

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**IZTAPALAPA**



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LA FRACCIÓN  
ORGÁNICA DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**M. en C. RAZIEL JESÚS ESTRADA MARTÍNEZ**

Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda      Director

Dr. Ernesto Favela Torres      Asesor

Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz      Asesor

Ciudad de México

Junio de 2019

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

Esta tesis se realizó en la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido (PP4) adscrita al Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa en la Ciudad de México, México, bajo la dirección del Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda. Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT (Proyecto PDCPN-2013/215467). RJEM (Becario No. 265441) agradece al CONACyT por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado.

Ciudad de México, México a 7 de Junio de 2019

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA  
DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS**

que presentó

***M. en C. Raziel Jesús Estrada Martínez***

Comité tutorial:

Director: Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Asesor: Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz  
Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Durango

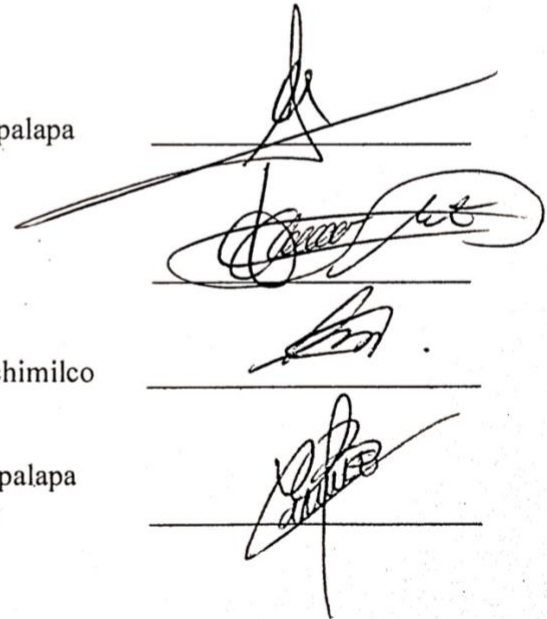
Jurado

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Secretario: Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz  
Tecnológico Nacional de México  
Instituto Tecnológico de Durango

Vocal: Dra. Luz María Tovar Castro  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Vocal: Dr. Quentin Carboue  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa  
Institut de recherche pour le développement (IRD)



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la UAM-Iztapalapa por haberme permitido llevar a cabo esta tesis en sus instalaciones.

A CONACYT por la beca de doctorado otorgada (CVU 383749; No. Becario 265441).

Al proyecto de desarrollo científico para atender problemas nacionales (PDCPN)-2013, titulado: “Captura del CO<sub>2</sub> generado durante la mineralización del carbono de los residuos sólidos orgánicos en condiciones aerobias y de la producción de biocombustibles” (Proyecto 215467).

Al Dr. Gerardo Saucedo y al Dr. Ernesto Favela por su amistad, orientación y apoyo.

Al Dr. Oscar Soto y al Dr. Héctor Escalona por la asesoría brindada.

A la Dra. Arely Prado y al Dr. Sergio Huerta por su amistad y consejos académicos.

A mis compañeros y amigos de la PP4 por sus comentarios, críticas y apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

## **DEDICATORIA**

A Dios

A mi Mamá y Hermanos

A mi familia, amigos y profesores

## RESUMEN

El desarrollo económico y la industrialización en México produjeron un aumento en el consumo de materias primas, que han impactado significativamente en el volumen y la composición de los residuos generados. En México, se generan más de 53 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos (RSU) al año, de los cuales, se calcula que el 52 % corresponde a materia orgánica. La Secretaría de Desarrollo y Medio Ambiente (SEDEMA) indica que, en el 2017, se generaron 12 998 toneladas por día de RSU en la Ciudad de México, donde el 41 % fue generado en las Alcaldías Iztapalapa (2 245 Ton/día), Gustavo A. Madero (1 735 Ton/día) y Cuauhtémoc (1 316 Ton/día).

La disposición convencional en rellenos sanitarios y tiraderos a cielo abierto es un método común en México para la eliminación de los RSU. Actualmente, los métodos alternativos de tratamiento como el compostaje y la digestión anaerobia se han utilizado para tratar algunos de estos residuos. Sin embargo, debido a la gran cantidad de estos residuos, se está en la búsqueda de nuevos procesos para su aprovechamiento.

La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) resulta ser una materia prima atractiva para su fermentación directa a etanol por cultivo en medio sólido (CMS). Para la producción de etanol se utilizó una mezcla sólida estándar de la FORSU que representa la composición anual de los residuos frescos de frutas y verduras generados en la Central de Abastos, de la Ciudad de México. Este tipo de residuos permite la producción de etanol con un pretratamiento térmico suave, en lugar de pretratamientos termoquímicos agresivos o enzimáticos.

En el presente trabajo se desarrollaron metodologías para la producción de biomasa de levaduras para su uso en CMS. También, se optimizó el pretratamiento de la materia prima a partir de un diseño factorial central compuesto (DFCC) y, por último, se desarrollaron estrategias de CMS a escala laboratorio y piloto para la obtención de etanol.

En la primera etapa experimental se evaluó la capacidad fermentativa de diferentes levaduras por cultivos en matraces Erlenmeyer con diferentes diseños y volúmenes de llenado para la producción de biomasa. Se encontró que un volumen de llenado del 20 % conduce a un mejor crecimiento microbiano y permite una mejor producción de inóculo independiente del diseño del matraz. El efecto Crabtree fue evaluado cuantitativamente a través de la productividad del etanol en condiciones aerobias y el crecimiento microbiano por el consumo del producto. Las levaduras

con efecto Crabtree positivo tienen un alto potencial para la rápida producción de etanol durante la fermentación directa de la FORSU.

En la segunda etapa experimental se optimizó la liberación de carbohidratos y la disminución de la concentración de inhibidores como el ácido acético y el hidroximetilfurfural (HMF); para ello, se planteó un DFCC en términos de presión-temperatura y tiempo de residencia, utilizando tres niveles de adición de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 0, 1 y 2 % p/p) durante el pretratamiento de la mezcla sólida estándar de la FORSU.

Se obtuvo un aumento de carbohidratos fermentables del 68.3, 59.5 y 155.3 %, a las condiciones de pretratamiento optimizadas ( $2.2 \text{ kg/cm}^2$  ( $135 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y 12 min), a las condiciones de pretratamiento ( $2.7 \text{ kg/cm}^2$  ( $140 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y 15 min) con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1 % y a las condiciones de pretratamiento ( $2.7 \text{ kg/cm}^2$  ( $140 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y 15 min) con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 2 % respectivamente, comparado con las condiciones de esterilización térmica estándar ( $1.1 \text{ kg/cm}^2$  y 15 min) sin la adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Debido a problemas prácticos en el ajuste de pH, en la etapa del CMS se decidió evaluar dos pretratamientos térmicos,  $2.2 \text{ kg/cm}^2$  ( $135 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y 12 min y  $2.7 \text{ kg/cm}^2$  ( $140 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y 15 min sin adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; estas condiciones representan un factor de severidad (FS) de 2.11 y 2.35, respectivamente. El FS es un criterio práctico para comparar el pretratamiento térmico de la mezcla sólida estándar de la FORSU.

Por último, en la tercera etapa experimental se realizó la producción de etanol a partir de la FORSU por CMS y se evaluó el uso de cultivos axénicos o mixtos a escala laboratorio y piloto. A escala laboratorio se utilizaron biorreactores tubulares para evaluar el pretratamiento térmico de la FORSU con dos factores de severidad de 2.11 y 2.35 en la producción de etanol por CMS. Se alcanzó una producción máxima de  $282.61 \pm 13.09 \text{ L}$  de etanol por tonelada de materia seca (MS) con un factor de severidad de 2.35 y utilizando un inóculo compuesto por un cultivo mixto (CM) compuesto de tres levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* ITD00196, *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785, y *Schwanniomyces occidentalis* ATCC26077).

A escala piloto se utilizaron dos tipos de biorreactores agitados: con listones helicoidales y con tornillo sin fin, para evaluar el pretratamiento térmico de la mezcla sólida estándar de la FORSU con un factor de severidad de 2.35 en el primer tipo de bioreactor y sin pretratamiento térmico en el bioreactor con tornillo sin fin.

Con el bioreactor con listones helicoidales se alcanzó una producción máxima de  $245.72 \pm 17.76 \text{ L}$  de etanol por tonelada de MS, utilizando un cultivo mixto de levaduras. Utilizando

el biorreactor de tornillo sin fin se alcanzó una producción máxima de  $209.16 \pm 12.55$  L de etanol por tonelada de MS, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITD00196.

Los resultados demostraron que el proceso se simula con éxito utilizando una cinética de decaimiento de primer orden para el consumo de carbohidratos fermentables y el modelo de Gompertz para la producción de etanol; estos modelos son útiles para describir el alcance de la bioreacción. El monitoreo en línea de los gases ( $\text{CO}_2$ ) se propuso como una herramienta útil para el control de bioprocesos de producción de etanol a partir de la mezcla sólida estándar de la FORSU.

Con los resultados obtenidos se demuestra que la mezcla sólida estándar de la FORSU, pretratada térmicamente, tiene un alto potencial para su uso en la producción de etanol utilizando un cultivo mixto a escala laboratorio y piloto en condiciones de cultivo en medio sólido, sin pretratamientos termoquímico ni enzimático.

## **ABSTRACT**

Economic development and industrialization in Mexico led to an increase in the consumption of raw materials, which have had a significant impact on the volume and composition of waste generated. In Mexico, more than 53 million tons of municipal solid wastes (MSW) are generated each year, 52 % corresponds to organic matter. The Ministry of Development and Environment (SEDEMA) indicates that in 2017, 12 998 tons per day of MSW were generated in Mexico City, where 41 % was generated in the municipalities of Iztapalapa (2 245 tons/day), the Gustavo A. Madero (1 735 tons/day) and the Cuauhtemoc (1 316 tons/day).

Conventional discharge into sanitary landfills and open-air dumps is a common method of MSW disposal in Mexico. Currently, alternative treatment methods such as composting and anaerobic digestion have been used to dispose some of these wastes. However, due to the high availability of these wastes, new processes are researched for this purpose.

Therefore, the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) turns out to be an attractive raw material for its direct fermentation in ethanol by solid-state culture (SSC).

A solid standard mixture representing the annual composition of fresh fruits and vegetables residues generated at the Supply Center in Mexico City was used for ethanol production. This type of residues allows ethanol production with a mild thermal pre-treatment instead of hard thermochemical or enzymatic treatments.

In this work, methodologies were developed for the production of yeast biomass for use in SSC as inoculums. Besides, the pre-treatment of the raw material was optimized using a central composite factorial design (CCFD) and finally, fermentation strategies were developed in SSC at laboratory and pilot scale to produce ethanol.

In the first experimental stage, the fermentation capacity of different yeasts was evaluated by cultivation in Erlenmeyer flasks with different flask design and filling volume for the biomass production. It was found that a filling volume of 20 % leads to better microbial growth and allows better inoculums production independently of flask design. The Crabtree effect was evaluated quantitatively through ethanol productivity under aerobic conditions and microbial growth by product consumption. Yeasts with a positive Crabtree effect have a high potential for rapid ethanol production during direct OFMSW fermentation.



The second experimental stage aimed to optimize the carbohydrates release and decrease the inhibitors concentration such as acetic acid and hydroxymethylfurfural (HMF). For this purpose, a CCFD was proposed in terms of pressure-temperature and residence time, at adding three levels of sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0, 1 and 2 % w/w) during the pre-treatment of the solid standard mixture of the OFMSW.

An increase in carbohydrates fermentable of 68.3, 59.5 and 155.3 % was obtained, at optimized pre-treatment conditions (2.2 kg/cm<sup>2</sup> (135 °C) and 12 min), at pre-treatment conditions (2.7 kg/cm<sup>2</sup> (140 °C) and 15 min) with 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and pre-treatment conditions (2.7 kg/cm<sup>2</sup> (140 °C) and 15 min) with 2 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectively, compared to the standard thermal sterilization conditions (1.1 kg/cm<sup>2</sup> and 15 min) without the addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Due to practical problems in the pH adjustment in the SSF stage, it was decided to evaluate two thermal pre-treatments 2.2 kg/cm<sup>2</sup> (135 °C) and 12 min and 2.7 kg/cm<sup>2</sup> (140 °C) and 15 min, without the addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, these conditions exhibit a severity factor (SF) of 2.11 and 2.35, respectively. SF is a practical criterion for comparison of thermal pretreatment of the solid standard mixture of the OFMSW.

Finally, in the third experimental stage, the direct fermentation of ethanol from the use of OFMSW by SSC was carried out; axenic and mixed cultures of yeasts at laboratory and pilot scale was evaluated. At laboratory scale, tubular bioreactors were used; two SF were evaluated (2.11 and 2.35) in the OFMSW thermal pre-treatments for ethanol production by SSC. A maximum production of 282.61±13.09 L of ethanol per ton of dry matter (DM) was reached with a SF of 2.35, using inoculums composed of a mixed culture (MC) of three yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* ITD00196, *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785, y *Schwanniomyces occidentalis* ATCC26077).

At pilot scale, helical ribbons and an endless screw bioreactors were used. A severity factor of 2.35 and without pre-treatment of solid standard mixture of the OFMSW was evaluated in the ethanol production by SSC, respectively. With helical ribbons bioreactor, a maximum ethanol production of 245.72±17.76 L of ethanol per ton of DM was reached, using a MC, on the other hand, and using the endless screw bioreactor a maximum production of 209.16±12.55 L of ethanol per ton of DM was reached, using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ITD00196.

The results demonstrated the process could be simulated successfully using a first-order decay kinetic for the consumption of fermentable carbohydrates and the Gompertz model for the

ethanol production; these models are useful in describing the extent of the bioreaction. Online gas monitoring ( $\text{CO}_2$ ) was proposed as a useful tool for bioprocess control in ethanol production from a solid standard mixture of the OFMSW.

With the results obtained, it is demonstrated that the thermally pre-treated solid standard mixture of the OFMSW presents a high potential for its use in ethanol production using a mixed culture at laboratory and pilot scale under solid-state culture conditions without any thermochemical or enzymatic pre-treatment.

# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	iv
DEDICATORIA .....	iv
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	viii
CONTENIDO .....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xv
ABREVIATURAS .....	xvii
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	6
2.1. Biomasa para la producción de etanol .....	6
2.1.1. Estructura de la biomasa .....	9
2.1.2. Fracción orgánica de los RSU para la producción de etanol .....	11
2.2. Pretratamiento de la FORSU .....	14
2.2.1. Pretratamiento mecánico .....	16
2.2.2. Pretratamiento térmico .....	18
2.3. Proceso de fermentación de la FORSU .....	22
2.3.1. Microorganismos utilizados en el proceso de fermentación .....	25
2.3.2. Efecto de la concentración de carbohidratos .....	27
2.3.3. Efecto de la concentración de etanol .....	28
2.3.4. Efecto del oxígeno (Efactor Pasteur) .....	28
2.3.5. Efecto Crabtree .....	29
2.3.6. Efecto del pH y de la temperatura .....	33
2.3.7. Efecto de la adición de nutrientes .....	33
2.4. Esquemas de fermentación en la producción de etanol .....	33
2.4.1. Cultivo en medio sólido .....	38
2.4.2. Biorreactores en el cultivo en medio sólido .....	39
2.5. Comentario final de la revisión bibliográfica .....	43
3. JUSTIFICACIÓN .....	46
4. HIPÓTESIS .....	49
5. OBJETIVOS .....	51
5.1. Objetivo general .....	51
5.2. Objetivos particulares .....	51
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	53
6.1. Microorganismos .....	53
6.2. Formulación de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos .....	53
6.3. Mantenimiento, propagación y crecimiento de los microorganismos .....	54
6.4. Producción de biomasa .....	54
6.5. Consideraciones matemáticas usadas en el modelamiento de la producción de biomasa .....	56
6.6. Aplicación de las levaduras utilizadas en la fermentación de una mezcla sólida estándar de la FORSU sin pretratamiento .....	58

6.7. Pretratamiento térmico de la mezcla sólida estándar de la FORSU .....	58
6.8. Consideraciones matemáticas usadas en el pretratamiento de la mezcla sólida estándar de la FORSU .....	60
6.9. Prueba preliminar de producción de etanol a partir de la fermentación de la mezcla sólida estándar pretratada a diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0, 1 y 2 %p/p) a escala laboratorio .....	61
6.10. Producción de etanol a partir de la mezcla sólida estándar de la FORSU a escala laboratorio.....	62
6.11. Producción de etanol a partir de la mezcla sólida estándar de la FORSU a escala piloto .....	62
6.11.1. Biorreactor listones helicoidales .....	63
6.11.2. Biorreactor con tornillo sin fin.....	65
6.11.3. Consideraciones matemáticas usadas en la producción de etanol a partir de la mezcla sólida estándar de la FORSU a escala laboratorio y piloto .....	67
6.12. Muestreo y tratamiento de muestras .....	68
6.12.1. Determinación de los carbohidratos estructurales y caracterización química de la mezcla sólida estándar de la FORSU .....	68
6.12.2. Extracción de carbohidratos fermentables, inhibidores y etanol a partir de la mezcla sólida estándar de la FORSU.....	68
6.13. Métodos analíticos .....	69
6.13.1. Determinación del crecimiento microbiano en CMS a escala laboratorio y piloto en la fermentación de la FORSU.....	69
6.13.2. Análisis por HPLC.....	69
6.14. Análisis estadístico .....	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	71
7. Evaluación del efecto del diseño de matraces Erlenmeyer y los niveles de llenado en la producción de biomasa ..	72
7.1. Producción de biomasa de levaduras a partir de glucosa como fuente de carbono .....	73
7.2. Parámetros cinéticos de crecimiento .....	76
7.3. Análisis estadístico de los parámetros cinéticos de crecimiento .....	79
7.4. Conclusiones de la producción de inóculos.....	81
8. Análisis del efecto Crabtree en el cultivo de levaduras.....	82
8.1. Análisis del efecto Crabtree en las levaduras <i>S. cerevisiae</i> ITD00196 y <i>Schw. occidentalis</i> ATCC26077 en la producción de biomasa a partir de glucosa como fuente de carbono .....	83
8.2. Parámetros cinéticos derivados de la producción de etanol y su consumo para el crecimiento celular .....	86
8.3. Análisis estadístico de los parámetros cinéticos derivados de la producción de etanol y su consumo para el crecimiento celular.....	89
8.4. Conclusiones del análisis del efecto Crabtree .....	90
9. Efecto del diseño de matraz y volumen de llenado en el metabolismo de las levaduras <i>S. stipitis</i> a partir del uso de xilosa.....	92
9.1. Producción de biomasa de las levaduras <i>S. stipitis</i> ATCC58785 y <i>S. stipitis</i> Y-17104 a partir de xilosa como fuente de carbono.....	92
9.2. Análisis del efecto Crabtree en las levaduras <i>S. stipitis</i> ATCC58785 y <i>S. stipitis</i> Y-17104 en la producción de biomasa a partir de xilosa como fuente de carbono.....	93
9.3. Análisis de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la formación de biomasa y producción de etanol durante el cultivo de <i>S. stipitis</i> ATCC58785 y <i>S. stipitis</i> Y-17104 usando xilosa como fuente de carbono.....	96
9.4. Aplicación de las levaduras estudiadas en el aprovechamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos para la producción de etanol por cultivo en medio sólido .....	100
9.5. Conclusiones del uso de xilosa como fuente de carbono y del alto potencial de la MSE para la producción de etanol.....	102
10. Determinación de las condiciones de pretratamiento de la FORSU .....	103

10.1. Caracterización química y carbohidratos estructurales de la mezcla sólida estándar de la FORSU sin y con pretratamiento térmico.....	103
10.2. Optimización de la liberación de carbohidratos fermentables y reducción de inhibidores en la mezcla sólida estándar de la FORSU usando un DFCC sin la adición de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	105
10.3. Análisis estadístico del diseño factorial central compuesto sin la adición de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	108
10.4. Optimización de la liberación de carbohidratos fermentables y la reducción de inhibidores en la mezcla sólida estándar de la FORSU usando un DFCC y la adición de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 y 2 % p/p).....	110
10.5. Análisis estadístico del diseño factorial central compuesto con la adición de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	112
10.6. Prueba preliminar de producción de etanol a partir de la fermentación de la mezcla sólida estándar pretratada a diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0, 1 y 2 % p/p) a escala laboratorio.....	113
10.7. Conclusiones del pretratamiento térmico de la MSE .....	116
11. Evaluación del potencial de la FORSU pretratada para la producción de etanol.....	117
11.1 Producción de etanol por cultivo en medio sólido a partir de la FORSU a escala laboratorio .....	117
11.2 Cinética de producción de etanol por cultivo en medio sólido a partir de la FORSU a escala laboratorio....	123
11.3 Cinética de la producción de etanol por cultivo en medio sólido a partir de la FORSU a escala piloto en un biorreactor con un tornillo sin fin (BTSF).....	124
11.4 Cinética de la producción de etanol por cultivo en medio sólido a partir de la FORSU a escala piloto en un biorreactor de listones helicoidales (BLH) .....	126
11.5 Comparación de la producción de etanol por CMS a partir de residuos orgánicos a escala de laboratorio y piloto .....	128
11.6 Conclusiones en la producción de etanol a escala laboratorio y piloto .....	132
12. CONCLUSIONES GENERALES .....	134
13. PERSPECTIVAS .....	136
14. REFERENCIAS .....	138
15. ANEXOS .....	147
15.1. Anexo A. Modelo logístico para simular el crecimiento a partir de la biomasa obtenida (Zwietering y col, 1990; Mazaheri y col., 2013) .....	147
15.2. Anexo B. Modelo matemático para simular el crecimiento microbiano (X) y el consumo de sustrato (S) (Soto-Cruz y col., 2002) .....	149
15.3. Anexo C. Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación de carbohidratos, inhibidores y etanol por HPLC .....	150
15.4. Anexo D. Producción de biomasa y evolución de la concentración de glucosa y etanol durante los experimentos con las diferentes levaduras utilizadas, los diferentes diseños de matraz, volúmenes de llenado y fuentes de carbono .....	152
15.5. Anexo E. Análisis de varianza de los parámetros cinéticos obtenidos de la producción de biomasa y evolución de la concentración de glucosa y etanol durante los experimentos con las diferentes levaduras utilizadas, los diferentes diseños de matraz, volúmenes de llenado y fuentes de carbono.....	155
15.6. Anexo F. Diseño factorial central compuesto con puntos estrella, superficies de respuesta y contornos, coeficientes de regresión y p-valores, usados para evaluar el efecto de la presión (temperatura) y tiempo de residencia en el pretratamiento térmico sobre la mezcla estándar de los residuos utilizados con adición de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1 y 2 % (p/p) sobre la mezcla estándar de los residuos utilizados.....	163
15.7. Anexo G. Publicaciones y presentaciones en congresos .....	167

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Composición de mezcla de desechos de alimentos (modificado de Uçkun Kiran y col., 2014).....	12
<b>Tabla 2.2.</b> Resumen de los diversos procesos utilizados para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Kumar y col., 2009).....	15
<b>Tabla 2.3.</b> Microorganismos usados en la fermentación de residuos lignocelulósicos. ....	25
<b>Tabla 6.1.</b> Diseño factorial utilizado para la obtención de inóculos. ....	55
<b>Tabla 6.2.</b> Diseño factorial utilizado para el pretratamiento térmico de la mezcla sólida estándar de la FOSRU. ....	59
<b>Tabla 6.3.</b> Diseño factorial central compuesto aplicado en el pretratamiento térmico de la mezcla sólida estándar de la FORSU.....	60
<b>Tabla 7.1.</b> Análisis estadístico donde se indica el efecto del diseño de matraz y del volumen de llenado sobre la $X_{max}$ , $\mu$ , $Y_{x/s}'$ y $Y_{x/s}''$ en los diferentes cultivos utilizados.....	80
<b>Tabla 8.1.</b> Análisis estadístico del efecto del diseño de matraz y del volumen de llenado sobre la productividad de etanol, $Y_{p/s}$ y $Y_{x/p}$ en los diferentes cultivos utilizados. ....	90
<b>Tabla 9.1.</b> Análisis estadístico donde se indica el efecto del diseño de matraz y del volumen de llenado sobre la $X_{max}$ , $\mu$ , $Y_{x/s}'$ y $Y_{x/s}''$ en los diferentes cultivos utilizando xilosa como fuente de carbono.....	99
<b>Tabla 9.2.</b> Análisis estadístico donde se indica el efecto del diseño de matraz y del volumen de llenado sobre la productividad de etanol, $Y_{p/s}$ y $Y_{x/p}$ en los diferentes cultivos utilizando xilosa como fuente de carbono. ....	100
<b>Tabla 10.1.</b> Caracterización química de la mezcla estándar con pretratamiento térmico (FS=2.35). ....	103
<b>Tabla 10.2.</b> Carbohidratos estructurales de la mezcla sólida estándar sin y con pretratamiento térmico (FS=2.35).....	104
<b>Tabla 10.3.</b> Diseño factorial central compuesto con puntos estrella, usado para evaluar el efecto de la presión (temperatura) y tiempo de residencia en el pretratamiento térmico sobre la mezcla sólida estándar utilizada sin adición de $H_2SO_4$ . ....	107
<b>Tabla 10.4.</b> Coeficientes de regresión y p-valores obtenidos del análisis estadístico del diseño factorial central compuesto con puntos estrella en el pretratamiento térmico sobre la mezcla sólida estándar sin adición de $H_2SO_4$ . ....	109
<b>Tabla 10.5.</b> Concentración de carbohidratos fermentables e inhibidores en el pretratamiento térmico de la mezcla sólida estándar con adición de $H_2SO_4$ . ....	112
<b>Tabla 11.1.</b> Producción de etanol a escala laboratorio y piloto a diferentes condiciones de pretratamiento. ....	129
<b>Tabla 11.2.</b> Comparación en la producción de etanol a escala laboratorio y piloto, a partir de residuos orgánicos pretratados a diferentes condiciones en CML y CMS. ....	131

