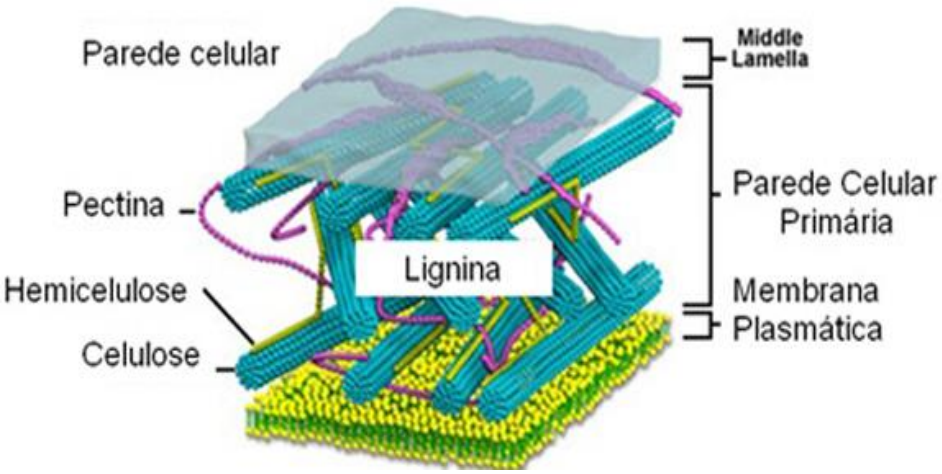

Figura 3 -Estructura de la pared celular de la planta (Robledo-Olivo *et al.*, 2012).

2.3.2 Celulosa

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β-1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Figura 4) (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005).

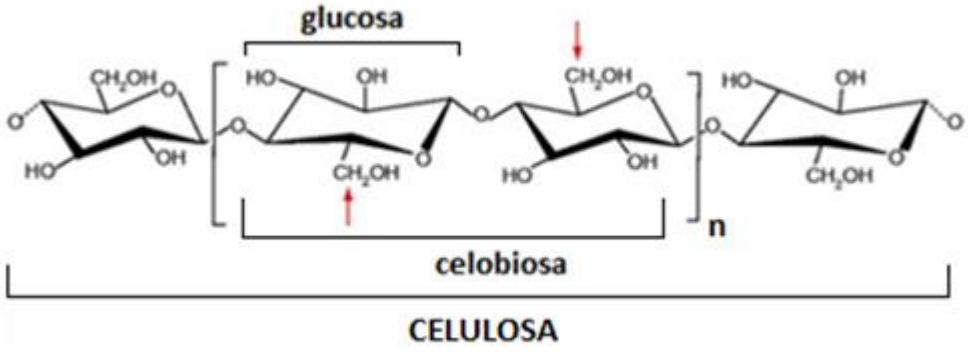

Figura 4. Estructura química de la celulosa (Aroca, 2009).

2.3.3 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4- O- etilglucurónico, D-galacturónico y Dglucurónico, los azúcares están unidos por enlaces β-1,4 y ocasionalmente por enlaces β-1,3 (Perez *et al.*, 2002).

La hemicelulosa (Figura 5), suele ser un polímero de menor masa molar que la celulosa y más fácilmente hidrolizable debido a su estructura predominantemente amorfa. Las hemicelulosas, al igual que la celulosa, se han perfilado como fuente de azúcares (Guarnizo-Franco *et al.*, 2009).

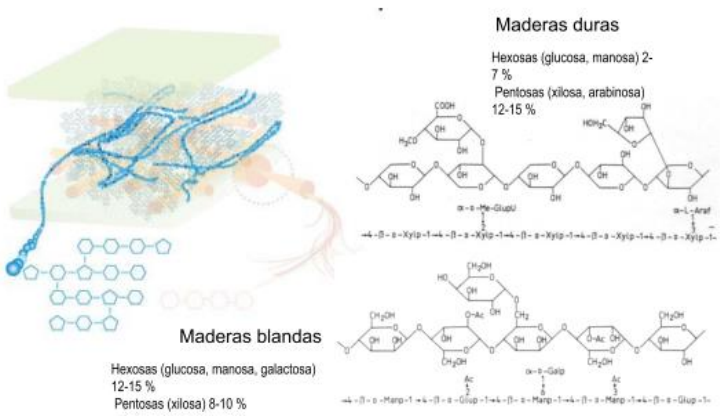

Figura 5. Estructura química de la hemicelulosa (Aroca, 2009).

2.3.4 Lignina

La lignina (Figura 6), es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro *et al.*, 2005).

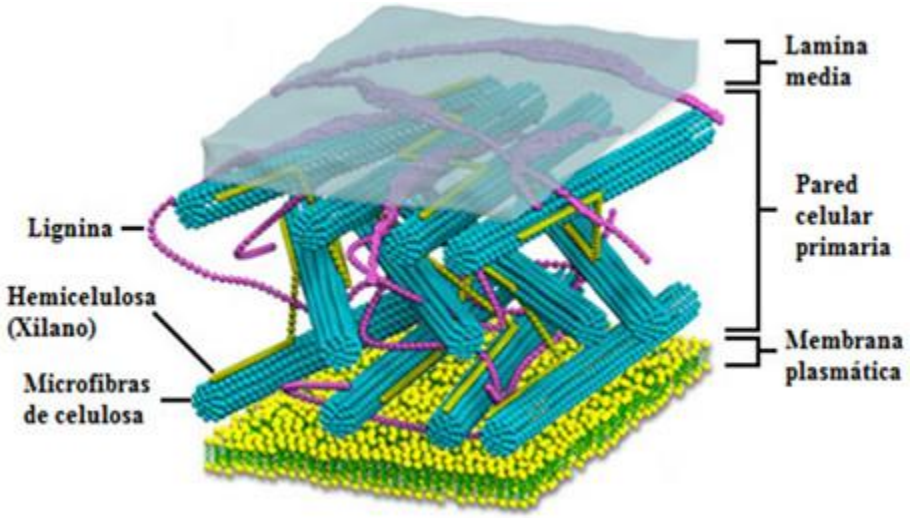

Figura 6 Estructura química de la lignina (Robledo-Olivo *et al.*, 2012).

2.4 Pretratamiento

Se le denomina pretratamiento al conjunto de acciones para mejorar el rendimiento en la obtención de azúcares fermentables desde la biomasa inicial. Cualquier mejora que se haga en los procesos mostrados debe reflejarse en un mayor rendimiento y economía en la obtención de etanol (Guarnizo-Franco *et al.*, 2009).

Una etapa de pretratamiento se realiza normalmente para reducir la obstinación por despolimerización y solubilización de hemicelulosa (aproximadamente 20 a 40% en peso por peso de la biomasa).Este paso convierte hemicelulosas a monosacáridos y oligosacáridos, que pueden hidrolizarse o fermentadas más.La eliminación de hemicelulosa de las microfibrillas se piensa para exponer el núcleo de celulosa cristalina, que luego puede ser hidrolizada por las enzimas de celulasa. Además, el tratamiento previo normalmente se rompe la rigidez macroscópica de la biomasa y disminuye las barreras físicas para el transporte de masa (Himmel *et al.*, 2007).

El pretratamiento puede ser:

2.4.1 a) Ácido

El pretratamiento ácido involucra el uso de ácido sulfúrico, nítrico y clorhídrico para remover la hemicelulosa y exponer la celulosa para la digestión enzimática. (Schell *et al.*, 2003). La principal reacción que se produce durante el pretratamiento ácido es la hidrólisis de hemicelulosa, sin embargo la hemicelulosa solubilizada (oligómeros) puede ser objeto de reacciones hidrolíticas y producir monómeros, furfural e Hidroximetil furfural (HMF). Durante el pretratamiento ácido se solubiliza la lignina rápidamente en entornos ácidos (Ramos *et al.*, 2003).