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Bioconversión de la energía solar en biocombustibles (modificado de Rubin, 2008).	7
<b>Figura 2.2.</b> Representación estructural de la biomasa lignocelulósica con hemicelulosa, celulosa y lignina (Rubin, 2008).	10
<b>Figura 2.3.</b> Composición de los RSU por tipo de residuo (SEDESOL, 2012).	13
<b>Figura 2.4.</b> Esquema de hidrólisis de la glucosa a inhibidores (Ulbricht y col., 1984).	20
<b>Figura 2.5.</b> Esquema del papel del pretratamiento en la conversión de biomasa en biocombustible (Kumar y col., 2009).	21
<b>Figura 2.6.</b> Ruta metabólica para la obtención de etanol (modificado de Zamora-Hernández y col., 2014).	23
<b>Figura 2.7.</b> Materias primas, rutas metabólicas y procesos de producción de etanol (modificado de Zamora-Hernández y col., 2014).	24
<b>Figura 2.8.</b> Diseños básicos de biorreactores para CMS, clasificados en cuatro grupos dependiendo del tipo de mezclado y aireación (modificado de Pandey, 1991).	40
<b>Figura 6.1.</b> Diseño del matraz Erlenmeyer usado: <b>A)</b> convencional, <b>B)</b> con resorte y <b>C)</b> bafleado.	55
<b>Figura 6.2.</b> Esquema del biorreactor escala piloto (LH) para la fermentación en cultivo en medio sólido. Vista lateral del biorreactor.	63
<b>Figura 6.3.</b> Biorreactor escala piloto (LH) para la fermentación en cultivo en medio sólido. A) Vista lateral del biorreactor y B) Vista superior del biorreactor.	64
<b>Figura 6.4.</b> Esquema del biorreactor escala piloto (TSF) para la fermentación en cultivo en medio sólido. Vista superior del biorreactor de tornillos sin fin.	65
<b>Figura 6.5.</b> Biorreactor de tornillo sin fin a escala piloto (TSF) para la producción en cultivo en medio sólido de etanol. A) Vista lateral del biorreactor y B) Vista superior de los tornillos sin fin.	66
<b>Figura 7.1.</b> Crecimiento de levaduras en los tres diseños de matraz con glucosa como fuente carbono: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. La línea continua corresponde a la simulación del modelo logístico del crecimiento de las levaduras: <b>A)</b> <i>S. cerevisiae</i> ITD00196; <b>B)</b> <i>S. cerevisiae</i> (levadura de panadería); <b>C)</b> <i>S. stipitis</i> ATCC58785; <b>D)</b> <i>S. stipitis</i> Y-17104; <b>E)</b> <i>Schw. occidentalis</i> ATCC26077; y <b>F)</b> <i>K. marxianus</i> CBS6556.	74
<b>Figura 7.2.</b> Parámetros de cinéticos de cultivo y coeficientes de rendimientos obtenidos durante el cultivo de todas las levaduras usando diferentes diseños de matraz: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. <i>S. cerevisiae</i> ITD00196 (SC); <i>S. cerevisiae</i> (levadura de panadería) (BY); <i>S. stipitis</i> ATCC58785 (SSATCC); <i>Schw. occidentalis</i> ATCC26077 (SO); <i>S. stipitis</i> Y-17104 (SSY); <i>K. marxianus</i> CBS6556 (KM).	77
<b>Figura 8.1.</b> Evolución de la concentración de biomasa (●, ○), glucosa (▲, △) y etanol (■, □) con las levaduras <i>S. cerevisiae</i> ITD00196 ( <b>A</b> y <b>B</b> ) y <i>Schw. occidentalis</i> ATCC26077 ( <b>C</b> y <b>D</b> ) durante su cultivo en medio líquido en un matraz bafleado. Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. MF: Metabolismo fermentativo y MR: Metabolismo respiratorio.	85
<b>Figura 8.2.</b> Parámetros cinéticos de cultivo y coeficientes de rendimientos obtenidos de la producción de etanol en todas las levaduras analizadas y con diferentes diseños de matraz en el consumo de glucosa: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. <i>S. cerevisiae</i> ITD00196 (SC); <i>S. cerevisiae</i> (levadura de panadería) (BY); <i>K. marxianus</i> CBS6556 (KM); <i>S. stipitis</i> ATCC58785 (SSATCC); <i>S. stipitis</i> Y-17104 (SSY); <i>Schw. occidentalis</i> ATCC26077 (SO).	87
<b>Figura 9.1.</b> Curvas de crecimiento en los tres diseños de matraz para consumo de xilosa: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. La línea continua corresponde al ajuste del modelo logístico integral a las curvas de crecimiento de las levaduras: <b>A)</b> <i>S. stipitis</i> ATCC58785; <b>B)</b> <i>S. stipitis</i> Y-17104.	93
<b>Figura 9.2.</b> Evolución de la concentración de biomasa (●, ○), xilosa (▲, △) y etanol (■, □) con las levaduras <i>S. stipitis</i> ATCC58785 ( <b>A</b> y <b>B</b> ); <i>S. stipitis</i> Y-17104 ( <b>C</b> y <b>D</b> ), durante su cultivo en medio líquido en un matraz convencional. Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. MF: Metabolismo fermentativo y MR: Metabolismo respiratorio.	94
<b>Figura 9.3.</b> Parámetros de cinéticos de cultivo y coeficientes de rendimientos obtenidos durante los experimentos con las levaduras en diferentes diseños de matraz en el consumo de xilosa: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. <i>S. stipitis</i> ATCC58785 (SSATCC); <i>S. stipitis</i> Y-17104 (SSY).	97

**Figura 9.4.** Concentración de etanol (○) y carbohidratos fermentables (▲) usando diferentes levaduras en la fermentación de una mezcla estándar de FORSU sin pretratamiento térmico. Control 1 (C1) a tiempo inicial; Control 2 (C2) a tiempo final (30h); *S. cerevisiae* ITD00196 (SC); *S. cerevisiae* (levadura de panadería) (BY); *S. stipitis* ATCC58785 (SSATCC); *Schw. occidentalis* ATCC26077 (SO); *S. stipitis* Y-17104 (SSY); *K. marxianus* CBS6556 (KM); Cultivo mixto (CM). ..... 101

**Figura 10.1.** Superficie de respuesta y contornos que muestran la interacción de la presión y el tiempo de resistencia en las variables de respuesta carbohidratos fermentables (Sac + Glu + Fru) (A) y ácido acético (B) después del pretratamiento térmico sin la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. ..... 108

**Figura 10.2.** Superficie de respuesta y contornos que muestran la interacción de la presión y el tiempo de resistencia para la variable de respuesta carbohidratos fermentables (CF; Sac + Glu + Fru + Xil) después del pretratamiento térmico con la adición de 1 (A) y 2 % (B) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. ..... 113

**Figura 10.3.** Ajuste del pH con hidróxido de calcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) de una mezcla sólida estándar de FORSU con pretratamiento térmico con un FS=2.35 (2.7 kg/cm<sup>2</sup>-15 min) y con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a concentración del 1 (barras grises) y 2 % (barras blancas). ..... 114

**Figura 10.4.** Concentración de etanol en la fermentación de una mezcla sólida estándar utilizada con pretratamiento térmico con un FS=2.35 (2.7 kg/cm<sup>2</sup>-15 min) y con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a concentración de 0, 1 y 2 %, sin ajuste de pH (barras grises) y con ajuste de pH (barras blancas) usando la levadura *S. cerevisiae* ITD00196. ..... 115

**Figura 11.1.** Concentración final de etanol (○) y carbohidratos fermentables (▲) en la fermentación de una mezcla sólida estándar de FORSU con pretratamiento térmico con un FS=2.11 (2.2 kg/cm<sup>2</sup>-12 min) sin H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A) y Rendimiento de producción (◆) por consumo de sustrato (Y<sub>p/s</sub>) (B). Control 1 (C1) a tiempo inicial; Control 2 (C2) a tiempo final (30 h); *S. cerevisiae* ITD00196 (SCD); *S. cerevisiae* (levadura de panadería) (SCP); *S. stipitis* ATCC58785 (SSAT); *Schw. occidentalis* ATCC26077 (SO); *S. stipitis* Y-17104 (SSY); *K. marxianus* CBS6556 (KM); Cultivo mixto (CM). ..... 118

**Figura 11.2.** Concentración final de etanol (○) y carbohidratos fermentables (▲) en la fermentación de una mezcla sólida estándar de FORSU con pretratamiento térmico con un FS=2.35, 0.67 y 1.14 y a concentración de 0(A), 1(B) y 2 %(C) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rendimiento de producción de etanol por consumo de los CF (Y<sub>p/s</sub>) (D) a concentración de 0 (●), 1 (▲) y 2 % (■) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Control 1 (C1) a tiempo inicial; Control 2 (C2) a tiempo final (30 h); *S. cerevisiae* ITD00196 (SCD); *S. cerevisiae* (levadura de panadería) (SCP); *S. stipitis* ATCC58785 (SSAT); *Schw. occidentalis* ATCC26077 (SO); *S. stipitis* Y-17104 (SSY); *K. marxianus* CBS6556 (KM); Cultivo mixto (CM). ..... 120

**Figura 11.3.** Concentración de CO<sub>2</sub> (■), concentración de O<sub>2</sub> (□) (A) en el espacio de cabeza del biorreactor; las líneas sólidas representan la tasa de producción de etanol (dE/dt) simulada con el modelo de Gompertz. Consumo de carbohidratos fermentables (●) y producción de etanol (○) (B) durante la fermentación de una mezcla sólida estándar de FORSU con pretratamiento térmico con un FS=2.35 usando cultivo mixto a escala laboratorio. Las líneas sólidas representan el ajuste del modelo de primer orden para el consumo de los carbohidratos fermentables y el ajuste del modelo integral de Gompertz para la producción de etanol. ..... 124

**Figura 11.4.** Concentración de CO<sub>2</sub> (■), concentración de O<sub>2</sub> (□) (A y C) en el espacio de cabeza del biorreactor; las líneas sólidas representan la tasa de producción de etanol (dE/dt) simulada con el modelo de Gompertz. Consumo de carbohidratos fermentables (●) y producción de etanol (○) (B y D) durante la fermentación de la mezcla sólida estándar de FORSU con pretratamiento térmico usando *S. cerevisiae* ITD00196 a escala piloto en un biorreactor con un tornillo sin fin (25kg). Las líneas sólidas representan el ajuste del modelo de primer orden para el consumo de los carbohidratos fermentables y el ajuste del modelo integral de Gompertz para la producción de etanol. ..... 126

**Figura 11.5.** Concentración de CO<sub>2</sub> (■), concentración de O<sub>2</sub> (□) (A) en el espacio de cabeza del biorreactor; las líneas sólidas representan la tasa de producción de etanol (dE/dt) simulada con el modelo de Gompertz. Consumo de carbohidratos fermentables (●) etanol (○) (B) durante el CMS de una mezcla sólida estándar de FORSU, tratada con un pretratamiento térmico con un FS=2.35 usando un cultivo mixto como inóculo a escala piloto usando un biorreactor de listones helicoidales (18kg). Las líneas sólidas representan el ajuste del modelo de primer orden para el consumo de los carbohidratos fermentables y el ajuste del modelo integral de Gompertz para la producción de etanol. ..... 127



## ABREVIATURAS

**%:** Porcentaje

**μ:** Tasa específica de crecimiento  
(Oficina central para los cultivos de moho)

**a<sub>w</sub>:** Actividad de agua

**ADH:** Alcohol deshidrogenasa

**ADP:** Adenosin difosfato

**ANOVA:** Análisis de varianza

**ATCC:** American Type Culture Collection  
(Colección Americana de Cultivos Tipo)

**ATP:** Adenosin trifosfato

**BLH:** Biorreactor con listones helicoidales

**BRT:** Biorreactor tubular

**BTSE:** Biorreactor con tornillo sin fin

**C/N:** Relación carbono/nitrógeno

**CBS:** Centraalbureau voor Schimmelcultures

**CDMX:** Ciudad de México

**cel:** Células

**CF:** Carbohidratos fermentables (glucosa,  
fructosa, sacarosa y/o xilosa)

**CH<sub>4</sub>:** Metano

**cm:** Centímetro

**CM:** Cultivo mixto

**cm<sup>2</sup>:** Centímetro cuadrado

**CMS:** Cultivo en medio sólido

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**DFCC:** Diseño factorial central compuesto

**Eprod:** Productividad de etanol

**ETE:** Esterilización térmica estándar

**EtOH:** Etanol

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas  
para la alimentación y la agricultura

**FORSU:** Fracción orgánica de los residuos  
sólidos urbanos

**Fru:** Fructosa

**FS:** Factor de severidad

**FSC:** Factor de severidad combinado

**g:** Gramos

**Glu:** Glucosa

**h:** Hora

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Ácido sulfúrico

**hab:** Habitante

**HMF:** Hidroximetilfurfural

**HPLC:** Cromatografía líquida de alto  
desempeño

**HSD:** Diferencia honestamente significativa  
de Tukey

**ITD:** Instituto Tecnológico de Durango

**kg:** Kilogramo

***Kluyveromyces marxianus* CBS6556:** *K. marxianus* CBS6556 o KM

**L:** Litros

**LH:** Listones helicoidales

**MF:** Metabolismo fermentativo

**mg:** Miligramo

**MH:** Materia húmeda

**min:** Minutos

**mL:** Mililitros

**mM:** Milimolar

**MMS:** Media móvil simple

**MR:** Metabolismo respiratorio

**MS:** Materia seca

**MSE:** Mezcla sólida estándar

**MSI:** Materia seca inicial

**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótido  
oxidado

**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótico  
reducido

**ND:** No detectado

**nm:** Nanómetros

**°C:** Grados Celsius

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno

**p/p:** Peso/peso

**p/v:** Peso/volumen

**PDC:** piruvato descarboxilasa

**Pi:** Fósforo inorgánico

**PT:** Pretratamiento térmico

**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinación

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RSU:** Residuos sólidos urbanos

**Sac:** Sacarosa

***Saccharomyces cerevisiae* (Levadura de panadería):** *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) o BY

***Saccharomyces cerevisiae* ITD00196:** *S. cerevisiae* ITD00196 o SC o SCD

***Scheffersomyces stipitis* ATCC58785:** *S. stipitis* ATCC58785 o SSATCC o SSAT

***Scheffersomyces stipitis* Y-17104:** *S. stipitis* Y-17104 o SSY

***Schwanniomyces occidentalis* ATCC26077:** *Schw. occidentalis* ATCC26077 o SO

**SEDEMA:** Secretaría de Desarrollo y Medio Ambiente

**SEDESOL:** Secretaría de Desarrollo Social

**SSF:** Sacarificación y fermentación simultánea

**SV (%):** Sólidos volátiles (%)

**Ton:** Tonelada

**TSF:** Tornillo sin fin

**v/v:** Volumen/volumen

**X:** Biomasa

**Xil:** Xilosa

**X<sub>max</sub>:** Biomasa máxima

**Y<sub>p/s</sub>:** Rendimiento de etanol producido por el consumo de glucosa (g/g)

**Y<sub>x/p</sub>:** Rendimiento de biomasa producida por el consumo de producto (etanol) (g/g)

**Y<sub>x/s</sub>':** Rendimiento de biomasa producida por el consumo de sustrato (glucosa) (g/g) calculado entre las 8 y 36h

**Y<sub>x/s</sub>'':** Rendimiento de biomasa producida por el consumo de sustrato (glucosa) (g/g) después de 48h

# INTRODUCCIÓN

---

## ***CAPÍTULO 1*** ***INTRODUCCIÓN***

## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo económico y la industrialización en México produjeron un aumento en el consumo de materias primas, que ha impactado significativamente en el volumen y la composición de los residuos generados.

En México, se generan más de 53 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos (RSU) al año, de los cuales se calcula que el 52 % corresponde a materia orgánica. La Ciudad de México (CDMX) es la entidad federativa con mayor población, después del Estado de México, y en consecuencia la de mayor generación de residuos sólidos. La Secretaría de Desarrollo y Medio Ambiente (SEDEMA, 2015) indica que, en el 2017, se generaron 12 998 toneladas al día de RSU, donde el 41 % fue generado en las Alcaldías de Iztapalapa (2 245 Ton/día), Gustavo A. Madero (1 735 Ton/día) y Cuauhtémoc (1 316 Ton/día).

También, se observó un aumento en la generación de RSU per cápita que, en el 2011 se generaron 0.30 kg/día hab hasta alcanzar una generación entre 0.85 – 2.42 kg/día hab, en el 2015. Esta variación en la generación de residuos per cápita depende del desarrollo tecnológico, industrial y económico, densidad poblacional, hábitos de consumo, nivel de ingreso, conciencia ambiental, entre otros factores. La inadecuada disposición de los RSU, trae como consecuencia impactos negativos en la salud humana y en el medio ambiente (Cortinas de Nava, 2006). El vertido convencional en rellenos sanitarios y tiraderos a cielo abierto es un método común en México para la eliminación de los RSU. Durante la putrefacción (degradación anaerobia no controlada), la materia orgánica es transformada por microorganismos en compuestos más simples, que conducen a la formación de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> (Zhang y col., 2012a) y lixiviados, ocasionando contaminación al suelo, agua y atmósfera.

Actualmente, los métodos de compostaje y la digestión anaerobia se han utilizado para tratar algunos de estos residuos y producir composta para el mejoramiento de suelos y biogás usado para la producción de energía. Pero el desequilibrio en la oferta, la sobreproducción de residuos y la demanda de productos reciclados ha dificultado la aplicación más amplia de estas alternativas (Tang y col., 2008). Debido a esta problemática, se plantea darle un valor agregado a los RSU mediante el aprovechamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) la cual es rica en carbohidratos y se considera un desecho biomásico que puede ser procesado o

## INTRODUCCIÓN

---

transformado con la finalidad de obtener, por fermentación, metabolitos con un alto valor económico tales como el etanol (Tang y col., 2008; Escamilla-Alvarado y col., 2012).

La producción de biocombustibles líquidos, como el etanol es una opción sustentable para abordar problemas asociados con los combustibles fósiles (Kumar Saini y col., 2015). Ballesteros y col. (2010) mencionan que la FORSU debe ser considerada como biomasa con un alto potencial para su aprovechamiento en la producción de etanol. El etanol producto de la fermentación de la FORSU o de otro tipo de biomasa lignocelulósica es considerado de segunda generación, ya que no compite con alimentos de consumo humano (maíz, caña de azúcar, betabel, etc.) y, además es considerado un residuo agroindustrial.

Debido a que el pretratamiento para la hidrólisis de los FORSU se considera un paso limitante en el proceso de producción de etanol, se han propuesto diferentes alternativas de pretratamiento (Li y col., 2007; Ballesteros y col., 2010; Cesaro y Belgiorno, 2014; Zhi-Min y col., 2015). Li y col. (2007) demuestran que la hidrólisis con ácido diluido combinado con un tratamiento térmico es el método más eficiente de hidrólisis para la obtención de glucosa a partir de residuos sólidos urbanos. Sin embargo, la presencia de inhibidores como ácidos de cadena corta y furanos generados durante el pretratamiento es una limitante para la obtención de etanol por fermentación (Palmqvist y col., 1999; Taherzadeh y col., 2000; Negro y col., 2014). Por lo anterior, se está en la búsqueda de alternativas de pretratamiento más amigables con el medio ambiente y el proceso mismo de producción de etanol. También se propone el aprovechamiento de la FORSU por cultivo en medio sólido (CMS), debido a las ventajas que representa como son: no separar los carbohidratos de la biomasa, utilizar biorreactores de menor volumen y no generar aguas residuales, que necesitan ser pretratadas posteriormente.

En este estudio se desarrolló un bioproceso viable para la producción de etanol, a partir de los residuos frescos de frutas y verduras, con un suave pretratamiento térmico, utilizando cultivos axénicos o mixtos en cultivo en estado sólido. Este enfoque evita el uso de un pretratamiento termoquímico agresivo o enzimático y reduce considerablemente el consumo de agua y los costos de pretratamiento. El objetivo general de este trabajo fue desarrollar un proceso para la producción de etanol a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) a nivel laboratorio y piloto, por fermentación directa en cultivo en medio sólido, sin la separación de los carbohidratos para su fermentación en una fase líquida.

# INTRODUCCIÓN

---

Este trabajo de tesis doctoral se desarrolló en diferentes secciones como se muestra a continuación. En el Capítulo 2, se presenta la revisión bibliográfica donde se plantea toda la información crítica y detallada sobre la generación de la FORSU, la problemática que se genera por su gran abundancia, la estructura de la fracción orgánica, los pretratamientos planteados para la obtención de carbohidratos fermentables, el proceso de fermentación, así como los efectos involucrados y el cultivo en medio sólido.

En los Capítulos 3, 4 y 5, se plantea la justificación del problema de estudio, la hipótesis y los objetivos, respectivamente. En el Capítulo 6, se presentan los materiales y métodos utilizados como son: las condiciones de cultivo para la producción de inóculos, la descripción del pretratamiento dado a la mezcla estándar de la FORSU y las condiciones de cultivo para la producción de etanol a escala laboratorio y piloto.

El conjunto de los resultados se presenta en cinco capítulos (7, 8, 9, 10 y 11), donde se comparan los resultados obtenidos y se discuten con trabajos reportados. En el Capítulo 7 se plantean los resultados sobre la producción de inóculos a nivel laboratorio en función del volumen de llenado y del diseño de matraces Erlenmeyer; y su efecto sobre los parámetros cinéticos de crecimiento.

En el Capítulo 8 se analiza el efecto Crabtree observado en la producción de biomasa y se analizan los parámetros cinéticos de producción de etanol a partir del uso de glucosa como fuente de carbono. En el Capítulo 9 se discute el efecto del diseño de matraz y volumen de llenado en los parámetros cinéticos en la producción de biomasa y etanol a partir del uso de xilosa como fuente de carbono, así como, el uso potencial de estas levaduras para la producción de etanol a partir del uso de la mezcla sólida estándar de la FORSU en CMS.

En el Capítulo 10 se presentan las condiciones optimizadas de pretratamiento de la mezcla sólida estándar de la FORSU a partir de una metodología de superficie de respuesta. El Capítulo 11 corresponde a la producción de etanol a escala laboratorio y piloto, así como, la evaluación de los procesos de producción de etanol, en ambas escalas, y su comparación con la literatura. Las conclusiones generales y las perspectivas del trabajo se presentan en los capítulos 12 y 13. En el Capítulo 14 se enlistan las referencias consultadas para tener un panorama sobre la generación de etanol y discutir los resultados obtenidos. Para finalizar, en el Capítulo 15 se presentan los anexos generados de las ecuaciones utilizadas (desarrollos matemáticos) y de los resultados obtenidos. También, se incluyen los productos derivados de la tesis.

***CAPÍTULO 2***  
***REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA***

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Uno de los grandes retos en los últimos años a nivel mundial ha sido satisfacer de manera sustentable la gran demanda energética para transporte y procesos industriales. Los biocombustibles han surgido como una opción viable para generar energías limpias de manera sustentable. La incertidumbre en el suministro de petróleo debido al aumento en su demanda, disminución en las reservas energéticas, las preocupaciones en el calentamiento global por la generación de gases de efecto invernadero, producto del uso de combustibles fósiles son factores que han impulsado el interés gubernamental y social por los combustibles obtenidos a partir de fuentes renovables.

El etanol es uno de los combustibles líquidos más comunes, ya que puede producirse a partir de diferentes tipos de biomasa (como por ejemplo: maíz, caña de azúcar, betabel, sorgo, cáscaras de arroz, la FORSU, entre otros residuos agroindustriales), las cuales se obtienen en gran abundancia y son de bajo costo. Dependiendo la materia prima utilizada se ha estimado que con el uso de etanol se puede reducir entre un 30 a 85 % las emisiones de gases de efecto invernadero comparado con los combustibles derivados del petróleo (Fulton y col., 2004). Además, el uso de residuos agroindustriales o la FORSU le dan una ventaja a este tipo de biocombustibles ya que no compiten con otras fuentes biomásicas que podrían ser utilizadas en la alimentación humana. El incremento de los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) generados por municipios, industrias o actividades agrícolas se ha convertido en un problema mundial. Entre las tecnologías disponibles para el tratamiento y el reciclaje de los desechos orgánicos se presenta el cultivo en medio sólido como una metodología para reciclar materiales orgánicos o biomasa orgánica. Este tipo de cultivo es atractivo por que simula la forma de vida natural de muchos microorganismos.

### 2.1. Biomasa para la producción de etanol

La biomasa se define como el conjunto de materia orgánica renovable de origen vegetal, animal o procedente de su transformación natural o artificial (Pérez-Torralba, 2012).

La biomasa, por su origen, se puede clasificar en tres grandes grupos:

- *Biomasa natural*: se genera en ecosistemas sin intervención humana.

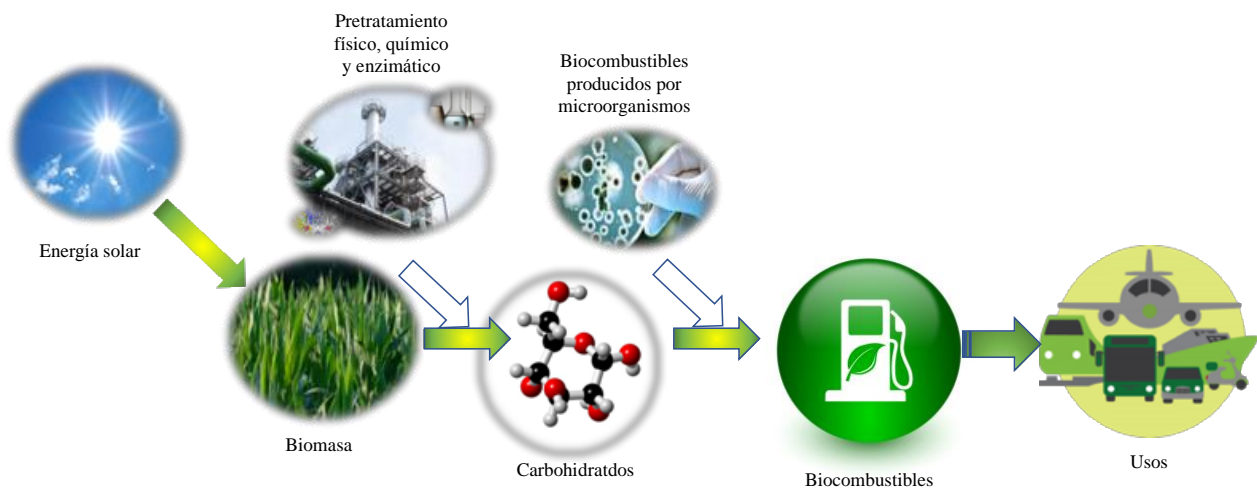


## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- *Biomasa residual*: se obtiene como resultado de actividades agrícolas, ganaderas y forestales, así como, de las industrias agroalimentarias y maderera.
- *Biomasa fósil*: formada por residuos de biomasa fosilizados a lo largo del tiempo (petróleo, carbón, gas natural, etc.).

El proceso de conversión de la biomasa en etanol podría contribuir a mitigar el cambio climático mundial reduciendo las emisiones (principalmente de CO<sub>2</sub>) y disminuyendo la dependencia de los combustibles fósiles. A partir del proceso de fotosíntesis, que aprovecha el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) atmosférico y de la energía de la radiación solar, se puede obtener la biomasa natural o residual vegetal compuesta por biopolímeros (lignocelulosa) capaces de ser aprovechados como energía. Su utilización permitirá reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> comparado al liberado por la quema de combustibles fósiles.

La combustión de ambos tipos de combustibles libera cantidades similares de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, pero en el proceso de biosíntesis de la biomasa se fija el CO<sub>2</sub> presente en el aire formando un ciclo debido a la captación y emisión que se obtiene del proceso de combustión. Los biocombustibles presentan ventajas considerables para el medio ambiente en comparación a los derivados del petróleo, pero la razón por la que no son ampliamente utilizados radica principalmente en el aspecto económico.



**Figura 2.1.** Bioconversión de la energía solar en biocombustibles (modificado de Rubin, 2008).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

En la Figura 2.1 se presenta un esquema general de la bioconversión de la energía solar en biocombustible. La energía solar es asimilada por las plantas a través de la fotosíntesis y es almacenada en los biopolímeros estructurales. De la hidrólisis de las plantas podemos obtener carbohidratos simples (hexosas y pentosas), que son convertidos posteriormente en biocombustibles por levaduras y bacterias.

Por otro lado, las materias primas utilizadas para la producción de etanol se pueden clasificar debido a la disponibilidad de los carbohidratos en tres tipos: azúcares, almidones y materia celulósica. Los azúcares más fáciles de fermentar se pueden obtener de la caña de azúcar, jugos de sorgo dulce y melaza. Los almidones se hidrolizan a carbohidratos fermentables utilizando tratamientos fisicoquímicos o enzimáticos y se pueden obtener del maíz, papas y tubérculos.