Los pretratamientos clásicos implican el uso de soluciones de ácido sulfúrico diluido, usualmente al 5 % con rendimientos del 100 % a 160 ºC, o concentrado, al 77 % a más baja temperatura con lo que se logra por hidrólisis ácida, la formación de azúcares (Guarnizo-Franco *et al.*, 2009).

2.4.2 b) Alcalino

El pretratamiento con NaOH diluido produce un hinchamiento de la biomasa, lo que conduce a un aumento del área superficial interna, un descenso de la cristalinidad, una separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos y una rotura de la estructura de la lignina (Figura 8) (Niño-López *et al.*, 2013).

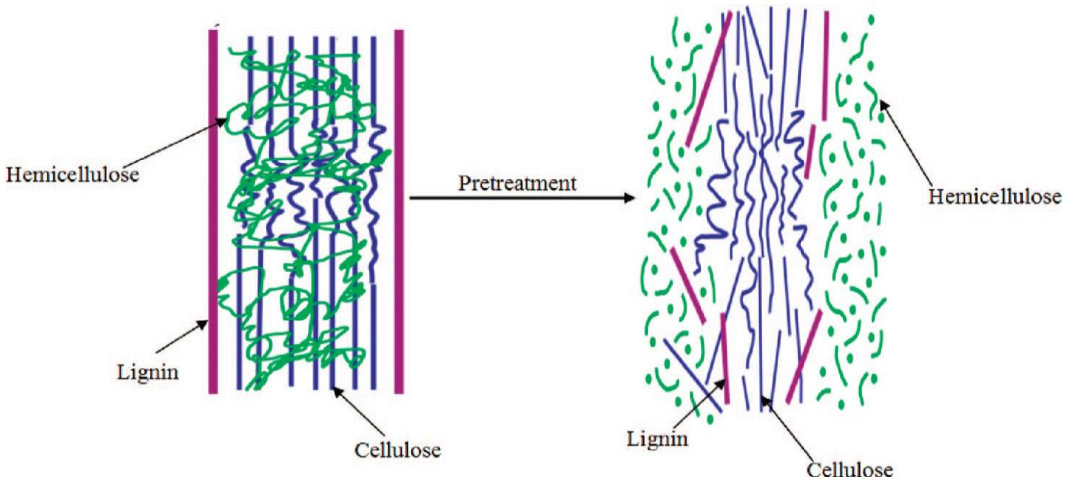

Figura 7. Esquema que representa el cambio de la estructura del material lignocelulósico posterior a un tratamiento (Bhatia, 2012).

Las condiciones para el pretratamiento alcalino suelen ser menos graves que otros tratamientos previos (Menon y Rao, 2012). Se han encontrado resultados favorables, utilizando hidróxido de sodio al 2 % con ebullición durante 60 minutos (Yue *et al.*, 2009).

2.5 Hidrolisis enzimática

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por sistemas multienzimáticos que atacan tanto a la celulosa como a la hemicelulosa de los materiales lignocelulósicos, actúan sinergísticamente, de alta termoestabilidad, alta afinidad por los sustratos, alta actividad específica y reducida adsorción no específica a la lignina. La hidrólisis enzimática de la biomasa consiste en tres pasos: adsorción de las enzimas sobre la superficie del sustrato específico, biodegradación del sustrato para liberar los azúcares fermentables, y desorción de las enzimas en algunos casos. La adsorción irreversible de las enzimas sobre sustratos no específicos (lignina) es parcialmente responsable de su desactivación. La hidrólisis de la celulosa produce glucosa y la de la hemicelulosa principalmente xilosa y arabinosa. Para la conversión de la fibra en azúcares se utilizan enzimas comerciales (Urribarrí-Cobo, 2011).

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinergísta de un grupo de enzimas llamadas celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa. Los hongos y bacterias anaerobias degradan la celulosa a través de celulosomas, habitan en aguas residuales y en el rumen y el tracto intestinal de los animales herbívoros e insectos como escarabajos y termitas (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005).

2.5.1 Celulasas

Las celulasas de origen fúngico, principalmente de los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium*, han sido las más estudiadas por la capacidad de estos microorganismos de producirlas en grandes cantidades y de forma extracelular, facilitando su separación en los medios de cultivo, del cual se obtienen básicamente una mezcla de celobiohidrolasas y endoglucanasas (Rodríguez *et al.*, 2010).

Hay tres tipos de celulasas: las **endoglucanasas** (EGs),que cortan azarosamente en regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos, esto causa la disminución en el largo de las cadenas y un incremento de los azúcares reductores; las **exoglucanasas o celobiohidrolasas** (CBHs), que actúan sobre los extremos reductor y no reductor de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa y **las β-glucosidasas**, que hidrolizan la celobiosa y las celodextrinas para liberar dos moléculas de glucosa (Figura 8) (Lind *et al.*, 2002).

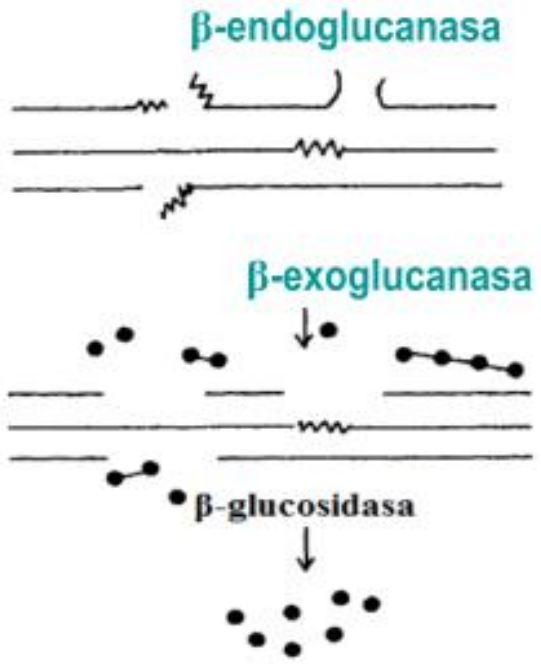

Figura 8. Mecanismo de acción de las celulasas (Aroca, 2009).

2.6 Microorganismos para la producción de etanol

Desde hace muchos años las S*accharomyces cerevisiae* y la *Zymomonas mobilis* han utilizadas para la producción de etanol, pero la explotación a nivel industrial de esta última es mínima*. Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos más atractivos para trabajar, se ha comprobado a través de la historia que no es patógeno, ya que se ha utilizado en las industrias alimentarias y ha sido clasificado como un

organismo GRAS (Generally Recognized As Save) (Ostergaard *et al.*, 2000). Así mismo, posee un gran potencial para la producción de etanol fermentando la glucosa, soportando altas concentraciones de la misma, logrando altos niveles de producción y rendimiento (Chandrakant y Bisaria, 2000).

Bajo condición es anaeróbicas, el piruvato es aún más reducido a etanol con la liberación de CO2. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un huésped atractivo para la producción de proteínas recombinantes, debido a que es un organismo no patógeno libre de endotoxinas para el hombre y su utilización a escala industrial se remonta hace siglos. Presenta como ventajas su fácil manejo y alta velocidad de crecimiento en comparación con las bacterias en condiciones anaerobias, posee una organización subcelular eucarionte capaz de realizar los procesos postraduccionales de proteínas complejas (Cuervo *et al.*, 2009).

2.7 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es una reacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. A pesar de parecer, a nivel estequiométrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de bióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse. El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO 2 por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac (Vázquez y Dacosta, 2007).

2.8 Energías alternativas

La energía renovable es aquella derivada de recursos que son regenerativos, siendo, por esta razón, fundamentalmente diferentes de los combustibles fósiles. Del consumo total de energía mundial, aproximadamente un 12% fue obtenido de fuentes renovables de energía hidroeléctrica, biomasa y, en menor grado, otras fuentes, como las energías geotérmica y eólica. Sin embargo, con el avance del precio del petróleo, la disminución de las reservas, inestabilidad política en los principales países productores de petróleo, además de una mayor demanda ambiental, se considera cada vez más las fuentes renovables como alternativa viable para revertir el cuadro actual (Monteiro-Machado, 2010).

La bioenergía hace referencia a la energía (primaria) renovable derivada de biomasas o de fuentes biológicas, tales como leña, subproductos agrícolas, carbón, turba o estiércol. La bioenergía se encuentra en una posición dominante, al representar el 77 % de las energías renovables (10 % del total), la mayoría de las cuales proviene de la leña (87 % de la bioenergía) (Unesco, 2014).

Diversificar la oferta energética e incrementar el uso de energías renovables es conveniente para México por razones estratégicas, económicas y ambientales. Usando bien los biocombustibles México puede contribuir a resolver los problemas globales y jugar un papel de liderazgo demostrando el uso responsable de sus recursos (Molina, 2010).

2.8.1 Biocombustibles

Biocombustible es el término con el cual se denomina a cualquier tipo de combustible que derive de la biomasa, nombre dado a cualquier materia orgánica de origen reciente

que haya derivado de animales y vegetales como resultado de un proceso de conversión fotosintético (Serna *et al.*, 2011).

La industria de biocombustibles presenta enormes oportunidades como consecuencia del aumento de los precios del petróleo y la necesidad de reducir las emisiones de dióxido de carbono (De La Cruz-Delgado, 2009).

2.8.2 Biogás

Hasta hace poco tiempo, el biogas era simplemente visto como un subproducto, obtenido a partir de la descomposición anaeróbica del desecho urbano, residuos animales y del lodo proveniente de estaciones de tratamiento de efluentes domésticos. Sin embargo, en los últimos años, delante del gran volumen de residuos provenientes de las exploraciones agrícolas y pecuarias, así como también aquellos producidos por mataderos, destilarías, fábricas de lácteos, tratamientos de alcantarillados domésticos y entierros sanitarios, la conversión energética del bio- gas se presenta como una solución y un logro ambiental, la reducción de costos en la medida en que reduce el potencial tóxico de las emisiones de metano, al mismo tiempo en que produce energía eléctrica (Monteiro-Machado, 2010).

El proceso de formación del biogas consiste en la descomposición del material por la acción de bacterias (microorganismos acidogénicos y metanogénicos). Se trata de un proceso conocido hace mucho tiempo, que ocurre naturalmente con casi todos los compuestos orgánicos y es usado para la conversión en energía de cocimiento, iluminación y como biofertilizante, siendo muy popular en los países asiáticos, a ejemplo de China e India. El mecanismo de descomposición anaeróbica se desarrolla por la acción de un consorcio de microorganismos. El bio-gas, producto de la degradación anaeróbica, es compuesto mayoritariamente por metano (50%– 70%) y

CO2. Ese gas puede ser colectado y utilizado como combustible (generación de calor o energía) (Weiland, 2010).

2.8.3 Biodiesel

Es un biocombustible que se produce a partir de los ácidos grasos derivados de aceites que pueden ser de origen vegetal o animal, los cuales pueden ser sometidos a varios procesos, pero el más utilizado se llama transesterificación. Este consiste en convertir los triglicéridos en esteres, para lo cual se produce una reacción en los aceites mediante el uso de un alcohol, que puede ser metanol o etanol, y un catalizador, que puede ser hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. Luego se decanta la sustancia resultante, quedando el biodiésel en la parte superior y glicerina en la parte inferior (IICA, 2007).

2.8.4 Bioalcohol

La mayor producción de alcohol está referida a el etanol, este es un líquido incoloro e inflamable con una densidad de 0.789 g/cm^3 y una fase liquida lo cual lo hace totalmente miscible en agua, tiene un punto de fusión de -114.3°C (158.8 K), y un punto de ebullición de 74.4°C (351.6 K), Acidez de 15.9 (H^+ del grupo), con una viscosidad 1,200 cp a 20 °C y un momento dipolar 1.69 D (gas) (Uyazán *et al.*, 2004).

El bioetanol es producido por la fermentación de azucares simples o polisacáridos como la celulosa y el almidón que pueden ser convertidos en azucares simples. Las fuentes de carbohidratos se pueden clasificar en tres grupos (Mussatto *et al.*, 2010).

a.- Materiales con azúcares simples (glucosa, sacarosa, fructosa y lactosa): caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo, suero de leche y melazas.

b- Materiales amiláceos; maíz, trigo y tubérculos como el boniato y la mandioca.

c- Biomasas lignocelulósicas: materiales leñosos, pajas, residuos agrícolas de cultivos y de pastos (switchgrass) e industriales.

La producción actual de bioetanol se basa en etanol a partir de almidón y azúcares, pero ha habido un debate considerable acerca de su sostenibilidad. En este contexto el bioetanol producido a partir de biomasa lignocelulósica es una interesante alternativa ya que los materiales lignocelulósicos no atentan contra la seguridad alimentaria y están disponibles como desechos siendo el recurso renovable más abundante, se estima una producción anual de $1x10^{10}$ toneladas en todo el mundo, por lo tanto el costo de la materia prima es muy bajo (Sánchez y Cardona, 2008).

La producción mundial de bioetanol ha presentado un comportamiento de crecimiento continuo en los últimos años y se espera que siga la misma tendencia. Los materiales lignocelulósicos son los que ofrecen un mayor potencial para la producción de bioetanol por lo que el bagazo de *agave* resulta una materia prima atractiva (Estupiñán-García, 2008).

En el año 2009, la producción de bioetanol fue de aproximadamente 90 millones de m3, siendo aproximadamente el 80% utilizado (73 millones de m3) como combustible y el otro 20% utilizado para usos domésticos o industriales. Los mayores productores de bioetanol son Estados Unidos y Brasil, con una producción de 40,6 millones de m3 y 23,9 millones de m3 respectivamente, sin embargo, la generación de estos combustibles proviene de la explotación de maíz y caña de azúcar, cultivos destinados para la alimentación humana lo que ha generado una gran controversia social, económica y política. Como solución a este problema existe la posibilidad de utilizar bioetanol de segunda generación que se puede obtener a partir de fuentes no

comestibles como desechos agrícolas y forestales (residuos lignocelulósicos) (Juri-Awad, 2011).

2.9 Aplicación del bioetanol

México se beneficiaría de la introducción del etanol como combustible de muchas formas: creación de empleo, desarrollo de la economía rural, ampliación de las infraestructuras sociales en zonas rurales, mejora de la seguridad energética, conservación de los recursos petrolíferos, mejor gestión del agua, expansión de la agricultura a tierras más secas cosechando cultivos resistentes, ahorro en los intercambios exteriores, motivación de la comunidad científica y tecnológica, incentivos a la industria de bienes de producción, mejora del medio ambiente local y global. El equipamiento para la fabricación de etanol y la generación combinada de calor y electricidad., creando empleos de calidad y fortaleciendo la industria (Estupiñán-García, 2008).