Por último, los materiales celulósicos se pueden obtener de maderas, residuos orgánicos (agrícolas) y del papel, donde para poder ser fermentados es indispensable un proceso de hidrólisis, en el que generalmente se utilizan procesos químicos y/o enzimáticos (Franks y col., 2006). La gran diversidad de recursos biomásicos en el mundo se pueden agrupar en cuatro categorías:

- Residuos de la industria de la madera
- Residuos sólidos urbanos
- Residuos agrícolas y
- Cultivos dedicados a la producción de sustratos utilizados exclusivamente para la producción de biocombustibles.

Estos recursos son los principales y más prometedores para su uso en el campo energético (Kumar Saini y col., 2015).

También, la biomasa vegetal se refiere a materiales de bajo costo, que se pueden encontrar en gran volumen y son ricos en biopolímeros no usados en el área de los alimentos. El maíz, el trigo, el arroz y la caña de azúcar son los cuatro cultivos agrícolas con mayor producción y superficie cultivada. Estos son responsables de la generación mayoritaria de biomasa lignocelulósica en el sector agropecuario y el resto de los residuos agropecuarios constituyen sólo una pequeña parte de la producción total de los mismos en el mundo.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

La producción de biocombustibles líquidos, como el etanol, ha sido defendida como una opción sustentable para abordar problemas asociados con los combustibles fósiles (Kumar Saini y col., 2015). Ballesteros y col. (2010) mencionan que la FORSU representa una biomasa lignocelulósica con un alto potencial para su aprovechamiento en la producción de etanol de segunda generación. Además, en México, los residuos sólidos urbanos son una gran problemática debido a que no son tratados adecuadamente, contaminan los mantos con sus lixiviados y son los principales generadores de gases de efecto invernadero. Debido a su abundancia y bajo costo, en comparación con los cultivos agrícolas dedicados exclusivamente para la generación de biomasa lignocelulósica, la FORSU es una alternativa para la producción de biocombustibles.

### 2.1.1. Estructura de la biomasa

La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina) es el principal componente de la pared celular de las plantas y más abundante en el planeta.

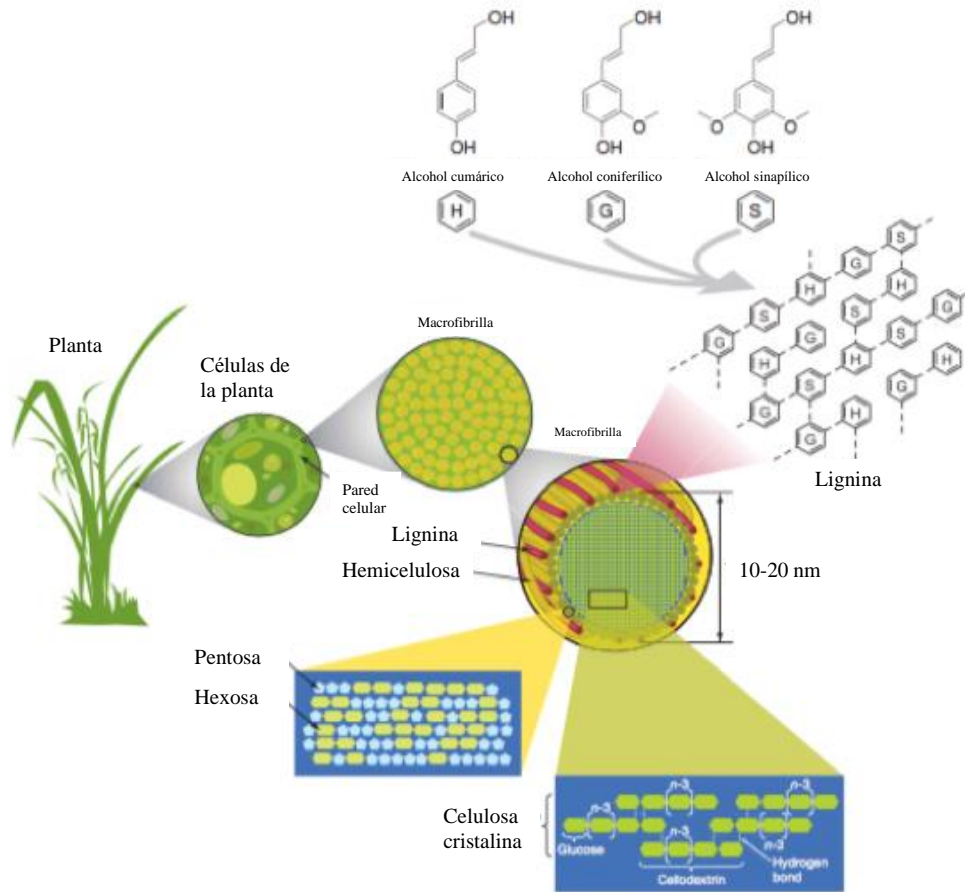
La biomasa lignocelulósica es obtenida por el proceso fotosintético de las plantas y es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía (Cuervo y col, 2009). La composición y porcentajes de los polímeros dependen de la especie de la planta, la edad y la etapa de crecimiento (Payán, 2011). Este tipo de material no pueden ser degradado por la mayoría de los microorganismos presentes en los ecosistemas.

Por lo tanto, es importante contar con un pretratamiento fisicoquímico o enzimático capaz de hacer más accesibles los polímeros presentes en la biomasa para el aprovechamiento microbiano. Por otro lado, los principales constituyentes de las frutas y vegetales son el almidón (utilizado como reserva energética) y los que componen sus paredes celulares, constituidas por pectina, celulosa, hemicelulosa y lignina. Debido a su origen renovable, a la biodegradabilidad de sus derivados y sus posibilidades de reciclaje son una fuente idónea de materiales poliméricos de interés industrial.

Debido a la escasez y pérdida de fuentes de recursos no renovables como los combustibles fósiles y a la creciente demanda de nuevas fuentes energéticas, se está a la búsqueda, desarrollo y perfeccionamiento de procedimientos que permitan la transformación de la energía almacenada en los residuos lignocelulósicos, un recurso prácticamente inagotable. Esto constituye el punto de partida para la obtención de productos útiles al hombre. Su uso agregaría valor a aquellos residuos

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

derivados de la explotación de los cultivos agrícolas y de los recursos forestales, que tradicionalmente no han sido utilizados adecuadamente para el beneficio de la humanidad (García, 2006).



**Figura 2.2.** Representación estructural de la biomasa lignocelulósica con hemicelulosa, celulosa y lignina (Rubin, 2008).

La lignocelulosa es un biopolímero complejo, compuesto de diversos carbohidratos como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, entre otros. Su conformación se basa principalmente en hebras de celulosa, sostenidas sobre una matriz de hemicelulosa y lignina (Figura 2.2). La celulosa es un polímero de *D*-glucosa unida por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 que forman cadenas largas lineales (microfibrillas) unidas entre sí, por puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares. La celulosa, forma una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y zonas amorfas que pueden ser degradadas fisicoquímica y enzimáticamente (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

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*-metilglucurónico, *D*-galacturónico y *D*-glucurónico, en el que los carbohidratos se unen por enlaces  $\beta$ -1,4 (Pérez y col., 2002). La lignina, 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 que es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro y col., 2005).

Las pectinas, son una familia de polisacáridos complejos que contienen enlaces 1, 4 de ácido  $\alpha$ -*D*-galactosilurónico (GalpA) presentes en las paredes primarias de los vegetales. Determinan la porosidad de las paredes y controlan el grado de disponibilidad de sustrato, regulan el balance iónico y el pH. El principal producto de su degradación es el ácido galacturónico (Ridley y col., 2001). Dentro de las principales fuentes de biomasa lignocelulósica podemos mencionar a los cultivos o residuos obtenidos del maíz, el trigo, el arroz y la caña de azúcar. Sin embargo, los residuos de comida surgen como una alternativa de biomasa ya que no compiten con los cultivos para alimentación humana.

### **2.1.2. Fracción orgánica de los RSU para la producción de etanol**

La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos o residuos de alimentos está constituida por desechos orgánicos que se pueden obtener a partir de diferentes fuentes como son las plantas procesadoras de alimentos, cocinas domésticas y comerciales, cafeterías y restaurantes. La FAO (2012) estima que alrededor de 1 300 millones de toneladas al año de alimentos, como verduras, frutas, carne, pan y lácteos se pierden durante el proceso de producción y venta del producto. Se espera un aumento en los próximos 25 años debido al crecimiento económico y demográfico.

En la Tabla 2.1 se puede observar un resumen de la caracterización de diferentes compuestos de los desechos de alimentos, lo cuales, se originaron a partir de residuos de cocina en la Universidad de Kumamoto, Japón (Tang y col., 2008), desechos de cocina residencial (Wang y col., 2008), desechos de residencias y cocinas industriales, los cuales incluían pasta, pizza, galletas, hongos, lechuga iceberg, café, ensalada, frijoles frescos y secos, pan, arroz, trigo, papas, tomates, zanahorias, berenjenas, y las cáscaras y partes de frutas y verduras (Uncu y col., 2011). La Tabla 2.1 incluye desechos de alimentos de la Universidad de Tecnología Química, Beijing (He y col.,

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2012), residuos de alimentos que consistieron en un 50 % de alimentos crudos (46.8 % de verduras, 32 % de carne picada) y un 15.6 % de alimentos cocinados (4.2 % de carne, 0.9 % de pescado, 2.1 % de legumbres, 3.7 % de papas, 1.9 % de arroz y 2.8 % de otros), 14.5 % de frutas, 9.7 % de ensaladas, 8 % de pan y 2.2 % de postres (peso en base húmeda) de la Universidad de Patras, Grecia (Vavouraki y col 2014), y residuos de alimentos de la Universidad Myongji, Korea (Zhang y col., 2012b). Se puede observar que la humedad de los residuos se encuentra entre 61.3 y 82.8 %. Los azúcares totales, almidón y celulosa son los principales productos de hidrólisis y se obtuvieron en diferentes porcentajes 35.5-69.0 %, 24.0-46.1 % y 1.6-16.9 %, respectivamente.

**Tabla 2.1.** Composición de mezcla de desechos de alimentos (modificado de Uçkun Kiran y col., 2014).

Humedad	Sólidos totales*	Sólidos volátiles**	Azúcares totales*	Almidón*	Celulosa*	Lípidos*	Proteínas*	Cenizas*	Referencias
80.3	19.7	95.4	59.8	NR	1.6	15.7	21.8	1.9	Tang y col., 2008
82.8	17.2	89.1	62.7	46.1	2.3	18.1	15.6	NR	Wang y col., 2008
61.3	38.7	NR	69.0	NR	NR	6.4	4.4	1.2	Uncu y col., 2011
81.7	18.3	87.5	35.5	NR	NR	24.1	14.4	NR	He y col., 2012
81.5	18.5	94.1	55.0	24.0	16.9	14.0	16.9	5.9	Vavouraki y col., 2014
81.9	14.3	98.2	48.3	42.3	NR	NR	17.8	NR	Zhang y col., 2012b

\*% peso total (% PT) con base del peso seco.

\*\*% sólidos volátiles (% SV) con base en los sólidos totales.

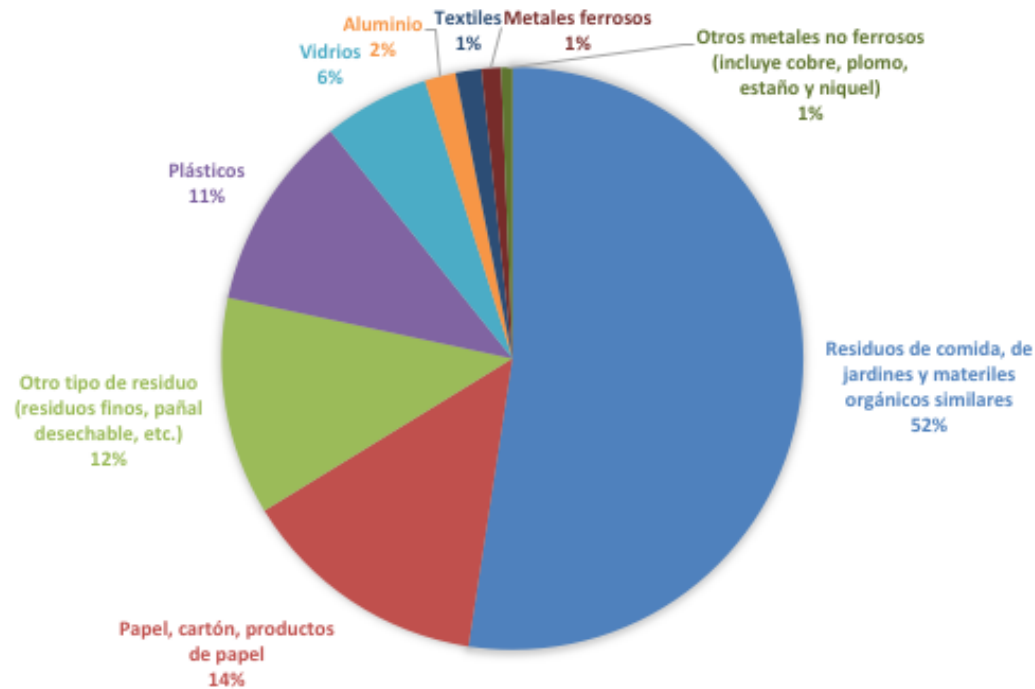
NR: No reportado.

En México se generan más de 53 millones de toneladas de RSU al año, de las cuales, se calcula que el 52 % corresponde a la fracción orgánica. La CDMX es la entidad federativa con mayor población después del Estado de México y genera una gran cantidad de residuos sólidos. En el 2017, se generaron 12 998 toneladas por día de RSU, donde el 41 % fue generado en las Alcaldías de Iztapalapa (2 245 Ton/día), Gustavo A. Madero (1 735 Ton/día) y Cuauhtémoc (1 316 Ton/día). Se observó un aumento en la generación de RSU per cápita, por ejemplo, en el 2011 se generaban 0.30 kg/día hab hasta alcanzar una generación entre 0.85-2.42 kg/día hab en el 2015 (SEDEMA, 2015).

Esta variación en la generación de residuos per cápita depende del desarrollo tecnológico, industrial y económico, densidad poblacional, hábitos de consumo, nivel de ingreso, conciencia ambiental, etc. En la Figura 2.3, se presenta la composición de los RSU por tipo de residuo, donde

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

se obtienen como principales desechos los residuos de comida, jardinería y orgánicos-similares. En el 2012, se habrían generado 22 070 toneladas diarias en todo el país. Otro residuo que puede ser aprovechado, por ser un material derivado de la celulosa, es el papel y sus productos, ya que representan alrededor de un 14 % de los RSU.



**Figura 2.3.** Composición de los RSU por tipo de residuo (SEDESOL, 2012).

La Central de Abastos más grande de Latinoamérica está ubicada en la Alcaldía de Iztapalapa, Ciudad de México. Genera más de 1 291 toneladas de residuos sólidos municipales por día, donde el 70 % (905 toneladas) son residuos de frutas y verduras, que ya no se comercializan. Estos productos pueden utilizarse para varios fines: producción de etanol (Ballesteros y col., 2010), composteo (Martínez-Valdez, y col., 2015), alimentación animal (Salemdeeb y col., 2017) y otros (Uçkun Kiran y col., 2014). La utilización de estos residuos para la producción de etanol permitiría una producción de hasta 281 m<sup>3</sup> de etanol al día, que puede ser utilizado como aditivo para biocarburantes.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

Algunas de las ventajas de utilizar este tipo de residuos son:

- Se generan directamente en la Central de Abastos, reduciendo los costos de transporte de residuos.
- Son ricos en carbohidratos fácilmente metabolizables con muy bajo contenido de lignocelulosa, lo que facilita el tratamiento previo a la fermentación alcohólica, aumentando el rendimiento y reduciendo los costos de producción de etanol.
- El uso de estos residuos orgánicos frescos reduce las variaciones en la producción de etanol causadas por la heterogeneidad de los residuos y de la contaminación microbiana.

El vertido convencional en rellenos sanitarios y tiraderos a cielo abierto es un método común en todo el mundo para la eliminación de los RSU. Actualmente, los métodos de tratamiento como el compostaje y la digestión anaerobia se han utilizado para tratar algunos de estos residuos y producir composta para el mejoramiento de suelos y biogás usado como energía, pero los desequilibrios en la oferta, la sobreproducción de residuos y la demanda de productos reciclados han dificultado la aplicación más amplia de estas alternativas (Tang y col., 2008).

### **2.2. Pretratamiento de la FORSU**

Los métodos de pretratamiento se refieren a la solubilización y separación de uno o más componentes de la biomasa (Tabla 2.2). Los principales objetivos de un eficiente proceso de pretratamiento son los siguientes (Demirbas, 2005):

- Formación de carbohidratos directa o posteriormente a la hidrólisis.
- Evitar la pérdida y/o degradación de los carbohidratos liberados.
- Limitar la formación de inhibidores.
- Reducir la demanda energética.
- Minimizar los costos.

Antes del proceso de fermentación, la FORSU pasa por un proceso de esterilización térmica estándar (121 °C – 15 min) para mejorar el rendimiento y control del proceso, pero se sacrifica el consumo de energía y agua, haciendo menos rentable el proceso.



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

**Tabla 2.2.** Resumen de los diversos procesos utilizados para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica (Kumar y col., 2009).

Procesos de pretratamiento	Ventajas	Limitaciones y desventajas
Trituración mecánica	Reduce la cristalinidad de la celulosa.	El consumo de energía, generalmente mayor que la energía de biomasa inherente.
Explosión a vapor	Causa degradación de la hemicelulosa y transformación de la lignina; es rentable.	Dstrucción de una parte de la fracción de xilano; perturbación incompleta de la matriz lignina-carbohidrato; generación de compuestos inhibidores de microorganismos.
Explosión de fibras con solución de amoníaco (AFEX)	Aumenta el área de superficie accesible, elimina un porcentaje de lignina y hemicelulosa; no produce inhibidores.	No es eficiente para biomasa con alto contenido de lignina.
Explosión con CO <sub>2</sub>	Aumenta el área de superficie accesible; es rentable; no causa la formación de inhibidores.	No modifica la lignina ni la hemicelulosa.
Ozonólisis	Reduce el contenido de lignina; no produce residuos tóxicos.	Se requiere una gran cantidad de ozono; costoso.
Hidrólisis ácida	Hidroliza la hemicelulosa en xilosa y otros azúcares; altera la estructura de la lignina.	Alto costo; corrosión del equipo; formación de sustancias tóxicas.
Hidrólisis alcalina	Elimina la hemicelulosa y la lignina; aumenta la superficie accesible.	Largos tiempos de residencia requeridos; se forman sales irre recuperables e incorporadas a la biomasa.
Organosolvente	Hidroliza la lignina y la hemicelulosa.	Los solventes necesitan ser drenados del reactor, evaporados, condensados y reciclados; alto costo.
Pirolisis	Produce productos líquidos y gaseosos.	Alta temperatura; proceso de producción de cenizas.
Campo eléctrico pulsado	Condiciones ambientales; perturba las células vegetales; equipo sencillo.	Necesita más investigación.
Biológico	Degrada la lignina y la hemicelulosa; baja requerimientos energéticos.	La tasa de hidrólisis es muy baja.

Altas temperaturas en el proceso de esterilización degradan parcialmente los carbohidratos y los nutrientes útiles para la fermentación. Además, los sustratos frescos y húmedos podrían hacer el proceso más eficiente comparado con los sustratos que se rehidratan para su uso (Kim y col.,

2005). Por lo tanto, la utilización de un sustrato sin un tratamiento de secado es lo adecuado si la contaminación microbiana es manejable.

Los principales pretratamientos utilizados en la degradación de la biomasa lignocelulósica son: los físicos (mecánico-térmico), químicos (térmico-ácido sulfúrico) y biológicos (enzimas). En la Tabla 2.2, se resumen diversos procesos de pretratamientos que han sido reportados para hidrolizar la biomasa lignocelulósica. Existen dos procesos considerados rentables, la explosión a vapor y la explosión con CO<sub>2</sub> (Kumar y col., 2009).

Sin embargo, estos pretratamientos tienen como desventaja: la generación de inhibidores microbianos que podrían afectar el proceso de fermentación, la biomasa solo queda más accesible para el ataque enzimático (disminución de partícula) y no se hidrolizan las estructuras más externas, es decir, lignina y hemicelulosa (Tabla 2.2).

Los tratamientos con ácidos y con bases son procesos de hidrólisis más eficientes; sin embargo, generan compuestos tóxicos, difíciles de separar, y aumentan la fuerza iónica al neutralizar el pH. Por otro lado, el proceso biológico ampliamente reportado es la hidrólisis enzimática, que tiene como ventaja que degradan la hemicelulosa y la lignina con un bajo requerimiento energético, pero se necesitan largos tiempos de reacción obteniéndose tasas de hidrólisis muy bajas.

### **2.2.1. Pretratamiento mecánico**

El pretratamiento mecánico tiene como objetivo reducir el tamaño de partícula de las materias primas. En esta etapa, se desea obtener partículas más pequeñas debido al aumento de la superficie de contacto u homogenización de su forma, tamaño y número. Con este método se aumenta la reactividad de los sólidos, permite la separación de los componentes no deseados y reduce el volumen del sustrato sólido haciéndolo más fácil de manejar (Mc Cabe y col., 2001). Estos autores plantean que los principales métodos para la disminución de tamaño son: compresión, impacto, cizalla y corte.

El método de compresión se utiliza principalmente para la reducción de sustratos sólidos duros y se obtiene poca cantidad de partículas finas. Con el método de impacto se obtienen partículas gruesas, medianas y finas. Con la cizalla, se obtienen partículas finas a partir de

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

materiales blandos y no abrasivos. Por último, con el método de corte, se obtienen partículas de tamaño definido, forma definida y con baja cantidad de partículas finas.

Para hacer más digerible la FORSU es necesario realizar un pretratamiento mecánico o una disminución de tamaño de partícula, para mejorar la homogeneización y la asimilación del sustrato. La accesibilidad de los microorganismos al sustrato sólido y la hidrólisis de los biopolímeros estructurales se consideran un paso limitante en el proceso de producción de etanol. Los microorganismos en general solo pueden utilizar la materia orgánica en forma soluble. Sin embargo, si se utiliza en CMS el sustrato no se solubiliza por lo que un pretratamiento mecánico facilita el contacto de los microorganismos con la fracción asimilable del sustrato.

Con el pretratamiento mecánico se obtiene la ruptura de la pared celular y de las largas cadenas de hemicelulosa y celulosa, en cadenas más cortas lo que permite mejorar la solubilidad del sustrato, la velocidad asimilación y el rendimiento del proceso.

La FORSU es un sustrato que contiene grandes cantidades de fibras, por lo que un pretratamiento mecánico es necesario para aumentar la uniformidad y la superficie específica, buscando mejorar la eficiencia (Lou y col., 2009).

Liu y col. (2013a) analizaron el efecto del tamaño de partícula de un residuo de rastrojo de maíz en la hidrólisis por explosión a vapor. La biomasa se ajustó a los siguientes tamaños de partícula 2.5, 2.0, 1.5, 1.0 y 0.5 cm, buscando obtener los mejores resultados en el pretratamiento térmico y la hidrólisis enzimática. Se observó una recuperación de azúcar del 99.6 % de glucano y 67.0 % de xilano, con un tamaño de partícula de 1.0 y 1.5 cm. Con los resultados obtenidos observaron que con el uso de partículas grandes (2.5 cm) en el pretratamiento con explosión a vapor e hidrólisis enzimática de los residuos de maíz, se mejoró la liberación de carbohidratos fermentables.

Por otro lado, Molaverdi y col. (2013) utilizaron sorgo dulce (sin pretratamiento) para la producción de etanol, por ser un cultivo energético con gran potencial para la producción de biocombustibles. Estos autores investigaron el efecto de las variables: temperatura (28, 32 y 36 °C), humedad (65, 75, 80 y 85 %), concentración inicial de biomasa fúngica (0.001, 1 y 5 g/L) y tamaño de partícula (malla <80, 20-80 y >20) en el rendimiento de producción de etanol.

Encontraron que el rendimiento máximo (0.48 g/g) fue alcanzado a una temperatura de 32 °C, 80 % de humedad y un tamaño de partícula entre 0.178 mm y 0.853 mm (malla No. 20-80) con

una concentración de biomasa fúngica de 5 g/L. Por lo que, el tamaño de partícula dependerá del sustrato a utilizar y el pretratamiento empleado.

### 2.2.2. Pretratamiento térmico

La esterilización es una operación esencial para los procesos de fermentación industrial ya que comúnmente se requiere mantener un cultivo puro para obtener productos de alta calidad (Deindoerfer, 1957). La esterilización es definida como la completa eliminación o destrucción de toda forma de vida microbiana por procesos químicos o físicos (Liu y col., 2013b). Esta operación unitaria es propuesta como una alternativa para los procesos que implican CMS.

Por otro lado, se ha reportado el uso del factor de severidad (FS) como una función que relaciona la temperatura y tiempo de residencia en los pretratamientos térmicos. Este factor se ha utilizado específicamente en el pretratamiento térmico denominado explosión a vapor. Sin embargo, no es aplicable cuando el pretratamiento se lleva a cabo en presencia de un catalizador ácido; por lo que, Chum y col. (1990) adaptaron la ecuación empírica de FS para combinar la influencia de la actividad de los iones de hidrógeno denominado factor de severidad combinado (FSC). El método más común utilizado en la industria de la fermentación es calentar el sustrato sólido (por ejemplo, FORSU) a 121 °C durante 20 min (FS=1.92) en una autoclave inyectando vapor y dejando enfriar de forma natural. Este método es considerado como lo más confiable y fácil de manipular a gran escala. En algunas ocasiones a nivel industrial se utilizan digestores esféricos que van girando para acelerar la transferencia de calor durante todo el proceso, utilizando calor húmedo. Sin embargo, la desventaja de este proceso es que la técnica involucra procesos muy largos, la descarga incompleta del material y el desperdicio de energía, lo que resulta en un alto costo y baja eficiencia en el proceso (Zhang y col., 2007).

El pretratamiento térmico de la materia prima se lleva a cabo en un intervalo de temperatura entre 150 a 180 °C, donde la hemicelulosa y la lignina se solubilizan (Bobleter, 1994).

Lund (1988) señaló que el tratamiento térmico, especialmente durante mucho tiempo, tiene un efecto adverso en los nutrientes provocando su degradación. Por lo tanto, el largo tiempo, los nutrientes degradados y un alto costo energético son los principales problemas de la esterilización térmica tradicional de los sustratos sólidos. De acuerdo con la ecuación de Arrhenius, la constante de velocidad de degradación de un producto químico es menos influenciada por la temperatura que la esterilización microbiana, debido a que la energía de activación de la degradación química es

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

menor a la de la inactivación microbiana (Mann y col., 2001). Por lo que, un proceso de corto tiempo a alta temperatura, podría minimizar la descomposición de nutrientes y matar a los microorganismos.

La explosión a vapor surge como uno de los pretratamientos más eficientes para la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica. En el reactor donde se lleva a cabo la explosión a vapor, los sustratos sólidos se calientan (160 – 260 °C) a alta presión de vapor saturado durante un tiempo relativamente corto (1-10 min) ( $FS=1.77 - 5.71$ ) hasta alcanzar el tiempo de residencia deseado y se despresuriza instantáneamente. El efecto del pretratamiento sobre la biomasa es una combinación de alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras) y químicas (despolimerización y rotura de enlaces). Algunas variables a considerar en este proceso son la temperatura, tiempo de residencia, tamaño de partícula y la humedad (Alvira y col., 2016).