2.10 Sacarificación y fermentación simultanea

La hidrólisis enzimática separada de la fermentación (SHF) (Anders *et al.*, 2003) ofrece varias ventajas en el proceso de obtención de etanol. Permite que las enzimas operen a altas temperaturas para incrementar su actividad y los organismos fermentativos trabajen a temperaturas moderadas, optimizando la utilización de los azúcares. Sin embargo, actualmente existe la tendencia de obtener etanol en una sola etapa porque implica menor costo, altos rendimientos de etanol y tiempos más cortos del proceso (Stenberg *et al.*, 2000).

Este método combina en una única etapa de hidrólisis enzimática de celulosa y de productos de la fermentación del azúcar. Se trata solamente la fermentación de glucosa. La conducción de la co-fermentación concomitantemente a la hidrólisis de las

fracciones celulósica y/o hemicelulósica comprende el proceso SSCF (sacarificación simultánea a la co-fermentación). Hay muchos beneficios en utilizarse la SSF. Una vez que los azúcares son fermentados inmediatamente después de su producción, los riesgos de inhibición por productos finales de la hidrólisis son reducidos. Eso resulta en posibles mayores tasas de conversión, mayor rendimiento y concentración de etanol, y en menor concentración de enzima necesaria. Además de eso, el costo del equipo es reducido (solamente un reactor) y la presencia de etanol durante la hidrólisis disminuye el riesgo de contaminación (Monteiro-Machado, 2010).

Este nuevo esquema de proceso reduce: el número de reactores (figura 9), el requerimiento energético, el requerimiento de enzimas, el tiempo de reacción y la inhibición de las enzimas, ya que en él los azúcares producidos son fermentados inmediatamente a etanol, lo que se refleja en rendimientos de hidrólisis más altos, necesidad de menores dosis de enzima, reducción del tiempo total de proceso y productividades de etanol más altas (Ballesteros *et al.*, 2004).

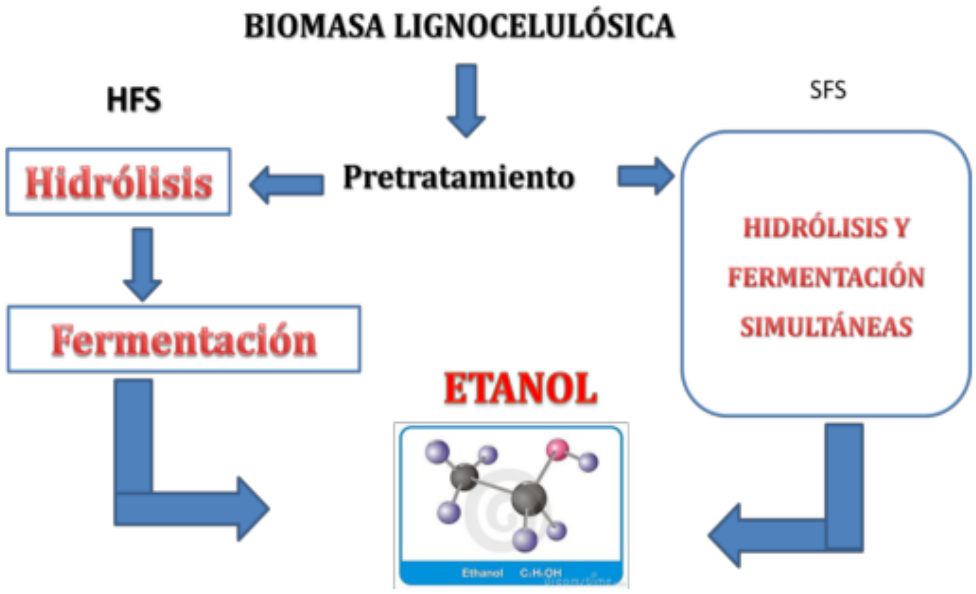

Figura 9. Integración de las etapas del proceso de producción de etanol (Vázquez-Ortega, 2013).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

La presente investigación se llevó acabo en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Lagua (UAAAN-UL) en el departamento de Agroecología en el laboratorio de investigación científica y en el Instituto Tecnológico de Durango, Unidad de Posgrado Investigación y Desarrollo Tecnológico, en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos Industriales.

3.2 Materia prima

Bagazo residual de *Agave angustifolia* de la variedad espadín, recolectado en la carretera Oaxaca –Pochutla.

3.3. Material biológico

En el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos Industriales, se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITD00196.

Así mismo, como fuente de enzima comercial, se utilizó un extracto enzimático Celluclast 1.5 L NOVOZYMES®.

3.4. Preparación y caracterización de la materia prima

3.4.1 Molienda

El bagazo de *Agave angustifolia* fue sometido a reducción del tamaño de partícula, mediante molienda en un molino y fue tamizado utilizando un tamiz de malla 18.

3.4.2 Determinación de contenido lignocelulósico

Esta determinación se realizó por el método de fraccionamiento secuencial (Rakesh-Kumar y Daljit-Singh, 2011). Cada experimento fue realizado por cuadruplicado. Se pesó en una balanza analítica (Adventurer™) un gramo de muestra previamente molida y tamizada depositándola en un matraz Erlenmeyer de 125 mL^{-1}, se suspendió en 100 mL^{-1} de agua destilada, se sometió a baño María durante dos horas, después de este tiempo se filtra a través de un crisol previamente tarado. El residuo se seca en una estufa a 105 ° C hasta alcanzar un peso constante y esto fue considerado como parte soluble en agua.

El residuo seco se suspendió en 100 mL^{-1} de H_2SO_4 0.5 M en matraces Erlenmeyer de 125 mL^{-1} se somete a baño María por dos horas, se filtró y fue introducido en la estufa por veinticuatro horas a 105 °C, se pesó y este peso fue representado como Hemicelulosa. Para la determinación de la celulosa y lignina el residuo se mezcló con 10 mL^{-1} de H_2SO_4 al 72 % en matraces Erlenmeyer de 250 mL^{-1} y se mantuvo a 30 ° C, durante una hora en un agitador rotatorio a 200 rpm.

El contenido se diluyó hasta la concentración de 4 % de H_2SO_4, se introdujo en la autoclave durante cuarenta minutos a 1.06 kg/ cm^2. Posteriormente, se filtró, se seca y se pesa, la pérdida de peso fue considerada como celulosa, mientras que el residuo se considera como lignina.

3.5 Determinación de humedad y cenizas

3.5.1 Humedad

Las capsulas vacías se colocaron en la estufa durante 12 horas posteriormente se colocó en un desecador por 30 minutos y finalmente se pesaron.

De la muestra se pesó 1 gramo en una balanza analítica (Adventurer™) transfiriéndose inmediatamente a la capsula seguido se introdujeron en la estufa utilizando unas pinzas, donde se quedaron durante 24 horas. Seguido de esto se retiraron las capsulas de la estufa y se trasladaron un desecador hasta enfriarse, se pesaron para observar si había alcanzado un peso constante.

Cálculo:

Peso de la muestra: W1 (g)

Pérdida de peso: W2 (g)

Humedad (%): (W1-W2/W1)*100

3.5.2 Cenizas

Las cenizas de obtuvieron por calcinación a 550°C durante 3 horas.