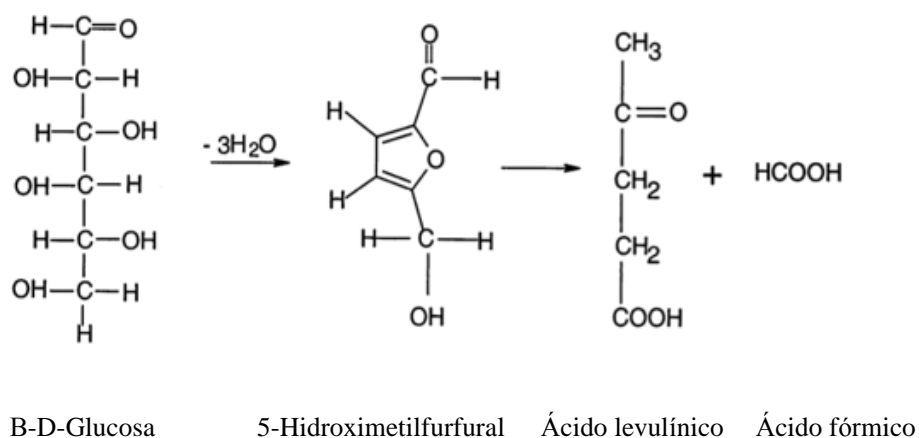
El efecto mecánico es causado por la rápida despresurización que provoca una evaporación del agua interna, creando fuerzas de cizalla que producen la separación de las fibras, principalmente de las regiones más débiles (celulosa amorfa). El efecto químico se debe a la hidrólisis de los residuos acetilados de la hemicelulosa produciendo ácido acético, que con la temperatura del proceso cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa (autohidrólisis). Durante el tratamiento se destruyen parcialmente los enlaces lignina-carbohidrato. Como resultado, se obtiene un producto fibroso cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis enzimática (Kumar y col., 2009).

La hemicelulosa se despolimeriza en mayor o menor medida dependiendo de las condiciones del tratamiento, siendo fácilmente recuperada por lavado. La lignina, prácticamente sin alterar, puede ser extraída y utilizada con diferentes fines. Li y col. (2007) demuestran que la hidrólisis con ácido diluido (1 %) combinado con un tratamiento térmico (121 °C) y una hidrólisis enzimática (60 FPU/g sustrato) es el método más eficiente de hidrólisis para la obtención de glucosa a partir de residuos sólidos urbanos. Sin embargo, la presencia de inhibidores como ácido acético y furanos generados durante el pretratamiento son un obstáculo para la obtención de etanol por fermentación (Palmqvist y col., 1999; Taherzadeh y col., 2000; Negro y col., 2014).

Al utilizar el método de hidrólisis ácida, la concentración de carbohidratos liberados y de productos inhibitorios dependerá de las condiciones de hidrólisis (Clausen y Gaddy, 1988). A condiciones agresivas de hidrólisis, los carbohidratos pueden degradarse a furfural, que se obtiene a partir de pentosas o del 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) obtenido a partir de las hexosas. Se

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

sugiere que algunos efectos que tienen los furanos sobre los microorganismos son: reducción de la tasa específica de crecimiento, disminución de la productividad volumétrica y específica de etanol, disminución de la producción de biomasa, producen daños en la membrana plasmática celular e inhiben la acción enzimática (Ulbricht y col., 1984).



**Figura 2.4.** Esquema de hidrólisis de la glucosa a inhibidores (Ulbricht y col., 1984).

Pero con una exposición a altas condiciones de temperatura y presión, el furfural y el 5-HMF pueden degradarse a ácido levulínico y ácido fórmico, como se muestra en la Figura 2.4. Otro inhibidor es el acetato que se obtiene a partir de la hidrólisis de la hemicelulosa (Fan y col., 1982); dentro de sus efectos se pueden mencionar: descenso del rendimiento a etanol, disminución en la producción de biomasa, reducción de la tasa específica de crecimiento y muerte celular.

Durante la hidrólisis una parte de la lignina es degradada a compuestos aromáticos, lo que resulta relevante, ya que se ha sugerido que son fenoles de bajo peso molecular considerados como potentes inhibidores (Clark y Mackie, 1984). Los fenoles de bajo peso molecular llegan a dañar la membrana plasmática celular, se obtienen menores rendimientos de etanol, disminución en la producción de biomasa y tasa específica de crecimiento y, por último, muerte celular.

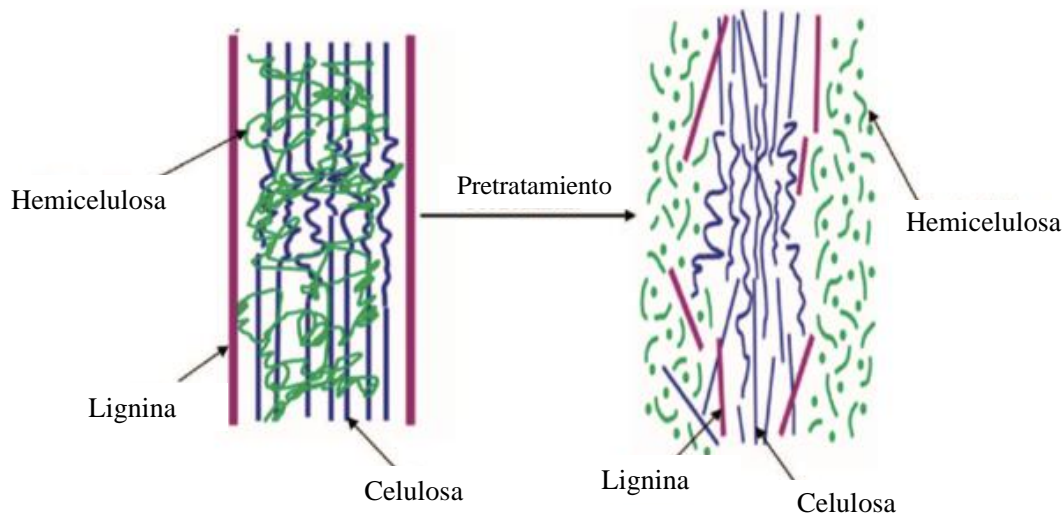
Algunos autores (Ballesteros y col., 2010; Zhi-Min y col., 2015) proponen un pretratamiento térmico con bajo tiempo de residencia y una posterior liberación de vapor para romper las fibras estructurales de los residuos y aumentar la liberación de carbohidratos para una posterior fermentación (Figura 2.5); disminuir la carga microbiana y mejorar los rendimientos de fermentación, como una estrategia amigable con el medio ambiente.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Zhi-Min y col. (2015) presentan una nueva estrategia de esterilización por explosión a vapor a alta temperatura (124 – 172 °C) y de corta duración (2 – 8 min) de un medio sólido compuesto por harinas de trigo y soya. Los contenidos de glucosa y xilosa en el medio después de la esterilización por explosión a vapor aumentaron en un 157 % y un 93 %, respectivamente, en comparación con los contenidos después de la esterilización convencional (121 °C, 20 min), mientras que no se detectaron inhibidores de la fermentación. También observaron que la productividad de una cepa de *Bacillus subtilis* fue 3.83 veces mayor después de una explosión a vapor que después de una esterilización convencional.

Por otra parte, Ballesteros y col. (2010) reportaron el uso de la FORSU con un contenido de carbohidratos entre el 47-49 %, como sustrato para la para la producción de etanol. La FORSU fue sometida a un pretratamiento térmico a 160 °C durante 5 a 50 min, lo que representa un intervalo de FS entre 2.47-3.47. Determinaron que a un FS de 3.24 obtienen el mayor contenido de glucosa (41.9 %) y xilosa (5.2 %) y ahorran energía durante la etapa de pretratamiento.

Li y col. (2007) presentan más de 15 tratamientos para el pretratamiento de la fracción biodegradable de los residuos sólidos municipales. La más alta concentración de glucosa (73 %) se obtuvo a partir de la transformación de la celulosa después de tres etapas de pretratamiento compuesto por una hidrólisis ácida diluida (1 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), seguido por un tratamiento con vapor (121 °C por 15 min; FS=1.79) y una hidrólisis enzimática (*Trichoderma viride* 60 FPU/g) de residuos sólidos de zanahoria y papa, adicionados con residuos de pasto y periódico.



**Figura 2.5.** Esquema del papel del pretratamiento en la conversión de biomasa en biocombustible (Kumar y col., 2009).

El FSC se ha utilizado en el pretratamiento térmico de bagazo de caña en presencia de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) diluido como catalizador de la hidrólisis. Se realizaron tres experimentos 170 °C, 7.5 min (FS=2.94) y 9.5 mg/g $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 180 °C, 4 min (FS=2.96) y 9.5 mg/g  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 195 °C, 7.5 min (FS=3.67) y 4 mg/g  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; con la finalidad de tener un FSC de 0.74. Estos tratamientos de bajo FSC dieron como resultado una reología adecuada del sustrato para la hidrólisis enzimática, redujo los costos de neutralización y el mantenimiento de los reactores debido a la corrosión de sus componentes (Fockink y col., 2018).

### 2.3. Proceso de fermentación de la FORSU

La fermentación alcohólica es una bioreacción que permite degradar carbohidratos a etanol y  $\text{CO}_2$ . La vía Embden-Meyerhof-Parnas, es la ruta metabólica principal donde se lleva a cabo el catabolismo de las hexosas hasta etanol (comúnmente conocida como glicólisis). La fermentación se representa mediante la siguiente ecuación:



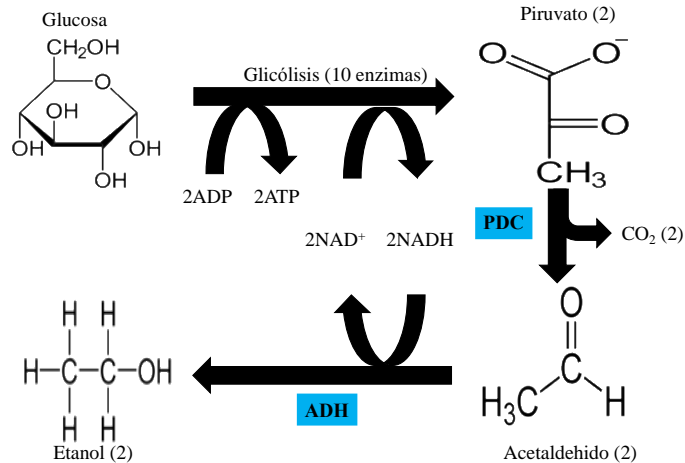
Debido a que la glucosa tiene un peso molecular de 180 g por mol y de cada molécula de glucosa se obtienen dos moléculas de etanol (peso molecular 46 g por mol) y de  $\text{CO}_2$  (peso molecular 44 g pr mol), se obtiene un rendimiento teórico estequiométrico de producción de etanol de 0.5111 g/g y de  $\text{CO}_2$  de 0.489 g/g.

En la realidad es difícil lograr estos rendimientos debido a que la levadura utiliza la glucosa para el crecimiento celular, mantenimiento y producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 80 – 95 % del rendimiento de producción de etanol y entre un 25 y 30 % del rendimiento teórico de producción de  $\text{CO}_2$  (biomasa celular) (Lavarack, 2003; Peña y Arango, 2009). En la glucólisis (Figura 2.6) una molécula de glucosa se oxida para producir dos de piruvato.

También, se sintetizan dos moléculas de Adenosin Trifosfato (ATP) a partir de Adenosin Difosfato (ADP). El ATP es una molécula de alta energía que utilizan las células microbianas para transportar la energía de la glucosa. Por otro lado, se obtienen dos moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) se obtienen a partir de  $\text{NAD}^+$  oxidado.



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



**Figura 2.6.** Ruta metabólica para la obtención de etanol (modificado de Zamora-Hernández y col., 2014).

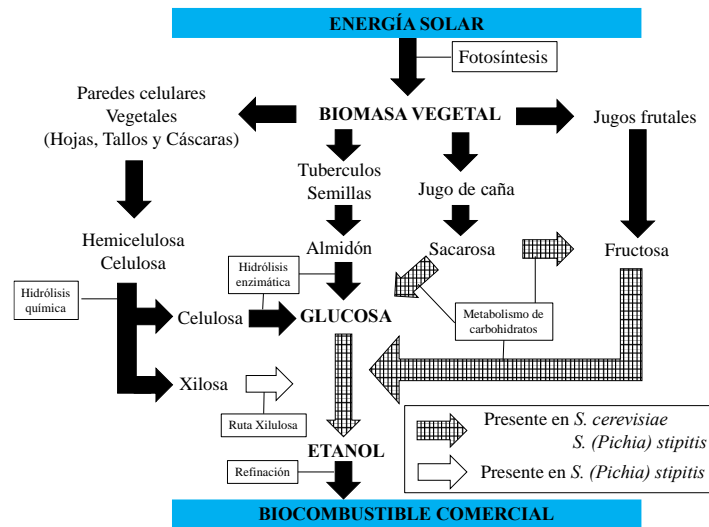
Para que la glicólisis continúe funcionando, el  $\text{NAD}^+$  necesita ser regenerado a partir de  $\text{NADH}$ ; esto se alcanza a través de la fermentación. La conversión de piruvato a etanol se da gracias a la catálisis de las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH). Así, se puede considerar que el etanol es el residuo metabólico de la extracción de energía de la glucosa (Zamora-Hernández y col., 2014).

Entre las materias primas ricas en carbohidratos (azúcar, almidón, celulosa, etc.), se encuentran las frutas y vegetales como la caña de azúcar y la remolacha, los cereales (trigo, maíz y sorgo), los tubérculos (papas y yuca) y en general, materias provenientes de residuos lignocelulósicos o de residuos orgánicos (Uçkun Kiran y col., 2014; Gupta y Verma, 2015).

La biomasa lignocelulósica utiliza la energía solar capturada durante la fotosíntesis para producir moléculas de carbono que son utilizados para la formación de hemicelulosa, celulosa, y almidón como reserva energética y nutriente (monómeros). Una gran cantidad de microorganismos son utilizados para la producción de etanol a escala laboratorio y muy pocos tienen aplicación a nivel industrial. Los microorganismos más utilizados son las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*.

Sin embargo, durante el proceso de fermentación la cepa puede sufrir estrés debido a diferentes factores ambientales, como pueden ser el aumento de la temperatura, una alta concentración de azúcar, hiperosmolaridad, oxidación y por el incremento de concentración de etanol en el medio.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



**Figura 2.7.** Materias primas, rutas metabólicas y procesos de producción de etanol (modificado de Zamora-Hernández y col., 2014).

Estos factores pueden afectar la viabilidad de la célula y la producción de etanol, dando como resultado la muerte celular (Stanley y col., 2010).

Por lo tanto, es importante conocer las diferentes capacidades fermentativas de algunos microorganismos de interés, e identificar qué tipos de carbohidratos fermentan para poderlos utilizar a los diferentes microorganismos con hidrolizados lignocelulósicos (Figura 2.7).

Conocer las condiciones de fermentación de cada microorganismo es importante para obtener los resultados óptimos de fermentación y lograr un aprovechamiento eficiente de los carbohidratos presentes en los hidrolizados.

La conversión biológica de las diferentes materias primas lignocelulósicas, como son los residuos de bosques, los residuos agrícolas o los cultivos lignocelulósicos dedicados a la obtención de etanol (maíz o caña de azúcar) ofrece numerosos beneficios, pero su desarrollo se ve obstaculizado por factores económicos y técnicos.

En este sentido, los factores más importantes para reducir el costo de la producción de etanol son los siguientes: la selección de la cepa, utilización eficiente de la materia prima para obtener altos rendimientos, alta concentración, alta productividad, valorizar todos los co-productos e integrar los procesos con el fin de reducir la demanda energética.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

**Tabla 2.3.** Microorganismos usados en la fermentación de residuos lignocelulósicos.

Microorganismos	Condiciones	Sustrato	Referencia
<i>Levadura de panadería</i>	Sin pretratamiento	Jugo de agave	López-Álvarez y col., 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ITD00196)	Sin pretratamiento	Jugo Remolacha roja	Jiménez-Islas y col., 2014
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2-4 %) 121 °C y 30-60 min	Bagazo de trigo y arroz	Narra y col., 2015
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Secado	Grano de sorgo	Horn y col., 1992
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Tratamiento alcalino	Cascara de arroz	Singh y col., 2014
<i>Zymomonas mobilis</i>	NaCl y HCl pretratamiento por microondas	Bagazo de sorgo dulce	Ndaba y col., 2014

## 2.3.1. Microorganismos utilizados en el proceso de fermentación

Los microorganismos son los elementos claves en las tecnologías usadas en los diferentes procesos de fermentación, incluyendo la producción de etanol. Los microorganismos para ser considerados industrialmente para la producción de etanol deben cumplir ciertas características:

- Tener la capacidad de fermentar un diverso rango de carbohidratos y una producción única de etanol y CO<sub>2</sub> bajo condiciones anaerobias.
- Tener una buena floculación para que el lavado de los reactores sea adecuado, además que no generen compuestos aromáticos para que el destilado no tenga un olor desagradable.
- Para evitar problemas de contaminación, el microorganismo debe fermentar a pH bajo y a una alta concentración de carbohidratos.
- Deberán ser genéticamente estables y presentar buenas tasas de fermentación y producción de etanol.

A pesar de que las levaduras son más lentas en el proceso de fermentación (comparado con las bacterias), son los microorganismos más utilizados en la producción de etanol. Las levaduras se seleccionan considerando su tasa crecimiento, rendimiento de etanol, tolerancia al etanol y a la

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

glucosa, osmotolerancia; así como por un tener la capacidad de fermentar a pH bajo, termotolerancia y resistencia al estrés por altas concentraciones de sustrato y producto.

La tolerancia a etanol y glucosa permiten la conversión de sustratos concentrados en productos concentrados, lo que reduce los costos energéticos en la etapa de destilación. La osmotolerancia permite utilizar melazas con una alta concentración de carbohidratos, sin la disminución de la tasa de crecimiento o de producción de etanol por la pérdida de viabilidad celular. La fermentación a pH bajo evita la contaminación por la competencia de otros microorganismos. La termotolerancia evita el uso de chaquetas para disminuir la temperatura del biorreactor y facilita la evaporación del etanol. La resistencia al estrés permitirá a la levadura que sobreviva al manejo ordinario y a las tensiones generadas por la manipulación de variables en el proceso de fermentación.

Se menciona el uso de diferentes levaduras del género *Candida sp.*, *Saccharomyces sp.*, y *Kluyveromyces sp.*, que además de las altas eficiencias reportadas, son capaces de trabajar a temperaturas aproximadas a los 40 °C (Krishna y col., 2001). Diversos microorganismos se han utilizado para la fermentación de residuos lignocelulósicos (Tabla 2.3). Cada uno de ellos representó una ventaja en los bioprocesos que se reportaron. Al utilizar diferentes tipos de bagazos, cáscaras o desechos es necesario utilizar un pretratamiento para volver disponibles los carbohidratos presentes en los residuos y poder fermentarlos. Los microorganismos que se plantean podrían emplearse ya sea en cultivos axénicos o mixtos para aumentar el rendimiento en la producción de etanol.

Como se ha reportado, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es incapaz de asimilar las pentosas (Tang y col., 2008), mientras que la levadura *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* se ha utilizado en la conversión de xilosa (Negro y col, 2014), pero con bajas productividades. Una posibilidad para evitar este problema es el uso de co-cultivos o cultivos mixtos, donde tanto las hexosas como las pentosas se utilicen como fuente de carbono.

Las fermentaciones con co-cultivos o cultivos mixtos pueden resultar en un mayor rendimiento, un mejor control del proceso, la posibilidad de utilizar sustratos más baratos y el potencial de mejorar los procesos existentes (Bader y col., 2010).

Así mismo, se han empleado levaduras del género *Schwanniomyces sp.* debido a su capacidad para producir amilasas, en particular pululanases (desramificante), enzimas capaces de

hidrolizar los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1-6 del pululano (estructura de la hidrólisis del almidón), y posteriormente, producir etanol (Saucedo-Castañeda y col., 1992).

En el proceso de fermentación de la FORSU a etanol sería viable solo si las hexosas y las pentosas presentes en los hidrolizados se aprovecharan (Kuhad y col., 2011). Durante el desarrollo de un proceso de fermentación diferentes factores deben ser considerados, ya que pueden dañar el crecimiento celular o la obtención del metabolito de interés si no son controlados.

Otro punto a considerar en el aprovechamiento de la FORSU, es que al momento de fermentar los diferentes residuos por CMS es muy importante contar con una suspensión con alta concentración de células viables para evitar el desarrollo de contaminantes o de compuestos no deseados. Los matraces Erlenmeyer son los biorreactores más ampliamente utilizados para la propagación de microorganismos y la producción de inóculos a nivel laboratorio debido a su flexibilidad, bajo costo y fácil operación (Büchs, 2001).

Sin embargo, es muy importante resaltar que para tener un buen crecimiento microbiano es importante que la oxigenación del cultivo dentro del matraz sea la adecuada. Por lo tanto, factores como el diseño del matraz de agitación (Marín-Palacio y col., 2014) y el volumen de llenado (Reynoso-Cereceda y col., 2016) podrían jugar un papel importante en las tasas de crecimiento microbiano.

### **2.3.2. Efecto de la concentración de carbohidratos**

Los principales carbohidratos utilizados en el metabolismo de producción de etanol son las hexosas (principalmente, glucosa y fructosa). La tasa de producción de etanol está relacionada con la concentración inicial del carbohidrato.

Sin embargo, a concentraciones más altas (120 – 150 g/L) se alcanza un límite de saturación celular de modo que se obtienen buenas tasas de producción de etanol, debido a que se activan las enzimas del metabolismo fermentativo. Por arriba de los 150 g/L se observa una represión catabólica por lo que la tasa de producción de etanol disminuye (Holzer, 1968).

Con una concentración de glucosa entre 3-30 g/L (dependiendo la levadura) se inhibe la síntesis de enzimas de metabolismo oxidativo (De Deken, 1966; Moss, 1971) y se modifica el metabolismo a la vía fermentativa. Este es una característica deseada a nivel industrial, ya que el etanol es un metabolito primario, para ello es indispensable tener un buen crecimiento celular. Sin

embargo, esto dependerá del tipo de cepa ya que muchas veces a altas productividades de etanol se obtienen bajos rendimientos de crecimiento.

### 2.3.3. Efecto de la concentración de etanol

A pesar de que los procesos de fermentación se optimizan para la obtención de la mayor concentración de etanol, este metabolito también es considerado un inhibidor. El efecto inhibitorio se presenta en la multiplicación celular y la fermentación. Se relaciona con la inhibición de las enzimas glicolíticas (principalmente en las enzimas hexoquinasa y alcohol deshidrogenasa) si la concentración intracelular se encuentra en una concentración entre 10-12 % p/v y en la modificación o ruptura de la pared celular (Miller y col., 1982). Esta vía fermentativa se desarrolló en con el paso de los años con la finalidad de utilizar rápidamente las fuentes de carbono disponibles e inhibir la competencia microbiana a través de la producción de etanol (Hagman y Piškur, 2015).

Brown y col. 1981 observaron la inhibición de la levadura *S. cerevisiae* NCYC 479 a diferentes concentraciones de etanol. A concentraciones de etanol 0, 20, 40, 60, 80, 100 g/L obtuvieron las siguientes tasas de crecimiento ( $\mu$ ) 0.280, 0.251, 0.200, 0.139, 0.018, 0.024 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Con esto se demuestra que a concentraciones de etanol entre 80 y 100 g/L prácticamente no hay crecimiento celular.

### 2.3.4. Efecto del oxígeno (Efactor Pasteur)

Por muchos años el Efecto Pasteur había sido un tema importante en biotecnología, ya que el O<sub>2</sub> juega un papel importante en la fermentación alcohólica de diferentes carbohidratos por parte de las levaduras. El efecto Pasteur se define como la inhibición de la actividad del metabolismo fermentativo por la respiración o por la presencia de O<sub>2</sub> (Slonimski, 1956). Por lo que si se requiere un metabolismo oxidativo el uso de O<sub>2</sub> es indispensable y, por otro lado, si se requiere un metabolismo fermentativo, es necesario un proceso anaerobio, ya que la inclusión de O<sub>2</sub> detiene o minimiza la fermentación.

En el metabolismo oxidativo, la presencia de O<sub>2</sub> puede estimular el crecimiento de las levaduras, principalmente para la biosíntesis de grasas poliinsaturadas y lípidos requeridos en las

mitocondrias y la membrana plasmática (Haukeli y Lie, 1971); y estimular la asimilación de xilosa vía pentosas fosfato.

El O<sub>2</sub> es indispensable en la fermentación de xilosa, uno de los principales productos de la hidrólisis de la hemicelulosa. Su bioconversión representa un paso importante en el planteamiento de procesos que implican el uso de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol. La levadura *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* es prometedora para su aplicación industrial debido a la rápida conversión de xilosa en etanol, con un alto rendimiento (Nigam, 2001).

Como se ha reportado, la eficiencia de un proceso de fermentación es afectada por la composición del medio y las condiciones operativas utilizadas (Silva y col. 2012). Dentro de las condiciones de operación, la disponibilidad de O<sub>2</sub> se considera el factor más importante que influye en el aprovechamiento de los carbohidratos por parte de las levaduras, ya que determina el flujo de carbono entre el crecimiento y la formación de producto (du Preez, 1994).

Por otro lado, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* convierte rápidamente diferentes carbohidratos en etanol en ausencia y presencia de O<sub>2</sub> (efecto Crabtree). La presencia de ambos procesos fermentativos fue una adaptación de la levadura para aumentar la tasa de producción de energía. Cuando el O<sub>2</sub> está ausente (anaerobiosis), el acetaldehído es el aceptor final de electrones y se convierte a etanol bajo un proceso puramente fermentativo. En condiciones aerobias, la respiración oxidativa es posible con O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones (Hagman y Piškur, 2015).

### **2.3.5. Efecto Crabtree**

En el CMS se busca recrear las características naturales presentes en el medio ambiente. Con el paso del tiempo los frutos de las plantas han sido acumuladores de grandes cantidades de monosacáridos y polisacáridos, sustratos usados en la actualidad como fuente de carbono y energía para el crecimiento celular y la producción de metabolitos. Diversas levaduras han desarrollado la capacidad metabólica necesaria para la asimilación de las diferentes fuentes de carbono que se presentan en la naturaleza.

En el aprovechamiento de los carbohidratos presentes en los frutos, las levaduras pueden ser influenciadas por un efecto de regulación metabólica llamado “Efecto Crabtree” o “Contra-Efecto Pasteur”. El efecto Crabtree es definido como la represión catabólica de las enzimas oxidativas por la concentración de los carbohidratos (Crabtree, 1929).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

Actualmente, se define como la capacidad de las levaduras para producir etanol en condiciones aerobias, reduciendo la producción de biomasa celular (Pronk y col., 1996; Hagman y col., 2013). Durante la fermentación, la energía necesaria para el crecimiento celular es proporcionada por las rutas de glicólisis y de producción de etanol, y no por las rutas de respiración oxidativa (Hagman y col., 2013). Esto significa que las levaduras necesitarían consumir una mayor cantidad de carbohidratos para lograr un buen rendimiento biomásico y esto teóricamente representaría una menor tasa de crecimiento en las levaduras con un efecto Crabtree positivo.

En los cultivos en medio sólido, una menor tasa de crecimiento podría tener un efecto negativo en la competencia por los sustratos contra otros microorganismos nativos del sustrato.