Se tomó 1 gramo de muestra por cuadruplicado, depositándose en crisoles previamente tarados, al término del tiempo establecido se pesó cada crisol y por diferencia de peso se va a reportar el contenido de cenizas.

3.6 Pretratamiento

Se utilizó un método alcalino (NaOH) (Yue *et al.*, 2009) bajo las siguientes condiciones: Se pesaron en una balanza analítica (Adventurer™) 8 muestras de 12 g cada una

previamente molidas y tamizadas, se depositaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL^{-1}. Conteniendo cada uno 150 mL^{-1} de NaOH al 2% se colocaron en un baño María a punto de ebullición durante 60 minutos. A continuación se enfriaron a temperatura ambiente, se filtraron en tela de nylon, se lavaron con 300 mL^{-1} de agua de la llave y luego con 200 mL^{-1} de agua destilada. La porción solida se exprimió y se colocó en una estufa a 100 °C por 24 horas, para luego guardarlo en bolsas de plástico herméticamente cerradas.

La fracción liquida se conservó en recipientes de vidrio para determinar su contenido de azucares reductores.

3.7 Determinación de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se realizó por el método del ácido dinitrosalisílico, DNS de (Chaplin y Kennedy, 1994).

Se preparó 250 mL^{-1} del reactivo DNS. Para dicha preparación se pesaron 0.2 g de ácido dinitrosalicilico, 75 g de tartrato de Sodio y Potasio, 50 mL^{-1} de NaOH 2 M, todo se diluyo con agua destilada en un matraz aforado de 250. Posteriormente fue transferido en una botella color ámbar donde fue dejado por 24 horas para su mejor dilución y posterior uso.

3.7.1 Curva patrón de glucosa

Se prepararon 100 mL^{-1} de glucosa al 0.2%, posteriormente se prepararon diluciones (Cuadro 3). Se agregó 1 mL^{-1} de reactivo DNS, se colocan los tubos a baño María a ebullición por 10 minutos luego de enfriarlos se leyó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro (HACH ®). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Cuadro 3. Diluciones necesarias para la elaboración de la curva tipo.

Muestra por duplicado	Vol. de Agua destilada µL	Glucosa g L^{-1}	Concentración de glucosa 2 g L^{-1} (µL)
1	1000	0	0
2	800	200	0.4 g L^{-1}
3	600	400	0.8 g L^{-1}
4	400	600	1.2 g L^{-1}
5	200	800	1.6 g L^{-1}
6	0	1000	2.0 g L^{-1}

Posteriormente se graficó la concentración de glucosa contra los datos obtenidos de la absorbancia.

3.7.2 Determinación de la concentración de azúcares reductores

Se tomó 1 mL^{-1} de muestra para realizar una dilución de 1:10, se agregó 1 mL^{-1} del reactivo DNS y se colocó en un baño María a ebullición, durante 10 minutos. Inmediatamente después se enfrió la solución en un baño de agua fría durante cinco minutos. Se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro HACH® a una longitud de onda de 570 nm. El blanco utilizado se sometió a las mismas condiciones de reacción de la muestra. El resultado se leyó en una curva patrón de glucosa previamente realizada. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.8 Determinación de la actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática del extracto comercial Celluclast 1.5 L de NOVOZYMES. Por el método del papel filtro (Mandels y Stenberg, 1976), nombrado así porque utiliza papel filtro como sustrato para la medición de la actividad celulósica. La unidad internacional de medición de la actividad enzimática utilizada para este método,

es conocida como unidad de papel filtro (FPU). Los azúcares obtenidos se determinaron por el método reportado por Chaplin y Kennedy, (1994). La actividad enzimática del extracto se calculó mediante la ecuación:

$$\text{FPU} = \frac{(1.5\text{mL})(10)(\text{Conc. de glucosa en } \frac{mg}{mL})}{(1\text{h})(\frac{0.187\text{mg}}{\mu\text{mole}})(0.5\text{mL})(\frac{60\text{min}}{\text{h}})}$$

Factor de dilución = 10

Tiempo de incubación = 60 min.

Cantidad absoluta de la actividad enzimática = 0.187

Volumen otorgado para la solución de ensayo = 0.5 mL buffer

Se disolvieron 0.1 g de celulosa en 10 mL^{-1} de buffer de acetato de sodio 0.1 M. Se enrollaron 0.1 g de papel filtro y se colocaron en tubos. Se adicionaron 0.5 mL^{-1} de la solución enzimática y 1.0 mL^{-1} de solución buffer. Se mezcló brevemente con formación de vortex y se incubó por durante una hora a 50°C. La reacción se detuvo por inmersión de los tubos en un baño con hielo. Se tomaron 0.1 mL^{-1} de muestra y se adicionó agua hasta completar $1mL^{-1}$. Posteriormente se adiciono $1mL^{-1}$ de reactivo DNS a cada tubo para que se lleve a cabo la reacción, se agitaron vigorosamente, luego se colocaron en un baño de agua a ebullición durante cinco minutos. Las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente, se transfirieron a celdas colorimétricas y se leyó la absorbancia a 550 nm con el espectrofotómetro (Turner SP-830), utilizando agua como blanco. Se leyó la concentración de glucosa que corresponde a la absorbancia desde la curva de calibración.

3.9 Activación de la Levadura

Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae ITD00-196* de la colección del laboratorio de Procesos Biotecnológicos Industriales. El inóculo se preparó activado la cepa en un matraz Erlenmeyer conteniendo 20 mL^{-1} de un medio YDP (Extracto de levadura, dextrosa y peptona de caseína) adicionando 1.5 mL^{-1} de la cepa, por 6 horas a 30°C y 120 RPM posteriormente se decantó en otro matraz Erlenmeyer con 200 mL^{-1} de medio YDP y se incubó a 30°C durante 18 horas a 120 RPM. Después este tiempo se determinó el número de células por cámara de Neubauer.

3.10 Sacarificación y fermentación simultanea

Para llevar a cabo la SFS, se utilizó un volumen de reacción de 30 mL^{-1}, consistiendo en 2 gramos de bagazo pretratado, 2,068 µ de levadura y 1.2, 1.61 y 2.01 respectivamente a la concentración enzimática del diseño experimental. Para completar el volumen se utilizó medio YP (glucosa y peptona) como fuente de nitrógeno.

Se pesaron 2 g de bagazo de *Agave angustifolia* pretratado, por duplicado, se colocaron en frascos de vidrio de 100 mL^{-1}, utilizando $1X10^7$ Cel/ mL^{-1} de *Saccharomyces cerevisiae*, dicha concentración del inoculo fue propuesta por (Vázquez-Ortega, 2013) con un volumen de (1.2, 1.6 y 2 UPF/gcel.) de solución enzimática (Celluclast 1.5 L NOVOZYMES®). Se ajustó un volumen de reacción de 30 mL^{-1} con medio YP (extracto de levadura y peptona). La mezcla se incubó a una temperatura de 36°C y 120 RPM durante 48 horas. Después de este tiempo se tomó en tubos Ependorf 2 mL^{-1} de la muestra y se centrifugo a 5000 RPM durante 5 minutos. El mismo proceso se repitió con las temperaturas (38 y 40 °C). A las muestras obtenidas se les determinó azúcares residuales por el método de DNS de Chaplin y Kennedy, 1994 y etanol en el Cromatógrafo de gases utilizando el método del Manual de Agilent, 2007.

3.10.1 Diseño Experimental

El diseño experimental propuesto para la sacarificación y fermentación simultánea del bagazo de *Agave angustifolia* Haw. fue un factorial de A x B con tres repeticiones. Donde el factor A, nos representa las temperatura (36, 38 y 40 °C) y B, las diferentes concentraciones de enzima (15, 20 y 25 UPF/ mL^{-1}); todos los experimentos se realizaran por duplicado, durante un tiempo de incubación de 48 horas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diseño experimental

Tiempo (t)	T(°C)	Concentración enzimática UPF/gcel.
48 horas	36	15
		20
		25
	38	15
		20
		25
	40	15
		20
		25

3.11 Determinación de etanol

El etanol es el resultado final del proceso de sacarificación y fermentación simultánea por lo cual se realizaron determinaciones de cada uno de los experimentos propuestos.

La determinación se realizó por el método para etanol de León. Con un volumen de inyección de 1µL. *modo- splittless* utilizando como gas acarreador nitrógeno con una temperatura de inyección de 220°C, flujo de 18.9 mL^{-1} de nitrógeno. Horno con una temperatura inicial de 35 °C por dos minutos un incremento de temperatura de 10 °C

por minuto hasta llegar a 210°C donde se mantiene por un minuto. La temperatura del detector es de 250°C.

3.11.1 Curva tipo para determinación de etanol

Se prepararon 30 mL^{-1} de etanol con una concentración de 20 g L^{-1}, posteriormente se realizaron diluciones de acuerdo al Cuadro 5.

Cuadro 5. Concentraciones necesarias para la curva tipo de etanol

Muestra	Vol. de Agua destilada µL	Volumen de Etanol	Concentración de Etanol
1	0	20	2.0 g L^{-1}
2	1000	10	1.0 g L^{-1}
3	1000	5	0.5 g L^{-1}
4	1000	2.5	0.25 g L^{-1}
5	1000	1.25	0.12 g L^{-1}
6	1000	0.625	0.06 g L^{-1}
7	1000	0.312	0.03 g L^{-1}

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El bagazo de *Agave angustifolia* es una buena opción para la producción de etanol como combustible. Los resultados son expuestos según el orden dado en la metodología.

4.1 Molienda y tamizado

Después de ser triturada y tamizada la materia prima se obtuvo un diámetro de partícula de 0.0394 pulgadas cm^2.

4.2 Propiedades físico- químicas de la materia prima

Posteriormente de haberse realizado la técnica fraccionamiento secuencial de en base seca (Rakesh-Kumar y Daljit-Singh, 2011). Los resultados se pueden observar en el siguiente Cuadro.

Cuadro 6. Contenido lignocelulósico de diferentes especies.

Componente	**Base seca %**			
	Bagazo de *Agave Angustifolia espadín* Haw.	Caña de azúcar	Pinus patula	Eucalyptus Camaldulensis
Celulosa	41.1	44.5	36.6	45.0
Hemicelulósa	26.9	37.3	25.0	17.9
Lignina	14.5	12.5	28.5	29.5

Pinus patula, Eucalyptus camaldulensis (Gómez et al., 2013), caña de azúcar (Salcedo *et al.*, 2011).

De acuerdo con los resultados anteriores, la composición de celulosa, hemicelulosa y lignina del sustrato sin tratamiento, presentó valores similares a los reportados en la literatura (Rodríguez-Macías *et al.*, 2010). Así mismo, el contenido de material lignocelulósico del bagazo de *Agave angustifolia* Haw es relativamente similar al de *Pinus patula,* y ligeramente menor a los de la caña de azúcar y *Eucaliptus camaldulensis.*

4.3 Pretratamiento

El pretratamiento con NaOH al 2% produce un hinchamiento de la molécula de celulosa, para facilitar un mejor hidrolizado y un acceso a los azúcares fermentables, como se puede observar en los valores obtenidos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Contenido lignocelulósico una vez pretratado.

Componente %	Pretratado
Hemicelulósa	40.4
Celulosa	28.09
Lignina	15.11

El pretratamiento con NaOH, modificó el porcentaje de celulosa disminuyendo en un 13 % como resultado de la hidrolisis de la molécula.

En la literatura se menciona que el NaOH causa un aumento de la superficie interna de la celulosa y disminuye el grado de polimerización y cristalinidad, lo que provoca el rompimiento de la estructura de la lignina (Taherzadeh y Karimi, 2008).

La hemicelulosa aumenta ya que suele ser un polímero de menor masa molar que la celulosa y más fácilmente hidrolizable (Guarnizo-Franco *et al.*, 2009).A diferencia del valor reportado para la lignina que permanece sin cambio significativo porque es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro *et al.*, 2005).

En suma, el pretratamiento produce una separación de los elementos estructurales lignina y carbohidratos y la transformación de la celulosa, que difiere considerablemente de la primitiva ya que la celulosa pretratada se hidroliza hasta un 40% más rápido que la celulosa original (González-Rentería *et al.*, 2007)

4.4. Azúcares reductores del bagazo de *Agave angustifolia* Haw.

Al realizar la determinación de azúcares reductores por el método de DNS la muestra inicial contenía 10.72 g L^{-1}. En otros sustratos que han sido utilizados para la producción de etanol se ha encontrado que estos contenían una mayor concentración de azucares reductores como es el caso de las algas marinas (14.5 ± 2.1 g L^{-1}) (Ji-Suk *et al.*, 2012) y en el caso del bagazo de caña de azúcar conteniendo (12.3 ± 70.6) (Silveira-dos Santos *et al.*, 2010).

4.5 Activación de la levadura y preparación de inóculo

Después de realizar la metodología para la cuenta en cámara Neubauer se obtienen 580 ufc/ mL^{-1} con una dilución 1:100. Para obtener el volumen asignado como inóculo se parte de la siguiente ecuación.

$$No.\frac{células}{mL} = \frac{suma\ de\ células(\mu L)}{(0.4\mu L)(fD)(1 * 10^{-3}mL)}$$

fD= Factor de dilución

De acuerdo a la ecuación anterior se requiere diluir para obtener un inóculo recomendado por (Vázquez-Ortega, 2013) donde indica que $1*10^{7}$ es una buena concentración para lograr mejores rendimientos de la producción de etanol.

Posteriormente se adicionó 2.068 µL de inóculo a cada una de las muestras y una carga enzimática según se indicó en el diseño experimental, tres experimentos por duplicado para cada concentración de enzima, los cuales se incubaron a tres temperaturas (36°, 38° y 40° C) durante 48 horas. Resultando un total de 18 repeticiones.

4.6 Sacarificación y fermentación simultánea

El ensayo de SFS con una duración de 48 horas, se tomaron muestras de cada experimento y se realizaron las determinaciones de azucares residuales (Cuadro 8) y la producción final de etanol (Cuadro 9).