Una de las opciones para mejorar el crecimiento celular en cultivos en lote o en continuo es disminuir el efecto Crabtree, suministrando el sustrato a bajas concentraciones y sacrificando las velocidades de crecimiento (Imura y col., 2018).

Sin embargo, en un CMS los carbohidratos se encuentran ligados al sustrato (residuos de frutas/verduras o lignocelulósicos) por lo que el suministro de sustrato en forma limitada es complicado.

A pesar de que el efecto Crabtree positivo se observa en altas concentraciones de carbohidrato, es posible obtener un crecimiento oxidativo en cultivos aerobios con una concentración baja de glucosa, por ejemplo, en cultivos de lote alimentado (Postma y col., 1989; Hagman y Piškur, 2015).

Cuando las levaduras Crabtree positivas o respiro-fermentadoras son cultivadas en glucosa, el flujo de carbono se da por la ruta de metabolismo central del carbono (glicólisis). El flujo del carbono dependerá de las actividades enzimáticas específicas de la ruta de asimilación. Con el flujo de carbono en las rutas anabólicas se puede producir biomasa y en las rutas catabólicas se puede obtener CO<sub>2</sub> (respiración-oxidación completa) o una mezcla de CO<sub>2</sub> y metabolitos como etanol, debido a una oxidación incompleta de la glucosa (glicólisis anaerobia). La presencia de etanol se debe a una reacción de superflujo (metabolismo de desbordamiento) de la ruta glicolítica cuando se excede la capacidad respiratoria de las células (Sonnleitner y Käppli, 1986).

En levaduras Crabtree positivas cultivadas en condiciones anaerobias, el piruvato es metabolizado preferentemente vía piruvato descarboxilasa hasta acetaldehído y luego el



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

acetaldehído es convertido a etanol por la enzima etanol deshidrogenasa; esto sucede debido a la baja concentración de enzimas respiratorias (Postma y col., 1989).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es considerada aerobia o anaerobia facultativa, es decir, puede desarrollarse ya sea en presencia como en ausencia de O<sub>2</sub> (Crabtree positiva). Debido a que se observa una rápida formación de etanol en todas las levaduras Crabtree positivas, puede deducirse que estas levaduras poseen una gran cantidad de enzimas que constituyen la ruta de glicólisis anaerobia, incluso en condiciones de limitación de sustrato y aerobias (Hagman y Piškur, 2015).

Las actividades de las diferentes rutas metabólicas pueden cuantificarse midiendo las tasas de formación de los productos metabólicos o las tasas de asimilación del sustrato. Hagman y col. (2013) mencionan que la determinación de una levadura Crabtree positiva o negativa se puede dar a partir del monitoreo del consumo de glucosa, y la producción de etanol, así como sus respectivos rendimientos ( $Y_{x/s}$  y  $Y_{p/s}$ ). Por otro lado, Hagman y Piškur (2015) mencionan que durante el crecimiento de levaduras respiro-fermentadoras se pueden determinar intermediarios del ciclo de Krebs como el succinato, el producto final de la glicólisis como el piruvato y el acetato, producto intermediario de la enzima piruvato deshidrogenasa.

Hagman y Piškur (2015) demuestran que las levaduras Crabtree positivas tienen un mecanismo rápido de absorción de glucosa, incluso en condiciones de limitación de sustrato; esta rápida absorción no está estrictamente sincronizada con el crecimiento de las levaduras, por lo que este mecanismo puede superar fácilmente la actividad anabólica (formación de biomasa) y desviarse hacia la ruta de la fermentación del piruvato, y en consecuencia acumulando etanol.

Se ha observado en el crecimiento aerobio de levadura de panadería (*S. cerevisiae*), un comportamiento diaúxico en altas concentraciones de carbohidrato; primero se presenta un crecimiento rápido que implica una fermentación aerobia intensa a partir del consumo de moléculas de seis carbonos que reprimen la ruta respiratoria oxidativa y segundo, un posterior crecimiento lento que implica el crecimiento por oxidación de moléculas de dos carbonos (etanol acumulado) en CO<sub>2</sub> (Legmoigne y col., 1954; Postma y col., 1989; Fiechter y Seghezzi, 1992).

Rozpędowska y col. (2011) mencionan que las levaduras *Saccharomyces sp.* degradan los carbohidratos presentes en frutas, principalmente a etanol, incluso en presencia de concentraciones elevadas de O<sub>2</sub>. En hábitats naturales esta característica (producción de etanol) así como la

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

disminución de pH, le da a las levaduras ventajas para superar a otros microorganismos; mencionan que la levadura puede llegar a tolerar una concentración de etanol del 14 % y un pH de 3.2 a condiciones extremas, debido a las características que les confiere ser catalogadas como levaduras Crabtree positivas.

Hagman y col. (2013) utilizaron la levadura *S. cerevisiae* como referencia debido al efecto Crabtree que presentaba y obtuvieron un rendimiento de etanol de 0.39 g/g de glucosa y un rendimiento de biomasa de 0.16 g/g de glucosa. Utilizaron una levadura *Kluyveromyces lactis* que presentaba un efecto Crabtree negativo, que en condiciones aerobias no producía etanol y su rendimiento de biomasa fue de 0.57 g/g de glucosa. Estos autores también reportaron que en las levaduras Crabtree positivas, la glucosa se agotó al tiempo en que se obtuvo la máxima concentración de etanol y el etanol comenzó a ser utilizado como fuente de carbono. Este tipo de comportamiento delimita el metabolismo fermentativo y respiratorio. Estos mismos autores pudieron observar, en el crecimiento de las levaduras *Eremothecium coryli* y *Zygosaccharomyces rouxii*, que la máxima producción de etanol se alcanzó cuando todavía había glucosa. Esto significa un comportamiento de metabolismo mixto, fermentativo y respiratorio en el mismo periodo de tiempo. De Deken (1966) menciona que la presencia de un metabolismo respiratorio posterior al metabolismo fermentativo es debido a una compensación energética necesaria para el crecimiento celular (reasimilación del etanol).

A diferencia de las levaduras Crabtree positivas, las levaduras Crabtree negativas no producen etanol en condiciones aerobias y su metabolismo es completamente respiratorio, incluso a concentraciones elevadas de glucosa (Fiechter y Seghezzi, 1992). Las levaduras Crabtree negativas presentan un equilibrio entre las tasas de absorción de glucosa y el flujo de carbono a través de las rutas anabólicas y catabólicas (Hagman y Piškur, 2015). En cultivos de levaduras con efecto Crabtree negativo como *Candida utilis* o *Trichosporon cutaneum* donde se suministra un exceso de glucosa (por ejemplo, en experimentos donde el sustrato es pulsado en cultivos continuos), no se observa una absorción descontrolada de la glucosa y generación de etanol, sino más bien una acumulación de la glucosa en el medio de cultivo (Alexander y Jeffries, 1990; Fiechter y Seghezzi, 1992).

Alexander y Jeffries (1990) mencionan que en las levaduras Crabtree negativas (por ejemplo, *Candida shehatae*) el metabolismo fermentativo no se presenta durante el crecimiento

celular en condiciones aerobias, y en condiciones anaerobias son incapaces de crecer. Sin embargo, González Siso y col. (1996) mencionan que durante el crecimiento de *Kluyveromyces lactis*, una levadura Crabtree negativa, observaron la coexistencia del metabolismo fermentativo y respiratorio a condiciones aerobias, siendo el metabolismo respiratorio el que predominó durante el cultivo y a condiciones de anaerobiosis el metabolismo fermentativo permitió el crecimiento celular.

### **2.3.6. Efecto del pH y de la temperatura**

La tasa de fermentación es sensible a los cambios de pH, pero la mayoría de las levaduras muestran un pH óptimo amplio de 4 a 6 (Converti y col., 1989). Por otro lado, la alta tolerancia a la temperatura es una característica muy importante en la selección de cepas productoras de etanol.

Regularmente tienen un intervalo óptimo de temperatura entre 30 y 35 °C (Gray y col., 1942). La exposición a temperaturas elevadas genera una degradación excesiva de las enzimas glicolíticas y a la pérdida de viabilidad celular (Joshi y col., 2012).

### **2.3.7. Efecto de la adición de nutrientes**

En algunos casos, el sustrato a fermentar tiene que ser enriquecido para mejorar el crecimiento del microorganismo, el mantenimiento y la producción de etanol (Jones y col., 1981).

Compuestos como extracto de levadura,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{CaCl}_2$ , son nutrientes que promueven el crecimiento de las levaduras. Los iones de amonio proporcionan nitrógeno para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. El extracto de levadura contiene todos los factores de crecimiento de levadura necesarios: aminoácidos, purinas, pirimidinas, vitaminas y minerales.

Los minerales contenidos el extracto de levadura, por ejemplo, como el fósforo, el potasio, el magnesio y el calcio se pueden incorporar a la biomasa celular y también ser utilizados como cofactores que activan diversas vías metabólicas, entre ellas la de producción de etanol. La variación de la composición de los medios de cultivo utilizados ha dado como resultado la obtención de rendimientos variables (Cofré y col., 2012).

## **2.4. Esquemas de fermentación en la producción de etanol**

El etanol es una alternativa energética con un futuro prometedor. Se produce principalmente a partir del maíz en Norteamérica y China, así como de caña de azúcar en Brasil. Sin embargo, ya que el

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

maíz es principalmente una fuente de alimento, su uso como fuente de combustible ha sido criticado. Por otra parte, el uso de maíz como materia prima ha sido un importante factor en el aumento significativo de los costos de producción de etanol, por lo que la biomasa lignocelulósica y la FORSU son mucho más atractivos como materias primas de bajo costo (Tang y col., 2008).

Muchos materiales lignocelulósicos obtenidos a partir de residuos agroindustriales, tales como cáscara de arroz (Hickert y col., 2013), cáscaras de limón (Boluda-Aguilar, y col., 2013) y bagazo de caña (Chandel y col., 2007) han sido investigados como posibles fuentes de materia prima para la producción de etanol. Sin embargo, relativamente poca investigación se ha realizado sobre la conversión de los residuos urbanos ricos en lignocelulosa a etanol.

Se han reportado diversos estudios relacionados con el uso de residuos orgánicos como sustrato para la producción de etanol. En todos los casos una fracción sólida es resuspendida en un medio líquido para su pretratamiento térmico o enzimático, pero, en algunos de los casos, es separada para la fermentación de los carbohidratos en estado líquido (Kim y col., 2008; Tang y col., 2008; Wang y col., 2008; Ballesteros y col., 2010; Uncu y col., 2011; Uçkun Kiran y Liu, 2015).

A escala laboratorio, Kalogo y col. (2007) estimaron que las emisiones netas de gases de efecto invernadero por combustión de etanol obtenido a partir de RSU fueron 65 % menor que las de la gasolina y 58 % más bajo que las del etanol producido a partir de maíz. Esta reducción de gases de efecto invernadero por la combustión de etanol que se obtuvo a partir de la fracción orgánica, se tendrá solo si el etanol es etiquetado como etanol de RSU. Ya que el ahorro estimado por emisión de gases de efecto invernadero por la recuperación y reciclaje de materiales presentes en los RSU (como por ejemplo el aluminio donde por cada kg de aluminio que es recuperado se ahorra un 16.23 kg de CO<sub>2</sub> equiv) es muy importante. Por lo que el aprovechamiento de estos residuos representa una alternativa real para evitar el aumento en la contaminación ambiental.

Tang y col. (2008) desarrollaron un proceso para producir etanol a partir de residuos de cocina, donde se logró una alta recuperación de glucosa (85.5 %) a partir de una sacarificación con Nagase N-40 glucoamilasa donde la hidrólisis enzimática se llevó a cabo a 60 °C por 2 h a 150 rpm. El líquido de la sacarificación resultante se usó directamente para la producción de etanol por fermentación, sin la adición de nutrientes, en un biorreactor de 450 mL. Estos autores obtuvieron una alta productividad de etanol (24 g/Lh) utilizando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* KF-7

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

modificada genéticamente, en un proceso de fermentación continuo con una tasa de dilución de 0.8 h<sup>-1</sup>. Con este proceso a partir de 1 kg de residuos de cocina se obtuvieron 118 g de azúcares totales y 30.9 g/L de etanol (154.5 g de etanol/kg MS).

Kim y col. (2008) aplicaron una metodología de superficie de respuesta basada en un diseño factorial central compuesto para optimizar las condiciones de hidrólisis enzimática (Spirizyme Plus FG (*Aspergillus niger* - glucoamilase, Novozymes, Denmark) y la fermentación (*Saccharomyces cerevisiae* KA4) a etanol, a partir de residuos de alimentos en un matraz de 500 mL. Encontraron que las condiciones óptimas de hidrólisis fueron: pH de 5.2, temperatura de reacción enzimática de 46.3 °C y concentración enzimática de 0.16 % (v/v), mientras que para la fermentación las mejores condiciones fueron: pH de 6.85, temperatura de fermentación de 35.3 °C y tiempo de fermentación de 14 h. El modelo predijo que la concentración máxima de carbohidratos y de etanol bajo las condiciones óptimas era de 117.0 g de carbohidratos/L y 57.6 g de etanol/L (288 g de etanol/kg MS), respectivamente. Los resultados experimentales estuvieron muy cercanos a la predicción del modelo con 120.1 g de carbohidratos/L y 57.5 g de etanol/L (287.5 g de etanol/kg MS), respectivamente.

Wang y col. (2008) utilizaron una metodología de superficie de respuesta basada en un diseño factorial central compuesto para optimizar las condiciones de hidrólisis (amiloglucosidasas) y fermentación (*S. cerevisiae*) simultánea para la producción de etanol a partir de los desechos o residuos de cocina en botellas cónicas (100 g de basura de cocina con 50 mL de agua). Los resultados mostraron que la fermentación sin tratamiento térmico fue mejor debido a los nutrientes intactos que contiene. La concentración máxima de etanol de 33.05 g/L se obtuvo con las condiciones óptimas de tiempo de fermentación de 67.6 h, pH de 4.18 y temperatura de 35 °C. El rendimiento de etanol podría alcanzar 0.23 g de etanol por gramo de residuos o desechos secos (230 g de etanol/kg MS), lo que demostró que la tecnología podría ser un método ideal para utilizar la basura de residuos o desechos secos.

Shi y col. (2009) realizaron el análisis tecno-económico de la conversión de RSU a etanol. Ellos obtienen una recuperación del 79 % de glucano y 88 % de xilano después de un pretratamiento con 1 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 140 °C durante 40 min (FS=2.78) y posterior hidrólisis enzimática con la suplementación de albúmina de suero bovino. La albúmina de suero se añadió antes de la adición de enzimas (Spezyme CP y Novozyme 188) para adsorber de forma competitiva e irreversible la

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

lignina y otras impurezas, ya que bloquea la unión inespecífica de las celulasas, lo que resultó en una mejora en la estabilización de las enzimas durante el curso de la hidrólisis y en la eficacia de la hidrólisis enzimática de la celulosa en la biomasa lignocelulósica.

Ballesteros y col. (2010) ensayaron la sacarificación y fermentación (*S. cerevisiae*) simultánea (SSF) de la FORSU pretratada térmicamente utilizando un FS alto (FS=3.24, 5.3 kg/cm<sup>2</sup> [160 °C y 30 min]). Así mismo, los residuos fueron hidrolizados enzimáticamente utilizando celulasas y amilasas. La fermentación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL obteniendo un rendimiento de 126.24 g de etanol/kg MS.

Uncu y col. (2011) evaluaron el potencial de una hidrólisis simultánea (licuefacción e hidrólisis de la fracción celulósica y oligosacáridos) y posterior fermentación (*S. cerevisiae*) de los carbohidratos de residuos de cocina, donde se evaluó el efecto de la carga sólida, volumen de inoculación de una levadura comercial usada para panadería y el tiempo de fermentación en la producción de etanol, utilizando una metodología de superficie de respuesta. Los residuos de cocina recogidos incluían: pasta, pizza, galletas, hongos comestibles, lechuga, café, ensalada, frijoles frescos y secos, pan arroz, trigo, papas, tomates, zanahorias, berenjenas, y las cáscaras y partes de frutas y verduras. El proceso de hidrólisis enzimática se llevó a cabo en 6 h, usando amilasas/amiloglucosidasas/celulasas/ $\beta$ -glucosidasas. Todos los experimentos de fermentación se realizaron a pH 4.5, 30 °C, y agitación a 150 rpm, sin la adición de nutrientes. Una concentración óptima de etanol de 32.2 g/L (161 g/kg MS) con un rendimiento de 0.40 g/g, comparable a los rendimientos reportados fue sugerida por el modelo con 20 % de carga sólida, 8.9 % de volumen de inóculo y 58.8 h de fermentación. Los resultados indicaron que los costos de producción pueden reducirse en gran medida utilizando residuos de cocina y eliminando el uso de nutrientes usados tradicionalmente en las fermentaciones alcohólicas.

Boluda-Aguilar y col. (2013) realizaron la fermentación (*S. cerevisiae*) de residuos de limón pretratados por explosión a vapor (FS=2.47, [160 °C y 5 min]) y con una posterior hidrólisis enzimática (celulasas/pectinasas/ $\beta$ -glucosidasas) en un biorreactor por lote (5 L) usando 2.5 kg de residuos como sustrato, obteniendo una producción de 254.85±41.82 g de etanol/kg MS.

Uçkun Kiran y Liu (2015) realizaron una hidrólisis con enzimas del hongo *Aspergillus awamori* sobre una mezcla de residuos de alimentos. Se logró obtener, con la hidrólisis enzimática, 127 g/L de glucosa y 1.8 g/L de nitrógeno amino libre. Con una levadura comercial de panadería

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

(*S. cerevisiae*) se fermentó la materia prima en matraces Erlenmeyer (250 mL) y se obtuvieron 58 g/L (290 g/kg MS) de etanol que corresponden a un rendimiento de 0.5 g/g en un plazo de 32 h. Se demostró que la hidrólisis enzimática es una opción eficaz para la sacarificación de los residuos de alimentos y la producción de etanol.

da Costa y col. (2015) investigaron el efecto de la carga enzimática para la hidrólisis de anacardo y anacardo pretratado con 4.3 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 °C, 6 h y 250 rpm). La hidrólisis enzimática realizada con celulasas y β-glucosidasas en una relación 0.61:0.39 sobre el anacardo térmicamente resultaron las condiciones más adecuadas. Obtuvieron un rendimiento de glucosa de 511.68 mg/g de sustrato y de xilosa de 237.8 mg/g de sustrato. La fermentación y sacarificación simultánea se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer (250 mL) con *K. marxianus* ATCC 36907 donde obtuvieron una producción máxima de etanol de 18 g/L que corresponde a 74.2 kg/Ton de anacardo (aproximadamente 371 g/kg MS).

Narra y col. (2015) estudiaron la sacarificación y fermentación simultánea usando *Kluyveromyces sp.* (termotolerante) en botellas de boca ancha (50 mL), de tres tipos de biomasa lignocelulósica: paja de arroz, paja de trigo y bagazo de caña; las cuales, fueron pretratadas termoquímicamente (4 % (p/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 121 °C por 30 min) y enzimáticamente (celulasas/β-glucosidasas). La máxima producción de etanol obtenido a partir de paja de arroz fue de 196 g/kg MS, de paja de trigo de 157 g/kg MS y de bagazo de caña de 155 g/kg MS a 60 h de fermentación, con un 10 % de carga sólida y una carga enzimática de 9 FPU/g de sustrato.

A escala piloto, Jeong y col. (2018) estudiaron la hidrólisis con agua supercrítica sobre *Quercus mongolica* a escala piloto (3 kg de sustrato/150 L de agua). La hidrólisis se logró en menos de un segundo (380 °C) utilizando una concentración del 0.05 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluida en el agua. El 49.8 % de los carbohidratos se liberaron del sustrato. La fermentación se llevó a cabo con *S. cerevisiae* DXSP y obtuvieron una concentración de etanol de 141 g/kg MS.

Por otro lado, Nakanishi y col. (2018) realizaron un análisis técnico preliminar del pretratamiento alcalino (1.5 % p/v, NaOH-0.15 % antraquinona-130 °C por 30 min) de bagazo de caña a escala piloto (12 kg de sustrato en 180 L de agua). En un concepto de biorefinería, demostraron la capacidad de obtener 83.03 m<sup>3</sup> de etanol a las condiciones planteadas (207 L/Ton MS).

### 2.4.1. Cultivo en medio sólido

El CMS se ha considerado como un proceso tecnológico prometedor para darle un valor agregado a subproductos (agroindustriales) o desechos (FORSU). Se ha definido como el proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles (Viniegra-González, 1997).

El sustrato sólido puede ser la fuente de nutrientes o simplemente un soporte impregnado de los nutrientes adecuados que permita el desarrollo de los microorganismos. Este sistema de fermentación ha sido utilizado en áreas como la biorremediación, la detoxificación de residuos agroindustriales y en la producción de enzimas, metabolitos y sabores. El CMS se asemeja al hábitat natural del microorganismo, por lo tanto, es una alternativa para que los microorganismos crezcan y produzcan productos de valor agregado útiles.

Con el uso de sustratos sólidos como fuente de energía y carbono, especialmente de residuos como la FORSU, se tiene la ventaja de utilizar un sustrato accesible, barato (con la condición que se use directamente y no se emplee transporte) y una estrategia para revalorizar estos residuos con la finalidad de disminuir los impactos potenciales de contaminación ambiental.

El CMS tiene como características un bajo requerimiento energético, no se emplean equipos complejos, el proceso de purificación es más simple, mayor productividad de fermentación, una mayor concentración final del producto, mayor estabilidad del producto, menor represión catabólica y una menor demanda de esterilidad, debido a la baja actividad de agua (Hölker y col. 2004).

Las principales ventajas de utilizar el CMS para la producción de etanol son:

- Sustratos de bajo costo que no requieren de la extracción de carbohidratos
- Mayor transferencia de oxígeno que el cultivo líquido
- Menor requerimiento de agua
- Reactores de menor escala
- Aumenta la velocidad de contacto sustrato-microorganismo
- Se evita el tratamiento de aguas residuales

Diversos factores fisicoquímicos como la temperatura, el pH, la aireación, la actividad de agua, la humedad y la naturaleza del sustrato sólido afectan el proceso de CMS (Singhania y col.



2009). La humedad (20 – 80 %) y la actividad de agua ( $a_w$ ) han sido considerados los principales factores que afectan el crecimiento microbiano y dependerá del tipo de sustrato utilizado.

La  $a_w$  ha sido considerada como un parámetro fundamental en la transferencia de masa del agua y solutos a través de la membrana de los microorganismos. El control de este parámetro se utiliza para modificar la producción o excreción metabólica a través de la membrana microbiana (Rodríguez León y col., 2001).

Un alto porcentaje de humedad da lugar a una baja porosidad del sustrato, lo que a su vez impide la transferencia de  $O_2$ , mientras que un bajo contenido de humedad puede dar lugar a una mala accesibilidad de los nutrientes, lo que resulta en un crecimiento microbiano deficiente (Pandey, 2003). El pH es otro factor que afecta el proceso de CMS, debido a la secreción de ácidos u otros metabolitos.

La temperatura es considerada también un factor crítico, debido a que su control ayuda a que se lleven a cabo todas las reacciones metabólicas celulares. La alta concentración de sustrato por unidad de volumen y la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido-líquido-gas, favorece la acumulación de calor metabólico y aumento de la temperatura. Esto provoca una desaceleración en la actividad microbiana, deshidrata el sustrato sólido y el metabolismo se desvía por el estrés provocado por el calor o deshidratación.

Dentro de las desventajas del CMS se mencionan las siguientes (Doelle y col. 1992):

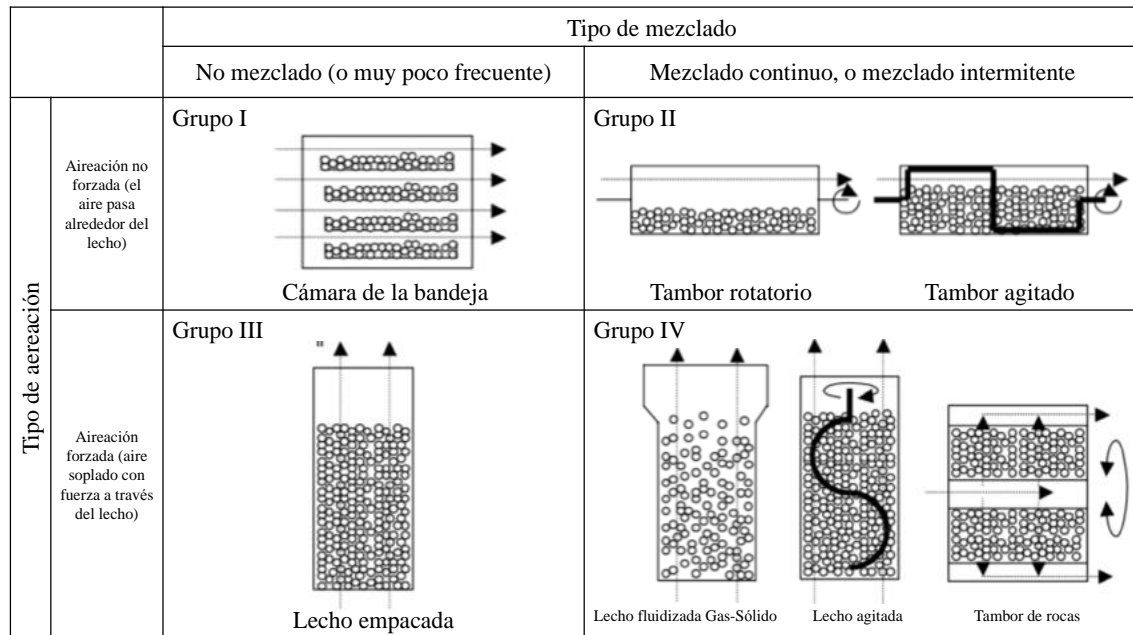
- Se limita a microorganismos que crecen a bajo porcentaje de humedad
- Difícil remoción de calor metabólico
- El diseño de reactores y el escalado es poco estudiado
- En algunos casos, el tiempo de fermentación suele ser mayor, debido a las bajas tasas específicas de crecimiento.

### **2.4.2. Biorreactores en el cultivo en medio sólido**

En el CMS, el biorreactor proporciona el entorno para el crecimiento y la actividad de los microorganismos, que llevan a cabo las reacciones biológicas. En los últimos años, los biorreactores utilizados en el CMS han sido modificados y modernizados para maximizar la productividad en la obtención de productos de alto interés industrial. Sin embargo, es necesario

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

seguir investigando para identificar procesos sustentables que permitan mantener la productividad y la calidad de los productos con aplicaciones biotecnológicas (Arora y col., 2008).



**Figura 2.8.** Diseños básicos de biorreactores para CMS, clasificados en cuatro grupos dependiendo del tipo de mezclado y aireación (modificado de Pandey, 1991).

Pandey (1991) describió diferentes tipos de biorreactores utilizados en el CMS. Los tipos de fermentador descritos incluyen un fermentador de bandeja, un fermentador de tambor (biorreactor de tambor giratorio continuo o discontinuo), un fermentador de columna, un fermentador de lecho compacto, un fermentador de lecho removido intermitentemente, entre otros diseños diferentes. Los fermentadores fueron descritos y utilizados para diversos fines, incorporando diferentes modificaciones para mejorar el rendimiento (Figura 2.8).

Los biorreactores usados en el CMS están basados principalmente en cuatro tipos, con base a su aireación o sistema de mezclado: biorreactor de charolas, lecho empacado, tambor rotatorio y de lecho fluidizado (Singhania y col., 2009).

En este trabajo se propone el uso de dos biorreactores prototipo construidos en acero inoxidable con una capacidad de 84 y 150 L, con un alto potencial para ser usados en la producción de etanol. El biorreactor horizontal semi-cilíndrico de 84 L compuesto de un eje central con cintas helicoidales (BLH) se ha utilizado para la producción de esporas en cultivo en medio sólido (Nava

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

y col. 2011). Este equipo cuenta con un mezclador que mejora el contacto de la interfase gas-sólido, es decir, un listón externo mueve el material de los extremos hacia el centro, mientras que el listón interno mueve el material del centro a los extremos de biorreactor.

Por otro lado, el biorreactor horizontal de 150 L está compuesto de dos artesas (tipo media G caña tubular) donde cada una de ellas cuenta con un agitador tipo tornillo sin fin (BTSF). La dinámica de mezclado de sólidos es tal que se observa un comportamiento de flujo pistón ideal en la dirección axial de las artesas y un retromezclado importante en la zona de comunicación entre las artesas. En este equipo se puede controlar la dirección del giro del tornillo sin fin, la agitación puede ser continua o intermitente y es posible controlar los periodos de agitación o de reposo; cuenta con un puerto de alimentación y otro de descarga, por lo cual puede funcionar como reactor por lote, o lote alimentado, continuo o semicontinuo. Debido a su capacidad el biorreactor tipo TSF se presenta como una alternativa para la producción de etanol a una mayor escala, con respecto al biorreactor de listones helicoidales.

Los biorreactores con listones helicoidales y con un tornillo sin fin, se presentan como una alternativa para la producción de etanol a escala piloto. Este tipo de biorreactores no han sido reportados para la producción de etanol.

Diversos esquemas de CMS han sido reportados, utilizando diversos esquemas de pretratamientos y sustratos:

Saucedo-Castañeda y col., (1992) proponen la conversión de almidón, solo con un pretratamiento térmico (121 °C – 30 min), en biomasa y etanol a partir del uso de *Schwaniomyces castelli* en condiciones aerobias-anaerobias por fermentación en estado sólido. También demuestran el uso potencial de un fermentador en columna (1 L), con el cual logran alcanzar una producción máxima de etanol de 89.3 g/kg MS.

Yu y col. (2008) estudiaron la fermentación estática en estado sólido de sorgo dulce como sustrato de la fermentación para la producción de etanol y utilizando una levadura mutante de panadería AF37X. Se estudió la influencia de diversos parámetros del proceso, como la concentración de células ( $2 - 10 \times 10^6$  cel/g de sorgo), tamaño de partícula (0.5 – 1.5 mm) y el contenido de humedad (60 – 80 %), para aumentar la producción de etanol. Los valores óptimos obtenidos fueron  $4 \times 10^6$  cel/g de sorgo, un tamaño de partícula de 1.5 mm y una humedad del 75 %.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

Obtuvieron un rendimiento máximo de etanol de 7.9 g/100 g de sorgo fresco (316 g etanol/kg MS) o 0.46 g de etanol/g de carbohidratos totales, lo que representaba el 91 % del rendimiento teórico.

Chen y Li (2013) reportan la fermentación de paja de maíz para la producción de etanol en CMS. La materia fue pretratada por explosión a vapor a las condiciones óptimas reportadas de su proceso las cuales fueron, 1.5 MPa de presión y 15 min de tiempo de residencia, a nivel industrial, seguido por una hidrólisis enzimática y fermentación a una temperatura de 50 °C y 37 °C, respectivamente. La glucosa liberada fue consumida por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería), el etanol formado fue separado utilizando CO<sub>2</sub> como gas acarreador, para luego ser separado con carbón activado. El rendimiento de etanol alcanzado se reportó entre el 18.96 al 30.29 %. El experimento se realizó en un fermentador de 300 L.

Li y col. (2013) mencionan que los tallos de sorgo dulce, son una fuente prometedora de energía, por lo que realizaron un CMS donde el sustrato solo fue hidrolizado enzimáticamente ( $\alpha$ -1,4-glucan-glucohydrolase a 58 °C por 1 h), con un reactor de 55 m de longitud y 3.6 m de diámetro. Los resultados demostraron que con tiempos de fermentación menores a las 30 h, el rendimiento de etanol fue del 90.5 % a partir del rendimiento teórico y una producción máxima de 208 g/kg MS (pureza del 99.5 %).

Mazaheri y col. (2015) usaron una mezcla de algarrobo y salvado de trigo como sustrato para la producción de etanol utilizando *Z. mobilis* en un fermentador de columna de lecho compacto de 0.5 L (5 diámetro por 28 de largo). El sustrato fue pretratado térmicamente a 121 °C por 15 min. Debido a que las condiciones de fermentación fueron anaerobias, la eliminación de calor y la detección de CO<sub>2</sub> metabólico fue ineficiente; sin embargo, con una aireación intermitente pudieron cuantificar el CO<sub>2</sub>. Las condiciones óptimas de cultivo fueron 28 °C, un tamaño de partícula de 1 mm y una aireación intermitente de 0.1 L/min durante 15 min cada hora, durante las 15 h de fermentación. En estas condiciones, lograron obtener una producción máxima de etanol de 60.9 g/kg MS.

Canabarro y col. (2017) optimizaron y escalaron la producción de etanol mediante la sacarificación y fermentación en cultivo en medio sólido utilizando 1 kg de sustrato salvado de arroz pretratado térmicamente (1.1 kg/cm<sup>2</sup> (121 °C) por 20 min; FS= 1.92) en un biorreactor por lote. En una primera etapa realizaron la fermentación en matraces Erlenmeyer donde a partir de un

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

diseño Plackett Burman determinaron que las variables independientes con un efecto significativo en la producción de etanol fueron la concentración del salvado de arroz, el contenido de humedad y el tamaño de inóculo. En esta etapa alcanzaron un rendimiento de etanol de 138.7 g/kg MS.

Escalaron 10 veces el experimento utilizando un reactor de lecho empacado y alcanzaron un rendimiento similar ( $135 \pm 10.8$  g de etanol/kg MS) a las siguientes condiciones de tamaño de inóculo, concentración de salvado de arroz y humedad, 10 % (v/v), 62.5 % (p/p) y 65 % (p/p), respectivamente.

Molaverdi y col. (2019) investigaron la producción de etanol a partir de la paja de arroz utilizando el hongo *Mucor indicus* mediante el proceso de sacarificación y fermentación simultánea en estado sólido (SFSES). La paja de arroz fue pretratada con una solución de carbonato de sodio de 0.5 M durante 3, 5 y 10 h para mejorar la eficiencia del proceso. Se estudiaron los efectos del pretratamiento sobre la composición, la morfología estructural, la cristalinidad de la celulosa, la capacidad de hinchamiento y la capacidad de amortiguación de la paja. Además, se investigaron los efectos del tiempo de reacción de la SFSES, la carga enzimática y la carga sólida en la producción de glucosa y etanol.

La concentración más alta de carbohidratos totales fue de 89.2 g/L, obtenida a partir de la paja de arroz pretratada durante 10 h después de la hidrólisis con 10 FPU/g de paja con una carga sólida del 15 % p/p. La mayor concentración de etanol y el mayor rendimiento fueron de 99.4 g/L y 89.5 %. Las bajas cargas enzimáticas de 2.5 y 5 FPU/g de paja produjeron etanol con concentraciones de hasta 66.3 y 90.9 g/L, respectivamente, después de 120 h de fermentación con un 30 % de carga sólida de la paja pretratada durante 5 h.

### 2.5. Comentario final de la revisión bibliográfica

La revisión bibliográfica muestra que la FORSU es un sustrato con alto potencial para su aprovechamiento en la producción de etanol de segunda generación.

Diversas estrategias se han planteado para la hidrólisis de los biopolímeros (celulosa y hemicelulosa) estructurales de los residuos de la FORSU. El uso de un pretratamiento térmico suave podría disminuir etapas y costos en la producción del etanol, comparado con los tratamientos termoquímicos agresivos y enzimáticos.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

El CMS para el aprovechamiento de los carbohidratos fermentables surge como una alternativa para los cultivos sumergidos. Con el uso de cultivos en medio sólido se podría disminuir el tamaño de los biorreactores y el volumen de agua utilizada. También, se aprovecharían grandes cantidades de residuos sin tener la necesidad de solubilizar los carbohidratos. Diversas levaduras se proponen para el aprovechamiento de hexosas y pentosas con las cuales, se busca mejorar el rendimiento de producción de etanol. Sin embargo, es importante tomar en cuenta el metabolismo de las levaduras a utilizar, ya que su aplicación biotecnológica podría ser errónea. El efecto Crabtree es un fenómeno metabólico que nos podría indicar la capacidad de las levaduras en aprovechar los carbohidratos fermentables y la producción de etanol en condiciones aerobias y anaerobias. Las levaduras que presentan un efecto Crabtree positivo tienen una ventaja competitiva, sobre otros microorganismos, que les permite un consumo rápido de los carbohidratos, principalmente para su crecimiento, pero también para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados en la fermentación (contaminantes), gracias a la producción de etanol.

La fermentación con cultivos mixtos pueden dar lugar al aumento en el rendimiento de etanol, mejorar el control del proceso y la calidad del producto. Los cultivos mixtos también podrían conducir a la utilización de sustratos más baratos y mejorar procesos existentes.

***CAPÍTULO 3***  
***JUSTIFICACIÓN***

## 3. JUSTIFICACIÓN

La acumulación de los RSU está llegando a niveles críticos en muchas regiones en todo el mundo. El crecimiento económico y demográfico que México ha experimentado en los últimos años ha provocado un crecimiento de la urbanización que ha dado lugar a una modificación en los patrones de consumo. Entre otras consecuencias, se ha observado un aumento en la cantidad y la heterogeneidad de los residuos sólidos urbanos.

Por lo que, estos desechos requieren ser manejados de manera sustentable para evitar el agotamiento de los recursos naturales, minimizar los riesgos a la salud humana, reducir las cargas ambientales y mantener un balance general con el ecosistema.

En México se generan más de 53 millones de toneladas de RSU al año, de los cuales, se calcula que el 52 % corresponde a la fracción orgánica. La SEDEMA (2015) indica que se generan más de 12 843 toneladas por día de RSU en la Ciudad de México. Debido a la gran cantidad de residuos sólidos generados, se está en la búsqueda de alternativas para su aprovechamiento.

La Central de Abastos más grande de Latinoamérica está ubicada en la Alcaldía de Iztapalapa, Ciudad de México. Genera más de 1 290 toneladas de residuos sólidos municipales por día, donde el 70 % (905 toneladas de residuos orgánicos por día) son residuos de frutas y verduras, que ya no se comercializan. Estos productos pueden utilizarse para varios fines: producción de etanol (Ballesteros y col., 2010), composteo (Martínez-Valdez, y col., 2015), alimentación animal (Salemdeeb y col., 2017) y otros (Uçkun Kiran y col., 2014). La utilización de estos residuos para la producción de etanol permitiría una producción de hasta 281 m<sup>3</sup> de etanol al día, que puede ser utilizado como aditivo para biocarburantes.

Una de las tecnologías prometedoras para la transformación de esta biomasa es la producción de etanol por fermentación de los carbohidratos presentes en la FORSU. El etanol obtenido a partir de materias primas lignocelulósicas, tales como residuos agroindustriales, pastos y fracciones orgánicas de los RSU se está convirtiendo en una opción atractiva debido al bajo costo de las materias primas.

Este proceso es una buena alternativa para sustituir los combustibles fósiles y reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero. Además, el uso de la FORSU para la producción de etanol como combustible para transporte, no presenta la disyuntiva de la producción de



## JUSTIFICACIÓN

---

combustibles con productos utilizados para consumo de alimentos como es el caso del uso del maíz y la caña de azúcar, entre otros.

También, ayudaría a la reducción de la cantidad de residuos destinados a los rellenos sanitarios y contribuiría a diversificar las fuentes de materias primas para la producción de etanol en el país.

En este contexto, el presente estudio se pretende desarrollar un bioproceso viable para la producción de etanol a partir de los residuos frescos de frutas y verduras, con un pretratamiento térmico suave, utilizando cultivos axénico o mixtos en CMS. Este enfoque evitaría el uso de un pretratamiento termoquímico agresivo o enzimático y reduciría considerablemente el consumo de agua.

***CAPÍTULO 4***  
***HIPÓTESIS***

## 4. HIPÓTESIS

La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos sometida a un tratamiento térmico suave, es una fuente adecuada para la liberación de carbohidratos fermentables para la producción directa y rápida a etanol por levaduras en cultivo en medio sólido.

## OBJETIVOS

---

### ***CAPÍTULO 5*** ***OBJETIVOS***

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1. Objetivo general

Desarrollar un proceso de producción de etanol a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) a nivel laboratorio y piloto, por fermentación directa y rápida en cultivo en medio sólido.

#### 5.2. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del diseño de matraces Erlenmeyer y sus niveles de llenado en la producción de inóculos para la producción de etanol a partir de la mezcla sólida estándar (MSE) de la FORSU.
- Emplear el efecto Crabtree como un criterio para la selección de las levaduras y así como determinar las condiciones de cultivo para la producción de inóculos.
- Determinar las condiciones de pretratamiento térmico suave de una mezcla sólida estándar de la FORSU para aumentar la liberación de carbohidratos fermentables y evitar la formación de inhibidores de la fermentación alcohólica.
- Establecer el potencial de una mezcla sólida estándar de la FORSU pretratada térmicamente para la producción de etanol por cultivo en medio sólido utilizando cultivos axénicos o mixtos de levaduras a escala laboratorio y piloto.

***CAPÍTULO 6***  
***MATERIALES Y MÉTODOS***

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Microorganismos

Las levaduras empleadas para la producción de biomasa y de etanol a partir de diferentes fuentes de carbono y de la mezcla sólida estándar (MSE) de la FORSU fueron las siguientes:

- *Saccharomyces cerevisiae* (Levadura de panadería)
- *Saccharomyces cerevisiae* (ITD00196)
- *Schwanniomyces occidentalis* (CBS2863)
- *Scheffersomyces stipitis* (ATCC58785)
- *Scheffersomyces stipitis* (Y-17104)
- *Kluyveromyces marxianus* (CBS6556)

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Levadura de panadería) se obtuvo de una marca comercial. Las levaduras *Schwanniomyces occidentalis* (CBS2863) y *Kluyveromyces marxianus* (CBS6556) se obtuvieron del cepario de la Planta Piloto 4, ubicada en la Universidad Autónoma Metropolitana, Alcaldía de Iztapalapa de la Ciudad de México. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ITD00196) fue donada por el Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz, la cual fue aislada de la fermentación del *Agave durangensis* (Díaz-Campillo y col., 2012). Por último, las levaduras *Scheffersomyces stipitis* (ATCC58785) y *Scheffersomyces stipitis* (Y-17104) fueron donadas por la M. en C. Lorena Pedraza Segura, investigadora de la Universidad Iberoamericana.

### 6.2. Formulación de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos

La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos se obtuvo en locales de venta de frutas y ensaladas cercanas a la Universidad Autónoma Metropolitana ubicada en la Alcaldía de Iztapalapa, Ciudad de México. Se definió una mezcla sólida estándar (MSE) de residuos compuesta por (% p/p): FORSU, 93; aserrín, 4; y papel triturado, 3, con una relación C/N cercana a 35. La FORSU estuvo compuesta por cáscaras de (% p/p): naranja, 30; sandía, 15; piña, 15; limón, 10; zanahoria, 10; papaya, 10; plátano, 5; y pepino, 5. Esta mezcla es representativa de la composición

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

de residuos generados en la periferia de la Universidad; y de las frutas y verduras que se generan durante todo el año en el país (INSK, 2002).

Los residuos usados para formular la MSE de la FORSU se cortaron manualmente a un tamaño promedio de 1.0 cm a escala laboratorio y con un molino de cuchillas (VICOSI GP100, México, D.F.) a escala piloto, antes de ser empleadas para el pretratamiento con vapor o para los CMS. La MSE de la FORSU fue almacenada a no más de 24 h a 4 °C, antes de su uso.

### 6.3. Mantenimiento, propagación y crecimiento de los microorganismos

Las levaduras se obtuvieron liofilizadas o en cajas Petri almacenadas por estría. Fueron activadas usando el medio líquido YPD, constituido por (en g/L): glucosa, 20; extracto de levadura, 10; y peptona de caseína, 20; y propagadas en el medio definido (en g/L): glucosa, 20; peptona de caseína, 3.5; extracto de levadura, 3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1; y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5; (C/N 9) (Saucedo-Castañeda y col., 1992). Ambos medios fueron ajustados a un pH de 4.8 (1.0 M HCl).

El medio fue esterilizado a 121 °C por 10 min para evitar la caramelización de la glucosa. Para la propagación de cada una de las levaduras, se tomó un vial o una asada y se inoculó en un matraz bafleado de 250 mL con 100 mL del medio antes mencionado y se incubó durante 12 h a 180 rpm y 30 °C para alcanzar la fase exponencial.

Una vez crecida la levadura, esta fue utilizada para inocular un matraz de 500 mL con 250 mL de medio y se incubó a las mismas condiciones. Crecida la levadura, esta se sembró por estría en cajas Petri que contenían alrededor de 20 mL de ambos medios con Agar (20 g/L) y se incubaron a 30 °C durante 48 h para obtener el crecimiento de las cepas.

Para la conservación de las levaduras se utilizaron crioprotectores (Protect™) que contienen una solución de glicerol al 30 % (v/v) en agua destilada y perlas de cerámica porosa. Una colonia de cada cepa ya crecida fue sembrada en un criotubo y almacenada a -4 °C.

### 6.4. Producción de biomasa

La producción de biomasa se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL (Pyrex, vidrio de borosilicato, EE. UU.) con diferentes diseños (convencionales, bafleados y con un resorte interno), volumen de llenado y empleando diferentes levaduras (Tabla 6.1).

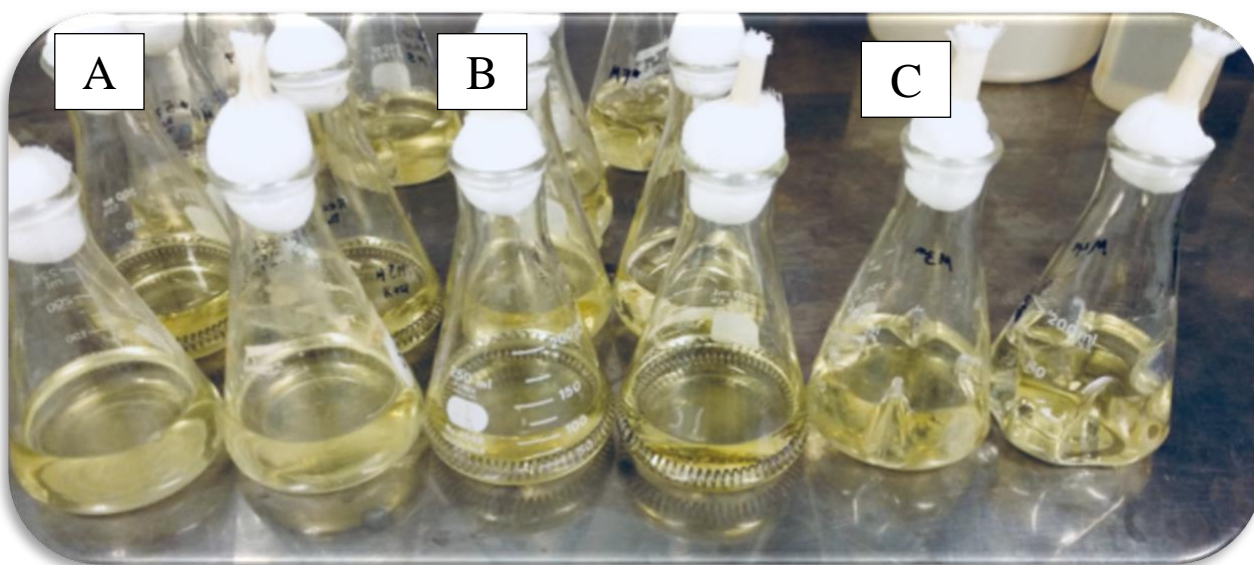
Las levaduras se crecieron en 50 y 100 mL de medio definido (20 y 40 % de volumen de llenado, relativo al volumen nominal del matraz, respectivamente).



## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 6.1.** Diseño factorial utilizado para la obtención de inóculos.

	Levadura	Factores	
		Matraz empleado (250 mL)	Volumen de llenado (%)
<b>Unidades de variación</b>	Levadura de panadería		
	<i>S. cerevisiae</i> ITD00196	Convencional	20
	<i>S. stipitis</i> ATCC58785	Resorte	40
	<i>Schw. occidentalis</i> ATCC26077	Bafleado	
	<i>S. stipitis</i> Y-17104		
	<i>K. marxianus</i> CBS6556		



**Figura 6.1.** Diseño del matraz Erlenmeyer usado: **A)** convencional, **B)** con resorte y **C)** bafleado.

Después del esquema de propagación como se muestra en la sección 6.3; los cultivos se incubaron a 30 °C y 180 rpm durante 48 h en un agitador orbital (DLAB SK-0330-Pro) con un tamaño de inóculo de  $1 \times 10^6$  células/mL de medio de cultivo. Se recolectaron muestras a intervalos regulares de tiempo (4 y 12 h) y se centrifugaron a 4 °C y 5 300 rpm por 20 min, el sobrenadante y el paquete celular se separaron. Con el paquete celular se cuantificó el crecimiento por peso seco y el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis por HPLC. Cada experimento se llevó a cabo al menos por duplicado.

### 6.5. Consideraciones matemáticas usadas en el modelamiento de la producción de biomasa

El modelo logístico se utilizó para simular el crecimiento en cultivos microbianos. En esta ecuación la tasa de crecimiento depende sólo de la biomasa obtenida y no de la concentración de sustrato (Mazaheri y col., 2013). Diferencialmente la ecuación se presenta de la siguiente forma:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left[ 1 - \frac{X}{X_{max}} \right] \quad (\text{Ec. 6.1})$$

Al integrar la Ecuación 6.1 (Anexo A) se obtuvo la siguiente ecuación:

$$X = \frac{X_{max}}{1 + \left( \frac{X_{max} - X_0}{X_0} \right) \exp(-\mu t)} \quad (\text{Ec. 6.2})$$

Donde  $X$  es la concentración de biomasa,  $X_0$  y  $X_{max}$  es la biomasa inicial y máxima (g/L) del modelo logístico, respectivamente y  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) es la tasa específica de crecimiento.

Aún, cuando el modelo logístico describe adecuadamente el crecimiento microbiano, este puede acoplarse al consumo de sustrato mediante el modelo propuesto por Pirt en 1975:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} + mX \quad (\text{Ec. 6.3})$$

La relación entre el crecimiento y el consumo de sustrato puede ser descrito al integrar y acoplar el modelo logístico (Ec. 6.1) con el modelo de Pirt (Ec. 6.3) como lo propuso Soto-Cruz y col., 2002 resultando (Anexo B):

$$S_0 - S(X) = \frac{1}{Y_{x/s}} (X - X_0) - \frac{mX_{max}}{\mu} \text{Ln} \left[ \frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X} \right] \quad (\text{Ec. 6.4})$$

Donde  $X$  es la concentración de biomasa calculada por el modelo logístico,  $X_0$  y  $X_{max}$  es la biomasa inicial y máxima (g/L) del modelo logístico, respectivamente;  $m$  es el coeficiente de mantenimiento (g biomasa/g glucosa h),  $\mu_{max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) es la tasa máxima de crecimiento,  $Y_{x/s}$  es el rendimiento entre la biomasa producida y el sustrato consumido y  $S$  representa la concentración de sustrato (g/L).

El coeficiente de rendimiento de producción de biomasa por consumo de sustrato ( $Y_{x/s}$ ) en el momento en el que el carbohidrato se consumió totalmente (8-36 h), llamado  $Y_{x/s}'$  y después de 48 h de cultivo  $Y_{x/s}''$ , se expresaron con las siguientes ecuaciones:

$$Y_{x/s}' = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (\text{Ec. 6.5})$$

Donde  $X_0$  y  $X_f$ , es la concentración inicial y final de la biomasa determinada al momento en que se obtuvo la mayor concentración de etanol ( $P_{max}$ ) (8-36 h de cultivo).  $S_0$  y  $S_f$  es la

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

concentración inicial y final de la glucosa o xilosa medida en el momento en que se obtuvo la concentración más alta de etanol (8-36 h de cultivo).

El coeficiente  $Y_{x/s}$  se calculó considerando la formación de biomasa y el consumo de glucosa o xilosa después de 48 h de cultivo.

$$Y_{x/s}'' = \frac{X_f - X_o}{S_o - S_f} \quad (\text{Ec. 6.6})$$

Donde  $X_o$  y  $X_f$ , es la concentración inicial y final de la biomasa a 48 h de cultivo, respectivamente.  $S_o$  y  $S_f$  es la concentración inicial y final de la glucosa o xilosa después de 48 h de cultivo, respectivamente.

El coeficiente de rendimiento de producción de etanol por consumo de glucosa o xilosa ( $Y_{p/s}$ ) se estimó en el momento en que la glucosa o xilosa se consumió totalmente y se observó la concentración máxima de etanol, el coeficiente de rendimiento se expresó con la siguiente ecuación:

$$Y_{p/s} = \frac{P_{max} - P_o}{S_o - S_f} \quad (\text{Ec. 6.7})$$

Donde  $P_o$  y  $P_{max}$  representan la concentración inicial y máxima de etanol determinadas, respectivamente.  $S_o$  y  $S_f$  es la concentración inicial y final de la glucosa o xilosa medida en el momento en que se obtuvo la concentración más alta de etanol ( $P_{max}$ ).

El coeficiente de rendimiento de producción de biomasa por consumo de etanol ( $Y_{x/p}$ ) se estimó durante la fase de metabolismo respiratorio (MR) como se indica en la siguiente ecuación:

$$Y_{x/p} = \frac{X_{max} - X_e}{P_{max} - P_f} \quad (\text{Ec. 6.8})$$

Donde  $X_e$  es la concentración de biomasa obtenida al tiempo en que se alcanzó la mayor concentración de etanol (8-36 h);  $X_{max}$  representa el crecimiento máximo obtenido al final del cultivo (48 h),  $P_{max}$  es la concentración máxima de etanol obtenida y  $P_f$  es el etanol al final del cultivo.

El coeficiente de productividad del etanol ( $E_{prod}$ ; g/Lh) se expresó dividiendo la concentración máxima de etanol producido (g/L) entre el correspondiente tiempo de producción (h).

### 6.6. Aplicación de las levaduras utilizadas en la fermentación de una mezcla sólida estándar de la FORSU sin pretratamiento

El inóculo para la fermentación de la MSE de la FORSU en CMS se produjo utilizando matraces Erlenmeyer de 250 mL (matraz bafleado para las levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* (Levadura de panadería); *Saccharomyces cerevisiae* ITD00196; *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785; *Scheffersomyces stipitis* Y-17104; *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 y matraz convencional para *Schwanniomyces occidentalis* CBS2863) con 50 mL de medio de cultivo (volumen de llenado del 20 %), usando el medio definido.