De acuerdo con los resultados encontrados para azucares residuales, el valor más bajo fue para 25 UPF a una temperatura de 40 °C (2.91 g L^{-1}) mientras que la más alta fue de (6.06 g L^{-1}) para 20 UPF a una temperatura de 36 ° C. Estos resultados son similares a los reportados por (Ballesteros *et al.*, 2001) (2.1, 6.3 g L^{-1} Azucares residuales) empleando pulpa y fragmentos de huesos de las aceitunas, y a los reportados por (Li *et al.*, 2014) (2.41, 4.32 g L^{-1})

Cuadro 8. Promedio y desviación estándar de azúcares residuales

	AZUCAR RESIDUAL (g L^{-1})		
CE (UPF/mL^{-1})	36°C	38°C	40°C
15	4.74 ± 0.94	3.81 ± 0.09	3.52 ± 0.018
20	6.06 ± 0.05	3.51 ± 0.18	3.16 ± 0.26
25	3.71 ± 0.40	3.11 ± 0.07	2.91 ± 0.02

Cuadro 9. Resultados promedio (desviación estándar) de la producción de etanol a partir de bagazo de *Agave angustifolia.*

	ETANOL (g L^{-1})		
CE (UPF/mL^{-1})	Temperaturas		
	36 °C	38 °C	40 °C
15	8.19 ± 0.19	8.68 ± 0.82	4.55 ± 0.02
20	14.70 ± 20.25	8.41 ± 0.47	5.32 ± 0.50
25	18.98 ± 16.59	10.67 ± 2.65	5.77 ± 0.1

4.7 Determinación de etanol del experimento realizado

Dado los resultados encontrados para etanol, el valor más bajo se encontró a una concentración de 15 UPF mL^{-1} y a una temperatura de 40 °C (4.55 g L^{-1}) de etanol. Lo cual confirma que no es la temperatura óptima para la hidrolisis enzimática. Mientras que el valor más alto fue para una concentración de 25 PF mL^{-1} a una temperatura de 36 ° C (18.98 g L^{-1}) de etanol. el valor más alto de la producción obtenida en este experimento fue similar a los reportados por (Ballesteros *et al.*, 2004) a base de *Eucalyptus globulus (*17 g L^{-1}), paja de trigo (18.1 g L^{-1}) y bagazo de sorgo dulce (16.2 g L^{-1}).

Existen desventajas en cuanto a la incompatibilidad entre la temperatura de hidrólisis y de fermentación, la tolerancia de los microorganismos al etanol así como la inhibición de las enzimas por el producto (Ye Sun y Cheng, 2002).

En la bibliografía revisada no se han reportado trabajos donde se haya utilizado el bagazo de maguey en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea en condiciones de laboratorio, lo cual abre la posibilidad de aplicar los resultados obtenidos a un proceso a escala piloto.

En la realización una simulación siguiendo un Modelo multivariable, se concluye que las operaciones unitarias de ozonólisis (pretratamiento), sacarificación y fermentación de bagazo de maguey tienen una gran influencia en la factibilidad tecnológica y económica del proceso de obtención de etanol (Estupiñán-García, 2008).

Para la determinación de la eficiencia de la sacarificación y la levadura en el experimento realizado se procedió a la realización de los siguientes cálculos: el rendimiento teórico produce 92 g de etanol, por cada 180 g por lo tanto la relación etanol/glucosa es de 51.111% ((92/180) * 100). Si contenido de glucosa en la muestra fue de 68.49*1.1= 75.33 g por cada 100 g de bagazo de *agave*. y tomando en Consideración que la glucosa residual fue de 3.71 g L^{-1}, entonces, la glucosa consumida fue de 71.62 g. De manera que, si el total de celulosa consumida (71.62 g) se convirtieran en etanol, se obtendría de ella 23.6 g L^{-1} de etanol teórico. En el experimento se utilizaron 2 g de bagazo de *agave*, el cual contenía 1.4324 g de celulosa (2 g * 0.7162). Considerando que la concentración de etanol obtenida fue de 18.98 g L^{-1} entonces, **la eficiencia de hidrólisis fue de 80.44 %,** respecto al rendimiento teórico máximo obtenible. Para producir 18.98 g L^{-1} de etanol se requieren 0.3796 g L^{-1} de glucosa por lo tanto si a la glucosa consumida se le resto la glucosa utilizada (0.7162 g L^{-1} – 0.3796 g L^{-1}) esto resulto que 33.66 g L^{-1} fueron utilizados por la levadura. Si el 0.7162 g L^{-1} es igual 100 % entonces el 0.3796 g L^{-1} pertenece al **53 % de eficiencia de la levadura.**

CONCLUSIÓNES

1.- Se acepta la hipótesis nula, el bagazo de maguey es un sustrato apropiado para la producción de bioetanol.

2.- La eficiencia de hidrólisis fue de 80.44 %.

3.- El consumo de los azucares por la levadura fue 53 %.

4.- Se obtuvo una producción máxima de 18.98 g L^{-1} de bioetanol.

Se requieren más estudios para optimizar las condiciones ya que no se obtuvieron valores estadísticos significativos (temperatura, concentración enzimática y tiempo de incubación), siendo estas las condiciones más importantes del proceso para dicho sustrato.

REFERENCIAS

Anders, W., G. Mats y Z. Guido 2003. "Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks." Biotechnology Progress 19: 1109-1117.

Aro, N., T. Pakula y M. Penttila 2005. "Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi." FEMS Microbiology Reviews 29: 719-739.

Aroca, G. 2009. Impacto de la producción de biocombustibles. CYTED BIALEMA. Valparaíso, Chile51

Ballesteros, I., J. M. Oliva, M. J. Negro, P. Manzanares y M. Ballesteros 2001. "Proceso de sacarificación y fermentación simultáneas para la conversión de la fracción celulósica del residuo de la extracción del aceite de oliva en etanol." CIEMAT-Departamento de Energías Renovables 53: 282-288.

Ballesteros, I., J. M. Oliva, M. J. Negro, P. Manzanares y M. Ballesteros 2004. "Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS)." PROCESS BIOCHEMISTRY 39: 1843-1848.

Berumen-Barbosa, M. E. 2009. "Oaxaca: La actividad productiva maguey – mezcal." Oaxaca, México: 1-87.

Bhatia 2012. Schematic of goals of pretreatment on lignocellulosic material. e. l. (http://www.amb-express.com/content/2/1/65/figure/F3?highres=y)(2):

Cuervo, L., J. L. Folch y R. E. Quiroz 2009. "Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol." BioTecnología 13: 11-25.

Chagoya-Méndez, V. M. 2004. "Diagnostico de la cadena productiva del sistema productivo maguey-mezcal." SAGARPA: 208.

Chandrakant, P. y V. S. Bisaria 2000. "Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by Saccharomyces cerevisiae in the presence of xylose isomerase." Appl Microbiol Biotechnol 53: 301-309.

Chaplin, M. y Kennedy 1994. "Carbohydrate Analysis. A practical Approach." 3.

De La Cruz-Delgado, M. 2009. "Evaluación tecnico-economica de la obtencion de etanol a partir de la yuca m – thai 8 (manihot esculenta, crantz)." Facultad de Ingeniería 1-98.

Estupiñán-García, L. 2008. "Evaluación técnica-economica de la producción biotecnológica de etanol a partir de bagazo de agave." Facultad de Quimica: 1-84.

Gómez, E. A., L. A. Ríos y J. D. Peña 2013. "Efecto del pretratamiento de biomasa maderera en el rendimiento a etanol." Información Tecnológica 24: 113-122.

González-Rentería, S. M., N. O. Soto-Cruz, O. M. Rutiaga-Quiñones, H. Medrano-Roldan, J. G. Rutiaga-Quiñones y J. López-Miranda 2007. "Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (Pinto villa, Pinto saltillo, Pinto mestizo y Flor de mayo)." Revista Mexicana de Ingeniería Química 10: 17-28.

Guarnizo-Franco, A., P. N. Martínez-Yépes y H. A. Valencia-Sánchez 2009. "Biomass and cellulose pretreatments for saccharification." Scientia et Technica 42: 284-289.

Himmel, M. E., S. Y. Ding, D. K. Johnson, W. S. Adney, M. R. Nimlos, J. W. Brady y T. D. Foust 2007. "Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production." Science 315: 802-807.

IICA 2007. "Biocombustibles " Instituto interamericano de cooperación para la agricultura: 1-24.