La fermentación de la MSE de la FORSU en CMS se llevó a cabo en biorreactores tubulares (BRT) de 5 cm de diámetro y 15 cm de alto. El BRT fue empacado con 100 g de la MSE de la FORSU sin pretratamiento térmico. La inoculación de las levaduras se llevó a cabo usando cultivos axénicos y un cultivo mixto (*Saccharomyces cerevisiae* ITD00196, *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785 y *Schwanniomyces occidentalis* CBS2863) al 10 % para los cultivos axénicos y al 3.3 % para el cultivo mixto en la MSE de la FORSU sin pretratamiento térmico. Una vez inoculados y empacados los BRT fueron incubados a 30 °C por 48 h sin aireación.

### 6.7. Pretratamiento térmico de la mezcla sólida estándar de la FORSU

El pretratamiento térmico de la MSE de la FORSU fue optimizado utilizando un diseño factorial  $2^2$  central compuesto con puntos estrella para tres concentraciones de  $H_2SO_4$  (0, 1 y 2 % p/p). Los factores y las unidades de variación se presentan en la Tabla 6.2.

El punto central de experimentación para la presión fue 2 kg/cm<sup>2</sup>, con una unidad de variación de 0.7 kg/cm<sup>2</sup> y los puntos estrellas fueron de 1 y 3 kg/cm<sup>2</sup>. Para el tiempo de residencia, el punto central fue de 10 min, con una unidad de variación de 5 min y los puntos estrellas fueron 2.93 y 17.05 min. Para la concentración de  $H_2SO_4$ , el punto central fue de 1 % (p/p), con una unidad de variación del 1 % (p/p).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 6.2.** Diseño factorial utilizado para el pretratamiento térmico de la mezcla sólida estándar de la FOSRU.

	Factores		
	Presión (kg/cm <sup>2</sup> )	Tiempo de residencia (min)	Concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%p/p)
Unidades de variación	1.3	5	0
	2	10	1
	2.7	15	2

En la Tabla 6.3 se presentan los valores codificados y reales, donde para cada una de las concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se aplicaron los diferentes tratamientos del diseño factorial central compuesto con puntos estrella. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó utilizando como variables de respuesta las concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y carbohidratos fermentables (Sac + Glu + Fru + Xil).

Como ensayo control, se realizó una esterilización térmica estándar (ETE) a las siguientes condiciones 1.1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min. Los ensayos de pretratamiento térmico se realizaron en una autoclave de 180 L (SMI AVX 130E, Francia) modificada para funcionar con vapor suministrado por una caldera de vapor (Clayton EG-33, México).

Una muestra de 100 g de la MSE de la FORSU se colocó en frascos de 740 mL (15 cm de altura y 9.5 cm de diámetro) y se colocó en la autoclave. El vapor de la autoclave fue purgado a condiciones atmosféricas, luego se aplicaron las condiciones descritas en el diseño factorial central compuesto (Tabla 6.3). Una vez transcurrido el tiempo del pretratamiento, se liberó el vapor a la atmósfera en menos de 2 min (explosión a vapor).

Las muestras sin y con pretratamiento térmico se almacenaron a -20 °C hasta la extracción de los carbohidratos fermentables e inhibidores para su análisis por HPLC. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Muestras secas (105 °C) sin y con pretratamiento térmico (2.7 kg/cm<sup>2</sup> – 15 min; FS=2.35) fueron usadas para la caracterización química y la determinación de la composición estructural de la MSE de la FORSU.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 6.3.** Diseño factorial central compuesto aplicado en el pretratamiento térmico de la mezcla sólida estándar de la FORSU.

Tratamiento	Valores reales		Valores codificados	
	Presión (kg/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (min)	A	B
1	2.7	15	1	1
2	2.7	5	1	-1
3	1.3	15	-1	1
4	1.3	5	-1	-1
5	2	10	0	0
6	2	10	0	0
7	2	10	0	0
8	2	17.05	0	1.41
9	2	2.93	0	-1.41
10	3	10	1.41	0
11	1	10	-1.41	0

### 6.8. Consideraciones matemáticas usadas en el pretratamiento de la mezcla sólida estándar de la FORSU

La interacción de las variables independientes codificadas se determinó mediante el modelo polinomial de segundo orden:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (\text{Ec. 6.9})$$

Donde  $y$  es la respuesta predicha,  $\beta_0$  es el término promedio de  $x_i x_j$ ,  $\beta_i$  es el coeficiente del efecto lineal,  $\beta_{ij}$  es el coeficiente del efecto cuadrático cuando  $i = j$  y el efecto de la interacción cuando  $i < j$ ,  $\beta_{ii}$  es el coeficiente del término cuadrado y  $x_i$  son las variables independientes.

Por otro lado, el factor de severidad (FS) fue usado para determinar el efecto de la relación de la temperatura y tiempo de residencia en el tratamiento térmico. Este parámetro se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación (Zhi-Min y col., 2015):

$$FS = \log \left( t \cdot \exp \left( \frac{T-100}{14.75} \right) \right) \quad (\text{Ec. 6.10})$$

Donde  $t$  representa el tiempo de residencia (min),  $T$  es la temperatura del tratamiento ( $^{\circ}\text{C}$ ) y 100 es la temperatura de referencia ( $^{\circ}\text{C}$ ). El valor de 14.75 es un parámetro empírico que relaciona la temperatura y la energía de activación, asumiendo que la cinética es de primer orden (Overend y col., 1987). Abatzoglou y col. (1992) desarrollaron una ecuación que correlaciona la presión-temperatura, tiempo de residencia y la concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , como se muestra en la siguiente ecuación:

$$FS = \log \left( t \cdot \exp \left( \frac{T-100}{14.75} \right) \right) - \text{pH} \quad (\text{Ec. 6.11})$$

Donde el  $\text{pH}$  representa el valor de pH obtenido después del pretratamiento térmico de las muestras a las diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

### **6.9. Prueba preliminar de producción de etanol a partir de la fermentación de la mezcla sólida estándar pretratada a diferentes concentraciones de $\text{H}_2\text{SO}_4$ (0, 1 y 2 %p/p) a escala laboratorio**

La MSE de la FORSU pretratada con FS de 2.35, 0.67 y 1.14 y usando las concentraciones de 0, 1 y 2 % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  fue utilizada como sustrato en una prueba preliminar de producción de etanol.

Se ajustó el pH de la MSE de la FORSU (10 g) en un intervalo entre 4 – 6 (Converti y col., 1989). Para ello, se realizó una prueba preliminar donde se ajustó el pH de la MSE de la FORSU utilizando hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) a diferentes concentraciones (0.5 – 5 % p/p).

La MSE de la FORSU pretratada termoquímicamente a una concentración del 1 % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  se le ajustó el pH con 1.5 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y a una concentración del 2 % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  con 2.5 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  por cada 100 g de sustrato. La MSE de la FORSU con un pH final de 5.82 (0 %), 5.95 (1 %) y 3.99 (2 %) pretratada termoquímicamente fue utilizada para la prueba preliminar de producción de etanol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

La levadura *S. cerevisiae* ITD00196 fue utilizada para la producción de etanol a partir de la MSE de la FORSU en CMS y se propagó utilizando la metodología presentada en la sección 6.6.

El BRT fue empacado con 100 g de la MSE de la FORSU pretratada termoquímicamente, sin y con ajuste de pH. La inoculación de la levadura *S. cerevisiae* ITD00196 fue al 10 %. Una vez inoculados y empacados los BRT fueron incubados a 30 °C por 48 h sin aireación.

### **6.10. Producción de etanol a partir de la mezcla sólida estándar de la FORSU a escala laboratorio**

El CMS de la MSE de la FORSU se llevó a cabo en biorreactores tubulares (BRT), a escala laboratorio. El BRT fue empacado con 100 g de la MSE de la FORSU pretratada térmicamente a las condiciones de 2.2 kg/cm<sup>2</sup> - 12 min (FS=2.11; condiciones óptimas obtenidas del diseño factorial central compuesto) y termoquímicamente con ajuste de pH (sección 6.9) a las condiciones de 2.7 kg/cm<sup>2</sup> - 15 min (FS=2.35; condiciones experimentales donde se obtuvo la mayor liberación de carbohidratos) y a las concentraciones de 0, 1 y 2 % (p/p) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Todas las levaduras fueron utilizadas para la producción de etanol a partir de la MSE de la FORSU pretratada térmica y termoquímicamente con ajuste de pH; y fueron propagadas utilizando la metodología presentada en la sección 6.6.

Las levaduras se inocularon en una relación al 10 % para los cultivos axénicos y al 3.3 % para el cultivo mixto (*Saccharomyces cerevisiae* ITD00196, *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785 y *Schwanniomyces occidentalis* CBS2863). Una vez inoculados y empacados los BRT fueron incubados a 30 °C por 30 h sin aireación. En todos los casos, se tomaron muestras a tiempo inicial y final del proceso para estimar el consumo de los carbohidratos fermentables y la producción de etanol.

Para obtener la cinética de producción de etanol y el consumo de los carbohidratos fermentables, se inocularon varios BRT con el cultivo mixto a condiciones asépticas y se tomaron muestras en intervalos regulares de tiempo durante 30 h.

### **6.11. Producción de etanol a partir de la mezcla sólida estándar de la FORSU a escala piloto**

El inóculo para la fermentación de la MSE de la FORSU en CMS a escala piloto se produjo en dos etapas. En la primera etapa, se propagaron las levaduras en matraces Erlenmeyer de 250 mL



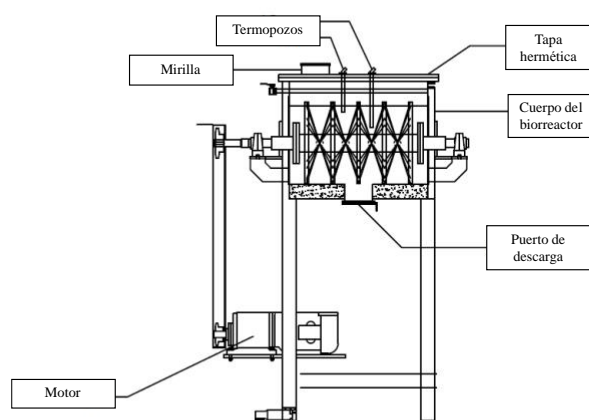
## MATERIALES Y MÉTODOS

(matraces bafleados para *S. cerevisiae* ITD00196, *S. stipitis* ATCC58785 y matraz convencional para *Schw. occidentalis* CBS2863) con 50 mL de medio de cultivo (volumen de llenado del 20 %), usando el medio presentado en la sección 6.6.

En la segunda etapa, una vez crecidas las levaduras, se propagaron en matraces de 500, 1000 y 2000 mL con 100, 200 y 400 mL (volumen de llenado del 20 %) de medio de cultivo, respectivamente (matraces bafleados para *S. cerevisiae* ITD00196, *S. stipitis* ATCC58785 y matraz convencional para *Schw. occidentalis* CBS2863). La inoculación de las levaduras se llevó a cabo usando cultivos axénicos para el biorreactor con tornillo sin fin (*S. cerevisiae* ITD00196) en una relación al 10 % y el cultivo mixto para el biorreactor de listones helicoidales una relación del 3.3 %.

### 6.11.1. Biorreactor listones helicoidales

La fermentación de la MSE de la FORSU se llevó a cabo en un biorreactor agitado con listones helicoidales por CMS. En la Figura 6.2. se presenta el esquema del biorreactor, que esta formado por un tanque de acero inoxidable (Patente MX/E/2016/009654) con fondo semicircular de 75.5 x 32.0 x 38.0 cm. El volumen útil del tanque es de 83.5 L y puede contener una carga máxima de 42 kg de FORSU, considerando una densidad es de 0.5 kg/m<sup>3</sup>.



**Figura 6.2.** Esquema del biorreactor escala piloto (LH) para la fermentación en cultivo en medio sólido. Vista lateral del biorreactor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

El biorreactor está equipado con una chaqueta y puertos para la inoculación, descarga de material y toma de muestra. Cuenta con un sistema de mezclado que consiste en un eje horizontal unido a un par de listones helicoidales (LH) concéntricos, que cubren toda la longitud del tanque.

Cada listón da una vuelta completa con un ángulo de inclinación de 72° para el listón externo y de 56° para el listón interno. En la Figura 6.3 se puede observar una vista lateral del biorreactor donde se pueden ver algunos de los componentes descritos en la Figura 6.2.

El biorreactor fue cargado aproximadamente con 18 kg de la MSE de la FORSU sin pretratamiento o con pretratamiento térmico con un FS de 2.35. Al utilizar la MSE de la FORSU con pretratamiento térmico, el biorreactor fue esterilizado a 92 °C, utilizando vapor directo suministrado por una caldera (Clayton EG-33, México) durante 2 h a presión atmosférica.



**Figura 6.3.** Biorreactor escala piloto (LH) para la fermentación en cultivo en medio sólido. A) Vista lateral del biorreactor y B) Vista superior del biorreactor.

La inoculación del cultivo mixto (*S. cerevisiae* ITD00196, *S. stipitis* ATCC58785 y *Schw. occidentalis* CBS2863) se llevó a cabo al 10 % en la MSE de la FORSU bajo condiciones asépticas (2 L). La temperatura de la chaqueta se mantuvo a 30 °C recirculando agua destilada a temperatura controlada por la chaqueta del biorreactor por 30 h. Las condiciones de agitación intermitente fueron 1 rpm cada 15 min.

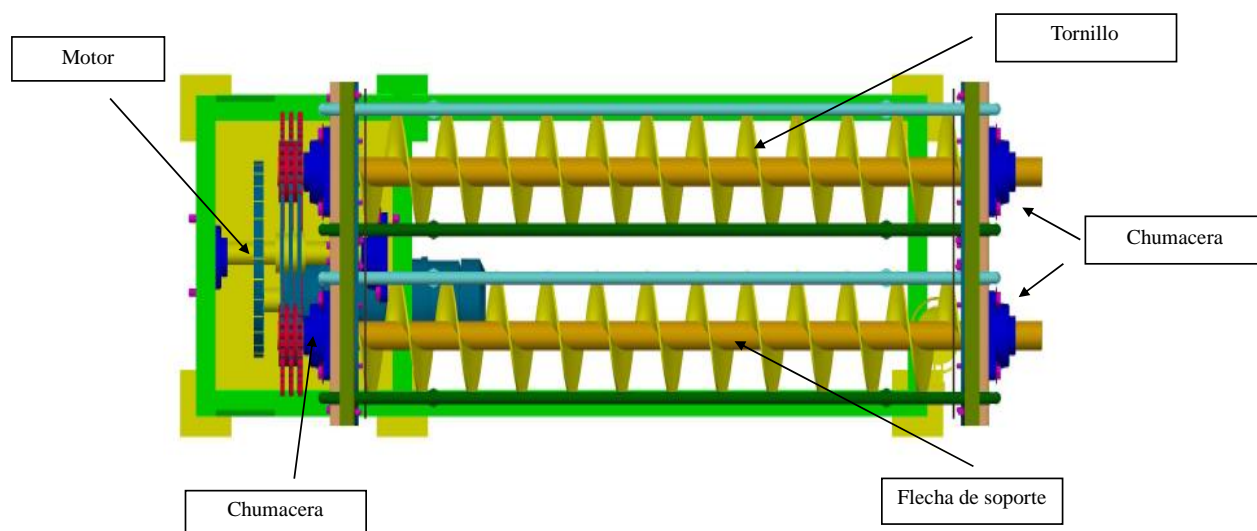
La atmósfera gaseosa del espacio de cabeza del biorreactor se recirculó a 500 mL/min, el etanol en la fase gaseosa se condensó. Posteriormente el avance del proceso fue monitoreado a través de la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (%), en la atmósfera gaseosa proveniente del biorreactor.

Para obtener la cinética de la producción de etanol y el consumo de los carbohidratos fermentables, simultáneamente al biorreactor de listones helicoidales, se inocularon varios BRT con el cultivo mixto bajo condiciones asépticas y se tomaron muestras en intervalos regulares de tiempo durante 30 h.

### 6.11.2. Biorreactor con tornillo sin fin

La producción de etanol a partir de la MSE de la FORSU también se llevó a cabo en un biorreactor de CMS agitado por un tornillo sin fin que se muestra en el esquema de la Figura 6.4.

El biorreactor está construido de acero inoxidable (Tipo 304) con acabado industrial, con una capacidad de 150 L y con una capacidad de hasta 75 kg de la MSE de la FORSU, considerando un material con una densidad de  $0.5 \text{ g/cm}^3$ .



**Figura 6.4.** Esquema del biorreactor escala piloto (TSF) para la fermentación en cultivo en medio sólido. Vista superior del biorreactor de tornillos sin fin.

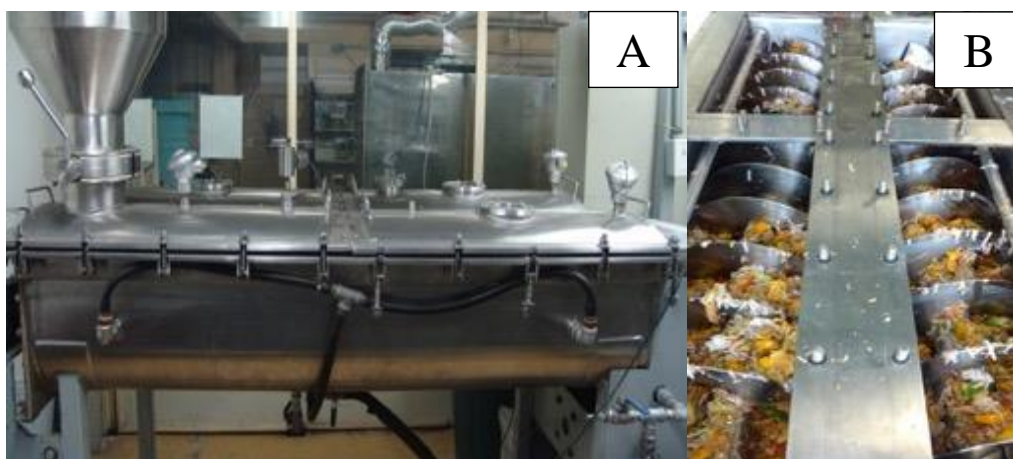
El cuerpo del biorreactor está compuesto de dos artesas (tipo media caña tubular) encaquetadas, de 24 cm de diámetro interno, 30 cm de altura y 1.5 m de longitud, cada una de ellas tiene un agitador tipo tornillo sin fin (TSF). Las dimensiones totales del biorreactor son de 180 cm de largo, 195 cm de alto y 80 cm de ancho y las dimensiones del TSF son de 153 cm de largo, 25 cm de alto, 23 cm de ancho y la hélice de 10 cm de radio. Las artesas están comunicadas en los extremos para permitir la circulación de los sustratos de forma continua.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

El equipo cuenta con entrada de aire seco/húmedo a través de un distribuidor ubicado en la parte superior del equipo; la alimentación y la descarga de sólidos están ubicadas en artesas diferentes en un extremo del equipo. La dinámica de mezclado de sólidos es de un comportamiento de flujo pistón ideal en la dirección axial de las artesas y un retromezclado importante en la comunicación entre las artesas. La velocidad máxima del TSF es de 2.75 rpm.

En estas condiciones se requieren 8 min aproximadamente para que los sólidos recorran un ciclo completo alrededor del equipo. El equipo dispone de un sistema de control que permite establecer la velocidad y el sentido de giro, mezclado continuo o intermitente, así como definir el tiempo de reposo.



**Figura 6.5.** Biorreactor de tornillo sin fin a escala piloto (TSF) para la producción en cultivo en medio sólido de etanol. A) Vista lateral del biorreactor y B) Vista superior de los tornillos sin fin.

En la Figura 6.5A se presenta una vista lateral del biorreactor donde se puede observar las mirillas, los puertos de detección de temperatura y la zona de carga, distribuidos en las 4 tapas del biorreactor. En la Figura 6.5B, se observa la distribución de la MSE de la FORSU, a lo largo del equipo.

En el proceso de fermentación, el biorreactor fue cargado aproximadamente con 25 kg de la MSE de la FORSU sin pretratamiento. El biorreactor no fue esterilizado. La inoculación del cultivo axénico (*S. cerevisiae* ITD00196) se llevó a cabo al 10 % en la MSE de la FORSU (2.5 L).

Una vez cargado el biorreactor e inoculado, la temperatura de incubación se mantuvo a 30 °C, recirculando agua destilada a temperatura controlada por la chaqueta del biorreactor por 30 h.

Las condiciones de agitación fueron 1 rpm de forma continua en sentido reverso y se recirculó la atmósfera gaseosa del espacio de cabeza del biorreactor a 500 mL/min para condensar el etanol y analizar la composición (%) de gases (CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) en la fase gaseosa.

En todos los CMS, se tomaron muestras a intervalos regulares de tiempo para estimar el consumo de los carbohidratos fermentables y la producción de etanol. Al utilizar el biorreactor con LH las muestras fueron tomadas de columnas crecidas junto al mismo tiempo. Sin embargo, al utilizar el biorreactor con TSF las muestras fueron tomadas directamente del equipo abriendo un compartimiento de en la parte superior de la tapa. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis por HPLC. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

### 6.11.3. Consideraciones matemáticas usadas en la producción de etanol a partir de la mezcla sólida estándar de la FORSU a escala laboratorio y piloto

Durante la producción de etanol y el consumo de los carbohidratos fermentables, el avance del proceso fue monitoreado a través de la variación del porcentaje volumétrico de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en el espacio de cabeza de los diferentes biorreactores utilizados; la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se expresó utilizando una media móvil simple (MMS) de 5 puntos con la siguiente ecuación:

$$MMS = \frac{\sum_{i=1}^n D_i}{n} \quad (\text{Ec. 6.12})$$

Donde  $n$  es la respuesta en los periodos en la media móvil y  $D_i$  es la respuesta en periodos en  $i$ .

Para el modelamiento del consumo de los carbohidratos fermentables se utilizó una ecuación de decaimiento de primer orden (Levenspiel, O. 1999), como se muestra en la siguiente ecuación:

$$-\frac{dCF}{dt} = k_{CF} CF \quad (\text{Ec. 6.13})$$

De la integración de la Ec. 6.13, se obtiene:

$$CF = CF_0 \exp(-k_{CF} t) \quad (\text{Ec. 6.14})$$

Donde  $CF$  es la concentración de carbohidratos fermentables (g/kg MS) en función del tiempo,  $CF_0$  (g/kg MS) se refiere a la concentración de carbohidratos fermentables iniciales y  $k_{CF}$  es la constante de primer orden (h<sup>-1</sup>).

La Ecuación de Gompertz fue usada para modelar la producción de etanol ( $P$ ) (Martínez-Valdez y col., 2015):

$$\frac{dP}{dt} = k_p \cdot P \ln\left(\frac{P_{max}}{P}\right) \quad (\text{Ec. 6.15})$$

En la integración de la Ec. 6.15, se obtiene:

$$P = P_{max} \exp(-b \exp(-k_p t)) \quad (\text{Ec. 6.16})$$

Donde, si  $t=0$ ,  $P = P_{(0)} = P_{max} \exp(-b)$ ; y  $b$  se refiere a un parámetro de integración sin interpretación biológica.

### 6.12. Muestreo y tratamiento de muestras

En los cultivos destinados a la producción de inóculos se tomaron muestras (4 mL) a diferentes tiempos, un mL se utilizó para la determinación de crecimiento microbiano por cuenta directa al microscopio en cámara de Neubauer (40X) y el resto se centrifugó a 5 300 rpm y 4 °C; el pellet obtenido se utilizó para determinar la biomasa por peso seco y el sobrenadante se almacenó a -20 °C para su posterior análisis de consumo de carbohidratos y producción de etanol por HPLC.

#### 6.12.1. Determinación de los carbohidratos estructurales y caracterización química de la mezcla sólida estándar de la FORSU

Los carbohidratos estructurales (Sluiter y col., 2011) y los sólidos totales en la biomasa (Sluiter y col., 2008) se determinaron de acuerdo con el método estándar recomendado por el Laboratorio Nacional de Energía renovable (NREL) de los Estados Unidos.

El análisis elemental de carbono (C), hidrógeno (H) y nitrógeno (N), se realizó con un analizador elemental (PerkinElmer 2400 Serie II CHNS/O analyser, USA). El contenido de cenizas se determinó por gravimetría después de la combustión de la muestra a 750 °C durante 3 h.

#### 6.12.2. Extracción de carbohidratos fermentables, inhibidores y etanol a partir de la mezcla sólida estándar de la FORSU

Se realizó la extracción acuosa de diferentes muestras sólidas obtenidas de la MSE de la FORSU antes y después de cada pretratamiento térmico, así como de las fermentaciones a escala laboratorio y piloto (antes y después de 30 h de incubación) para la determinación de los carbohidratos fermentables, inhibidores y la producción de etanol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

Se utilizaron 10 g de muestra para determinar la humedad por gravimetría (Bradley, 2010). Para la extracción se utilizaron 10 g de muestra que se colocaron en un matraz Erlenmeyer bafleado de 250 mL, se adicionaron 40 g de agua destilada y se agitó en un agitador orbital (DLAB SK-0330-Pro) a 300 rpm durante 15 min, a temperatura ambiente. Los sólidos se separaron del sobrenadante por centrifugación a 3 500 rpm a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se conservó a -4 °C para su posterior análisis. El pH se determinó en el sobrenadante utilizando un potenciómetro previamente calibrado (Conductronic, modelo pH 120).

### 6.13. Métodos analíticos

#### 6.13.1. Determinación del crecimiento microbiano en CMS a escala laboratorio y piloto en la fermentación de la FORSU

El crecimiento del cultivo mixto a escala laboratorio y piloto se determinó indirectamente a través del monitoreo de la producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub>. La producción de CO<sub>2</sub> y el consumo de O<sub>2</sub> fueron determinados a través de la medición periódica de estos gases en la atmósfera gaseosa proveniente de las columnas o del biorreactor (Saucedo-Castañeda y col., 1994). La medición se obtuvo utilizando un cromatógrafo de gases GOWMAC 580 equipado con un detector de conductividad térmica (Gow-mac Instrumentation Co., EUA) y una columna empacada CTR1 de Alltech, la cual se mantuvo a 80 °C. La temperatura del inyector, la temperatura del detector y la corriente del detector se mantuvieron a 80 °C, 110 °C y 125 mA, respectivamente. El flujo del gas acarreador (helio) se mantuvo a 30 mL/min.

#### 6.13.2. Análisis por HPLC

Las concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa, etanol y ácido acético se determinaron mediante un equipo de HPLC Shimadzu Promenence (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) equipado con una bomba LC-20, un desgasificador DGU-20AS, un automuestreador HT SIL-20A, un detector de índice de refracción RID-20A. El furfural (275 nm) y el HMF (284 nm) fueron determinados utilizando un detector de arreglo de diodos SPD-M20A. La separación se llevó a cabo usando las columnas Aminex HPX-87H, para la determinación de carbohidratos fermentables e inhibidores y Aminex HPX-87P (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), para la determinación de carbohidratos estructurales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

Para la columna Aminex HPX-87H se utilizó como fase móvil una solución acuosa de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM. El flujo de la fase móvil y la temperatura de operación usada fue de 0.6 mL/min y 60 °C, respectivamente. Para la columna Aminex HPX-87P se utilizó agua destilada como fase móvil con un flujo y una temperatura de operación usada fueron de 0.6 mL/min y 80 °C, respectivamente. Los compuestos se cuantificaron basándose en los tiempos de retención y las áreas obtenidas de soluciones estándar (Anexo C). Los resultados fueron expresados en g/kg MS.