Íñiguez, G., G. A. Martínez, P. A. Flores y G. Virgen 2011. "Utilización de subproductos de la industria tequilera.Monitoreo de la evolución del compostaje de dos fuentes distintas de bagazo de agave para la obtención de un substrato para jitomate." Rev. Int. Contam. Ambie. 27: 48-59.

Ji-Suk, J., Y. Cho, J. Gwi-Taek y S.-K. K. 2012. "Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, saccharina japonica." Bioprocess Biosyst Eng 35: 11-18.

Juri-Awad, S. A. 2011. "Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: Líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca." química y biotecnología Licenciatura: 76.

Li, X., J. Lu, J. Zhao y Q. Y. 2014. "Characteristics of corn stover pretreated with liquid hot water and fed-batch semi-simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production." PLOS ONE 9: 1-11.

Lind, P. Weimer, Z. Van y I. W. Pretorius 2002. "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology." Microbiol. Mol. Biol.: 506-577.

López-Hernández, I. 2008. "Pruebas de resistencia a la tensión en fibras de las hojas del *agave angustifolia* haw. para determinar su comportamiento mecánico." Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca: 1-171.

Mandels y D. Stenberg 1976. "β-glucosidase of trichoderma: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose." Applied and environmental microbiology 31: 648-654.

Menon, V. y M. Rao 2012. "Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept." Progress in Energy and Combustion Science 38: 29.

Molina, M. 2010. "Los biocombustibles en México." en linea (http://centromariomolina.org/wp-content/uploads/2012/05/1.-Los-biocombustibles-en-M%C3%A9xico.-Postura-del-CMM.-2010_final1.pdf) 03-12-2014: 1-5.

Monteiro-Machado, C. M. 2010. "Situación de los biocombustibles de 2da y 3era generación en América Latina y Caribe." en linea (http://www.bivica.org/upload/biocombustibles-situacion.pdf) 03-12-2014: 1-88.

Mussatto, S. I., I. C., I. C. Roberto, A. Vicente, L. Domingues y J. A. Teixeira 2010. "Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production." Biotechnology Advances 28: 817-830.

Niño-López, L., A. Acosta-Cárdenas y R. Gelves-Zambrano 2013. "Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (Manihot esculenta Crantz)

" Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia. 69: 317-326.

Ostergaard, S., L. Olsson y J. Nielsen 2000. "Metabolic engineering of saccharomyces cerevisiae." Microbiology and molecular biology reviews 64: 34-50.

Ovando-Chacón, S. L. y K. N. Waliszewski 2005. "Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos." Universidad y Ciencia 21: 1-10.

Perez, J., J. Muñoz-Dorado, T. de la Rubia y J. Martínez 2002. "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview." International Microbiology 5: 53-63.

Produce, F. 2012. "Agave mezcal." en linea (http://fundacionproducegro.org.mx/wp-content/uploads/2012/05/11-Agave-Mezcal.pdf) 03-12-24: 212-246.

Ragauskas, A. J., C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick-Jr., J. P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer y T. Tschaplinski 2007. "The Path Forward for Biofuels and Biomaterials." science 311: 484-489.

Rakesh-Kumar, S. y A. Daljit-Singh 2011. "Biodegradation of paddy straw obtained from different geographic locations by means of Phlebia spp. for animal feed." Biodegradation 22: 143-152.

Ramos, L., C. Breuil y J. Saddler 2003. " "Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis"." Biotechnology and Bioengineering 34/35: 37-48.

Robledo-Olivo, A., C. N. Aguilar y J. C. Montañez-Sáenz 2012. Imagen representativa de la pared celular de una planta. en linea (http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/7.html). U. d. o. d. m. c. s. m. p. l. o. d. xilanasas.(7):

Rodríguez-Macías, R., E. G. Alcantar-González, G. Iñiguez-Covarrubias, F. Zamora-Natera, P. M. García-López, M. A. Ruiz-López y E. Salcedo-Pérez 2010. "Desarrollo y caracterización de sustratos orgánicos a parti del Bagazo de agave Tequilero. ." Interciencia 35: 515-520.

Rodríguez, R., E. G. Alcantar-González, G. Iñiguez-Covarrubias, F. Zamora-Natera, P. M. García-López, M. A. Ruiz-López y E. Salcedo-Pérez 2010. "Caracterización física y química de sustratos agrícolas a partir de bagazo de agave tequilero." Interciencia 35: 515-520.

Salcedo, J. G., J. E. López-Galán y L. M. Flórez-Pardo 2011. "Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar." Dyna 169: 182-190.

Sánchez, O. J. y C. A. Cardona 2008. "Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas." Interciencia 30: 1-19.

Schell, J. F., M. Newman y J. McMillan 2003. "sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor investigation of yields, kinetics, and enzymatic "Dilute digestibilities of solids"

" Biochem. Biotechnol 105: 69-85.

Sener 2013. "Prospectiva de Petróleo Crudo y Petrolíferos." Secretaria de Energía: 317.

Serna, F., L. barrera y H. Montiel 2011. "Impacto Social y Económico en el Uso de Biocombustibles." Technology Management & Innovation 6: 101-114.

Silveira-dos Santos, D. D., A. C. Camelo, K. C. Pedro-Rodrigues, L. C. Carlos y N. Pereira-Jr. 2010. "Ethanol production from sugarcane bagasse by zymomonas

mobilis using simultaneous saccharification and fermentation (ssf) process." Biochem Biotechnol 161: 93-105.
Stenberg, K., M. Bollók, K. Réczey, M. Galbe y G. Zacchi 2000. "Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production." Biotechnology and Bioengineering 68: 204-210.
Taherzadeh, M. J. y K. Karimi 2008. "Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production." Molecular Sciences: 1621-1651.
Unesco 2014. "Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo 2014." en linea (http://unesdoc.unesco.org/images/0022/002269/226962S.pdf) 03-12-2014: 1-7.
Urribarrí-Cobo, L. 2011. "Sacarificación y fermentación simultánea del bagazo de caña de azúcar tratado con amoníaco." Facultad experimental de ciencias división de estudios para graduados: 1-191.
Uyazán, A. M., I. D. Gil, J. L. Aguilar, G. Rodríguez y L. A. Caicedo 2004. "Deshidratación del etanol." Ingeniería e Investigación 24: 49-59.
Vázquez-Beltran, A. 2006. El desarrollo sustentable y la evaluación ambiental en una fábrica de mezcal del estado de oaxaca1-21
Vázquez-Ortega, P. G. 2013. "Producción de etanol de segunda generación por medio del proceso de sacarificación y fermentación simultáneas." Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico: 1-80.
Vázquez, H. J. y O. Dacosta 2007. "Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas." Ingeniería Investigación y Tecnología 8: 249-259.
Weiland, P. 2010. "Biogas production: current state and perspectives." Microbiol Biotechnol 85: 849-860.
Ye Sun, Y. y J. Cheng 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production." Bioresource Technology 83: 1-11.
Yue, Z., C. Teater, Y. Liu, J. MacLellan y W. Liao 2009. "A Sustainable Pathway of Cellulosic Ethanol Production Integrating Anaerobic Digestion With Biorefinin." Biotechnology and Bioengineering 105: 1031-1039.
Zarate -Altamirano, G. 2006. "Caracterización y evaluación agronómica de materiales orgánicos potenciales para utilizarse como sustratos en cultivo sin suelo de melón (Cucumis melo L.)." Centro Interdisciplinario de Investigación y desarrollo integral regional unidad oaxaca: 100.