### 6.14. Análisis estadístico

Todas las extracciones y los análisis se llevaron a cabo por duplicado y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. El método de Tukey HSD fue usado para comparar las medias y mostrar una diferencia significativa entre las muestras ( $p < 0.05$ ). Para el análisis estadístico del diseño factorial central compuesto se utilizó el software estadístico Statgraphics Centurion XV.I (Statpoint, Inc.). Se graficó utilizando Microsoft® Office Excel las curvas de producción de biomasa, etanol y consumo de carbohidratos, así como los parámetros cinéticos. Por otro lado, las curvas de superficie y contornos se graficaron utilizando el programa SigmaPlot® 10.



***RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

La utilización de un nivel alto de inóculo y el pretratamiento del sustrato son factores importantes para aumentar la producción de etanol y la productividad a partir del uso de residuos agroindustriales mediante el CMS. Por lo anterior, en el Capítulo 7 se evaluaron diferentes diseños de matraz y volúmenes de llenado y su efecto en los parámetros cinéticos de crecimiento durante la etapa de producción de inóculos. En el Capítulo 8 se analizó el efecto Crabtree observado durante las cinéticas de producción de biomasa y los parámetros cinéticos de producción de etanol a partir del uso de glucosa. En el Capítulo 9 se determinó el efecto del diseño de matraz y volumen de llenado en los parámetros cinéticos en la producción de biomasa y etanol a partir del uso de xilosa como fuente de carbono, así como, el uso potencial de las levaduras para la producción de etanol a partir del uso de la MSE de la FORSU mediante el CMS. Posteriormente, en el Capítulo 10 se evaluó un pretratamiento térmico de bajo costo para hidrolizar carbohidratos poliméricos en monosacáridos y disacáridos para la producción de etanol. Por último, en el Capítulo 11 se evaluó el uso potencial de la MSE de la FORSU para la producción de etanol a escala laboratorio y piloto, mediante el CMS.

### **7. Evaluación del efecto del diseño de matraces Erlenmeyer y los niveles de llenado en la producción de biomasa**

En este Capítulo se presentan los resultados de la evaluación de tres diseños de matraz Erlenmeyer (convencional, con resorte y bafleado) y dos volúmenes de llenado (20 y 40 %) para la producción de biomasa de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ITD00196, *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería), *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785, *Scheffersomyces stipitis* Y-17104, *Schwanniomyces occidentalis* ATCC26077 y *Kluyveromyces marxianus* CBS6556, empleado glucosa como fuente de carbono.

Diversos parámetros cinéticos de crecimiento fueron calculados a partir de información de los cultivos. Los parámetros cinéticos analizados fueron la producción de biomasa máxima, ( $X_{max}$ ; g/L); la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ; h<sup>-1</sup>) que se obtuvo a partir del ajuste de los datos experimentales de la producción de biomasa con el modelo logístico; el rendimiento ( $Y_{x/s}'$ ; g/g) de la producción máxima de biomasa respecto al consumo de glucosa al tiempo en que se obtiene la mayor producción de etanol (entre 8 y 36 h) y el rendimiento ( $Y_{x/s}''$ ; g/g) de producción de biomasa obtenida respecto al consumo de glucosa al final del cultivo (48 h).

### 7.1. Producción de biomasa de levaduras a partir de glucosa como fuente de carbono

En la Figura 7.1 se observa que el efecto del diseño del matraz y del volumen de llenado sobre la producción de biomasa depende de la levadura estudiada.

La producción de biomasa fue considerablemente superior con un volumen de llenado del 20 % en comparación con lo obtenido al 40 % de llenado. Sin embargo, con las cepas *S. stipitis* ATCC58785, *S. stipitis* Y-17104 y *K. marxianus* CBS 6556 el perfil de crecimiento y la producción máxima de biomasa fue prácticamente independiente del volumen de llenado. Marín-Palacio y col. (2014) mencionan que se obtiene un mayor crecimiento con un menor volumen de llenado debido a una mayor transferencia de O<sub>2</sub> en matraces Erlenmeyer con variaciones en su diseño, como por ejemplo, los matraces con resorte y bafleados.

Los datos experimentales de formación de biomasa se ajustaron al modelo logístico (Mazaheri y col., 2013) con la finalidad de obtener parámetros cinéticos de crecimiento como la  $\mu$ .

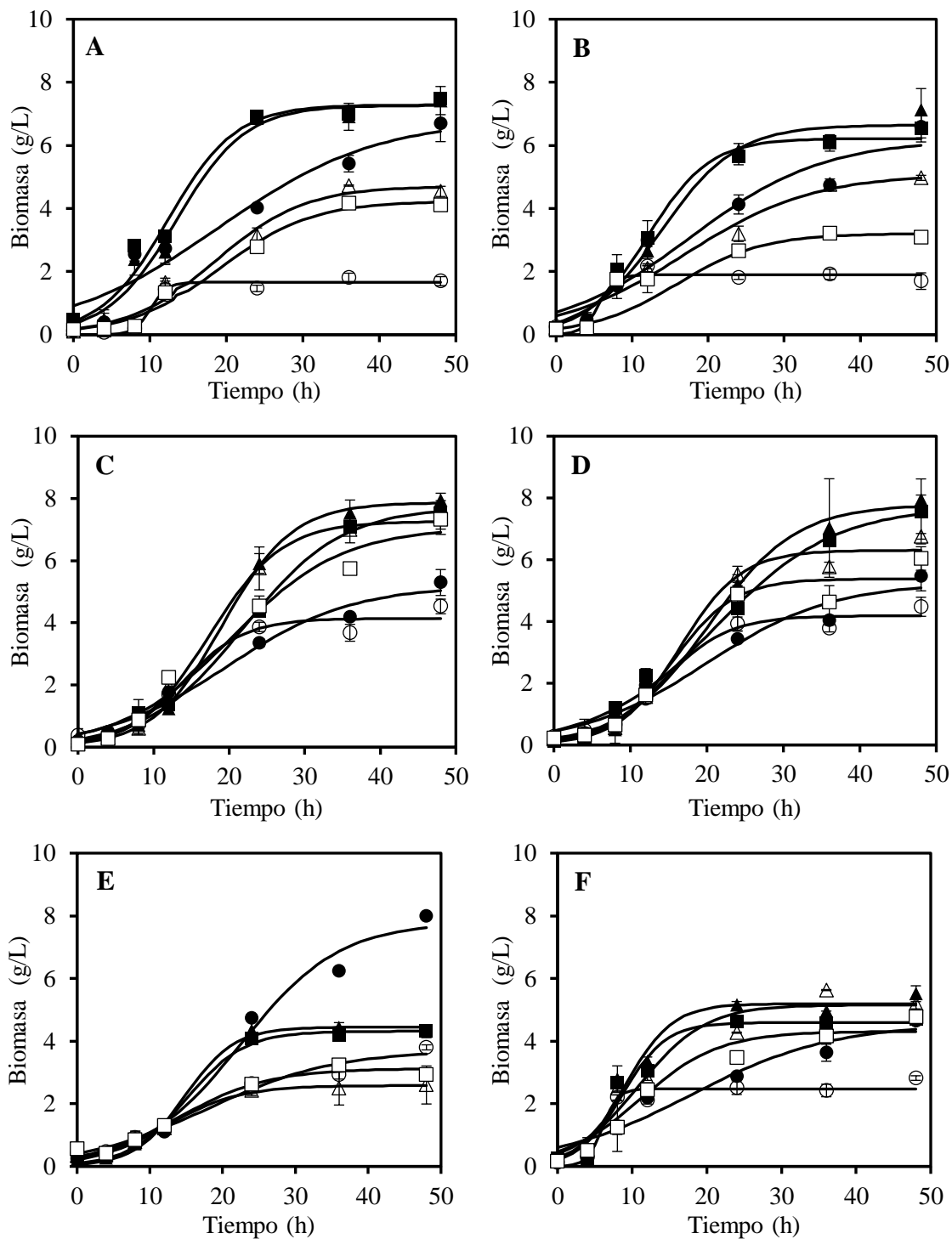
Los ajustes de los datos experimentales con los calculados, a partir del modelo logístico, presentaron coeficientes de determinación ( $R^2$ ) en el intervalo de 0.88 – 0.99.

En la producción de biomasa de *S. cerevisiae* ITD00196 no se observan diferencias estadísticamente significativas en su crecimiento al utilizar matraces bafleados ( $7.49 \pm 0.17$  g/L) y con resorte ( $7.42 \pm 0.45$  g/L); y con un volumen de llenado del 20 % (Figura 7.1A).

Se observa el mismo comportamiento con *S. cerevisiae* (levadura de panadería) donde el mayor crecimiento se obtiene al utilizar los matraces con resorte ( $7.13 \pm 0.67$  g/L) con un volumen de llenado al 20 % (Figura 7.1B).

Por otro lado, el mejor crecimiento de *S. stipitis* ATCC58785 (Figura 7.1C) y *S. stipitis* Y-17104 (Figura 7.D) se obtuvo con el uso de matraces bafleados y con resorte, empleando ambos volúmenes de llenado (20 y 40 %). La producción final de biomasa fue de  $7.95 \pm 0.22$  y  $7.90 \pm 0.10$  g/L, respectivamente, al utilizar matraces con resorte y con un volumen de llenado del 20 %. No se observó una diferencia estadísticamente significativa con el uso de matraces bafleados y en ambos volúmenes de llenado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 7.1.** Crecimiento de levaduras en los tres diseños de matraz con glucosa como fuente carbonó: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. La línea continua corresponde a la simulación del modelo logístico del crecimiento de las levaduras: **A)** *S. cerevisiae* ITD00196; **B)** *S. cerevisiae* (levadura de panadería); **C)** *S. stipitis* ATCC58785; **D)** *S. stipitis* Y-17104; **E)** *Schw. occidentalis* ATCC26077; y **F)** *K. marxianus* CBS6556.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Con *Schw. occidentalis* ATCC26077 se obtiene un mayor crecimiento utilizando matraces Erlenmeyer convencionales con un volumen de llenado del 20 %. Con esta levadura, se obtuvo el mayor crecimiento ( $8.00\pm 0.04$  g/L) comparada con el resto de las levaduras estudiadas (Figura 7.1E).

En caso de *K. marxianus* CBS6556 se obtuvieron los crecimientos más bajos, comparados con el resto de las levaduras. Sin embargo, la producción de biomasa máxima se obtuvo al utilizar matraces con resorte con un volumen de llenado del 20 % ( $5.51\pm 0.25$  g/L), condiciones similares a lo obtenido con *S. cerevisiae* ITD00196 y *S. cerevisiae* (levadura de panadería) (Figura 7.1F).

Marín-Palacio y col. (2014) reportaron que el diseño de los matraces puede afectar el crecimiento, la morfología y la producción de metabolitos en el cultivo de la bacteria *S. lividans*; donde obtuvieron un mejor resultado cuando se utilizaron matraces bafleados y con resorte, y con un volumen de llenado del 20 %, como en el presente estudio.

Con un volumen de llenado del 20 %, la producción máxima de biomasa se obtuvo con *S. cerevisiae* ITD00196 y *S. cerevisiae* (levadura de panadería), de manera casi independiente del diseño del matraz. Sin embargo, con las levaduras *K. marxianus* CBS6556 y *Schw. occidentalis* ATCC26077 se presentó la producción de biomasa más baja y más alta, respectivamente, utilizando diseños de matraces convencionales. Por el contrario, con un volumen de llenado del 40 %, en general se observa una producción de biomasa menor donde los resultados más bajos se obtuvieron con un diseño de matraz convencional. Sin embargo, con las cepas *S. stipitis* ATCC58785, *S. stipitis* Y-17104 y *K. marxianus* CBS 6556 la producción de biomasa fue similar usando ambos volúmenes de llenado.

En el caso de *S. cerevisiae* ITD00196, *S. cerevisiae* (levadura de panadería), *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104, el uso de matraces convencionales conduce a obtener bajas concentraciones de biomasa. Estos resultados pueden explicarse porque las modificaciones en el diseño del matraz, por ejemplo, con resorte o con baffles, aumenta la transferencia de O<sub>2</sub>, ya que la hidrodinámica mejora el contacto entre la interfase gas-líquido. Empleando matraces Erlenmeyer convencionales, la superficie de contacto entre el aire y la película formada por el medio líquido en el matraz es más pequeña (Reynoso-Cereceda y col., 2016). A partir del ajuste del modelo logístico con los datos experimentales se obtuvieron diversos parámetros cinéticos que se discuten a continuación.

### 7.2. Parámetros cinéticos de crecimiento

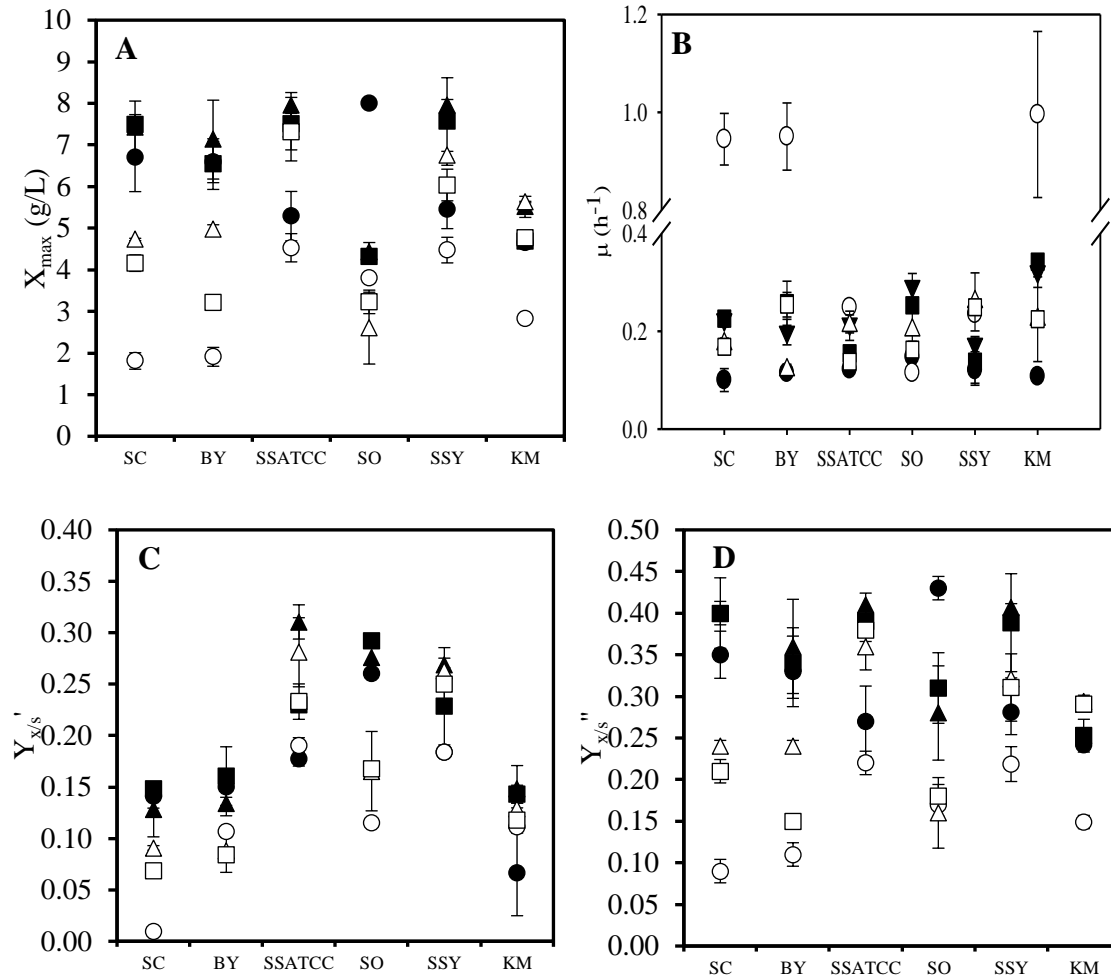
En la Figura 7.2 se presentan los parámetros cinéticos de crecimiento de todas las levaduras estudiadas  $X_{max}$ ,  $\mu$ ,  $Y_{x/s}'$  y  $Y_{x/s}''$  para los tres diseños de matraz Erlenmeyer (matraz convencional, con resorte y bafleado), dos volúmenes de llenado (20 y 40 %), empleando glucosa como fuente de carbono.

Se observa que independientemente del diseño de matraz y del tipo de levadura, el valor de  $X_{max}$  fue superior en un volumen de llenado de 20 % comparado al volumen de llenado del 40 %, con excepción de la levadura *K. marxianus* CBS6556 donde se observó un comportamiento similar al utilizar matraces con resorte y bafleado a los dos volúmenes de llenado (Figura 7.2A).

En general se observa que las mejores condiciones para el crecimiento de *S. cerevisiae* ITD00196, *S. cerevisiae* (levadura de panadería), *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 se obtienen al utilizar matraces bafleados o con resorte con un volumen de llenado del 20 %. Estas mismas condiciones podrían aplicarse para *K. marxianus* CBS6556, sin embargo, se obtuvieron rendimientos bajos en la formación de biomasa en todas las condiciones ensayadas. Por otro lado, para *Schw. occidentalis* ATCC26077 el uso de matraces convencionales fue lo adecuado para la obtención de la mayor concentración de biomasa, con un volumen de llenado del 20 %.

Se destacan las  $\mu$  obtenidas para *S. cerevisiae* ITD00196 ( $0.95 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$ ), *S. cerevisiae* (levadura de panadería) ( $0.95 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ ) y *K. marxianus* CBS6556 ( $1.00 \pm 0.17 \text{ h}^{-1}$ ), ya que fueron los valores más altos obtenidos con matraces convencionales y volúmenes de llenado del 40 % (Figura 9.1B). Posiblemente esto es debido a que observó un crecimiento rápido y poca concentración biomasa. Estos valores elevados de  $\mu$  corresponden a valores no típicos de tiempos de duplicación para levaduras, donde se ha reportado tiempos de duplicación cercanos a 1.5 h (Salari y Salari, 2017). Esto puede ser derivado del ajuste del modelo logístico para datos experimentales que muestran un crecimiento muy bajo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 7.2.** Parámetros de cinéticos de cultivo y coeficientes de rendimientos obtenidos durante el cultivo de todas las levaduras usando diferentes diseños de matraz: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. *S. cerevisiae* ITD00196 (SC); *S. cerevisiae* (levadura de panadería) (BY); *S. stipitis* ATCC58785 (SSATCC); *Schw. occidentalis* ATCC26077 (SO); *S. stipitis* Y-17104 (SSY); *K. marxianus* CBS6556 (KM).

En general, se obtienen valores de  $\mu$  típicos para el crecimiento de levaduras, donde los valores más altos se obtuvieron con los matraces con resorte ( $0.20 \pm 0.03 - 0.32 \pm 0.03 h^{-1}$ ) y bafleados ( $0.16 \pm 0.01 - 0.34 \pm 0.00 h^{-1}$ ) con un volumen de llenado del 20 %. En el caso de *S. stipitis* Y-17104, las  $\mu$  más altas se obtuvieron con matraces con resorte ( $0.26 \pm 0.06 h^{-1}$ ) y bafleados ( $0.25 \pm 0.01 h^{-1}$ ), pero con un volumen de llenado del 40 %, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 9.1B). Estos valores de  $\mu$  corresponden a valores típicos de tiempos de duplicación para levaduras que varían de 3.4 a 2.2 h (Alberts y Larsson, 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En el caso del rendimiento  $Y_{x/s}$ ' se observa que con un volumen de llenado del 20 %, se obtienen los más altos resultados con los tres diseños de matraz para las levaduras *S. cerevisiae* ITD00196, *S. cerevisiae* (levadura de panadería) y *Schw. occidentalis* ATCC26077, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tipo de matraz, para cada una de las levaduras mencionadas (Figura 9.1C).

En el caso de la levadura *K. marxianus* CBS6556, no se observó una diferencia estadísticamente significativa empleando matraces con resorte y bafleados con un volumen de llenado del 20 %. Sin embargo, con *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104, no se observó una diferencia estadísticamente significativa empleando matraces con resorte para los volúmenes de llenado del 20 y 40 %. Este rendimiento ( $Y_{x/s}$ ') se calculó en el momento del cultivo en donde se alcanzó el máximo consumo de glucosa, por lo que los tiempos variaron entre las 8 y 36 h (Anexo D).

Los rendimientos  $Y_{x/s}$  típicos fermentativos son cercanos a 0.1 (Zhang y col., 2019) mientras que los rendimientos  $Y_{x/s}$  respiratorios son cercanos a 0.4, los rendimientos observados de las cepas de *S. cerevisiae* ITD00196 corresponden a rendimientos típicos fermentativos, mientras el de *Schw. occidentalis* ATCC26077 son más cercanos a los rendimientos típicos de metabolismo respiratorio; las primeras cepas se comportan como levaduras con efecto Crabtree positivo mientras la última es identificada como Crabtree negativo.

Se ha reportado en los cultivos de *Kluyveromyces lactis*, una levadura Crabtree negativa, la presencia de metabolismo fermentativo y respiratorio, siendo el metabolismo respiratorio el que predominó durante el cultivo a condiciones aerobias (González Siso y col., 1996). Este comportamiento se observa en tres levaduras *Schw. occidentalis* ATCC26077, *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104, sin embargo, solo se considera Crabtree negativa a la primera levadura debido a la baja producción de etanol. Las levaduras *S. stipitis*, se consideran con un efecto Crabtree intermedio debido a la presencia de un metabolismo mixto, en el cual, la producción de etanol es superior a lo obtenido con *Schw. occidentalis* ATCC26077.

El coeficiente de rendimiento  $Y_{x/s}$ ' permite determinar el tipo de metabolismo que presentan las levaduras y así, evaluar cuantitativamente el efecto Crabtree.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En el caso del  $Y_{x/s}$ " determinado al final del cultivo (48 h) se observa un rendimiento mayor al utilizar un volumen de llenado del 20 %, independientemente del tipo de matraz (Figura 9.1D), resultados similares a lo obtenido con el rendimiento  $Y_{x/s}'$ .

Los mayores rendimientos se obtienen con los tres diseños de matraz para *S. cerevisiae* ITD00196 y *S. cerevisiae* (levadura de panadería), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de matraces empleados. Destaca el rendimiento más alto de *Schw. occidentalis* ATCC26077 ( $0.43 \pm 0.01$ ) con un matraz convencional. Con *S. stipitis* ATCC58785, *S. stipitis* Y-17104 y *K. marxianus* CBS6556 se obtienen valores similares utilizando un diseño de matraz con resortes y bafleado con un volumen de llenado del 20 y 40 %, el rendimiento más bajo corresponde a *K. marxianus* CBS6556.

El rendimiento  $Y_{x/s}$ " considera la formación de biomasa final respecto el consumo de glucosa. Sin embargo, se pudo observar que algunas levaduras crecen usando el etanol como sustrato. Por lo tanto, el rendimiento  $Y_{x/p}$  fue calculado para considerar el crecimiento a partir del consumo del producto, este rendimiento se discutirá en la sección 8.2.

Se realizó el análisis estadístico de los parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos a partir de los datos experimentales y el ajuste del modelo logístico, el cual se discute a continuación.

### 7.3. Análisis estadístico de los parámetros cinéticos de crecimiento

En la Tabla 7.1 se muestra el efecto del diseño de matraz (Factor A) y el volumen de llenado (Factor B) y su interacción (Factor AB), en las variables de respuesta  $X_{max}$ ,  $\mu$ ,  $Y_{x/s}'$  (medido entre las 8 y 36 h) y  $Y_{x/s}$ " determinado al final del cultivo (48 h). En negritas se resaltan las variables de respuesta donde los factores no presentaron efectos significativos (Tabla 7.1).

El diseño de matraz (Factor A) tiene un efecto estadísticamente significativo en todas las variables medidas y en todas las levaduras estudiadas, excepto  $Y_{x/s}'$  para *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) y *K. marxianus* CBS6556. También para la  $\mu$  de *S. stipitis* Y-17104, el diseño de matraz no tuvo un efecto estadísticamente significativo.

El volumen de llenado (Factor B) tiene un efecto significativo en todas las variables medidas de las todas las cepas estudiadas, excepto para  $Y_{x/s}'$  de *S. stipitis* ATCC58785 y Y-17104.

La interacción de ambos factores (diseño de matraz y llenado), presenta múltiples situaciones que analizar; por ejemplo, el efecto no es significativo, en el caso de todas las variables

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de *S. stipitis* Y-17104; asimismo, la interacción de ambos factores no es significativa para  $Y_{x/s}'$  de todas las cepas excepto *S. cerevisiae* ITD00196, entre otros ejemplos que se pueden citar.

**Tabla 7.1.** Análisis estadístico donde se indica el efecto del diseño de matraz y del volumen de llenado sobre la  $X_{max}$ ,  $\mu$ ,  $Y_{x/s}'$  y  $Y_{x/s}''$  en los diferentes cultivos utilizados.

Levadura	Factor*	$X_{max}$	$\mu^{**}$	$Y_{x/s}'$	$Y_{x/s}''$
		g/L	h <sup>-1</sup>	g/g	g/g
		<i>valores-p***</i>			
<i>S. cerevisiae</i> ITD00196	A	0.0004	0.0000	0.0129	0.0003
	B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	AB	0.0070	0.0000	0.0051	0.0138
<i>S. cerevisiae</i> (Levadura de panadería)	A	0.0016	0.0000	<b>0.3311</b>	0.0100
	B	0.0000	0.0000	0.0007	0.0000
	AB	0.0125	0.0000	<b>0.2961</b>	<b>0.0705</b>
<i>S. stipitis</i> ATCC58785	A	0.0000	0.0032	0.0003	0.0001
	B	0.0400	0.0091	<b>0.6694</b>	0.0081
	AB	<b>0.4912</b>	0.0013	<b>0.2682</b>	<b>0.3805</b>
<i>Schw. occidentalis</i> ATCC26077	A	0.0000	0.0019	0.0306	0.0119
	B	0.0000	0.0029	0.0000	0.0000
	AB	0.0005	<b>0.2581</b>	<b>0.3323</b>	0.0098
<i>S. stipitis</i> Y-17104	A	0.0015	<b>0.3406</b>	0.0022	0.0049
	B	0.0060	0.0019	<b>0.6581</b>	0.0069
	AB	<b>0.7670</b>	<b>0.8188</b>	<b>0.5739</b>	<b>0.8805</b>
<i>K. marxianus</i> CBS6556	A	0.0000	0.0040	<b>0.0544</b>	0.0001
	B	0.0006	0.0027	0.0001	0.0029
	AB	0.0001	0.0002	<b>0.0583</b>	0.0021

\*Factor A: diseño de matraz y B: volumen de llenado.

\*\*Estimado con el modelo logístico.

\*\*\*Significante al 95 % nivel de confianza.

En negritas se resaltan los efectos que no son significativos.

En la concentración biomasa ( $X_{max}$ ) alcanzada al final del cultivo, tanto el diseño de matraz y como el volumen de llenado, así como su interacción tienen un efecto estadísticamente significativo en todas las levaduras, exceptuando la interacción de los factores en las dos levaduras de *S. stipitis* ATCC58785 y Y-17104. Los ANOVA obtenidos a partir del análisis estadístico para todas las variables de respuesta, se resumen en el Anexo E.

### 7.4. Conclusiones de la producción de inóculos

Con la finalidad de utilizar las levaduras como inóculo y obtener una producción elevada de biomasa, la mejor condición es utilizar un volumen de llenado del 20 %. Con respecto al diseño de matraz, en las levaduras *S. cerevisiae* ITD00196, *S. cerevisiae* (levadura de panadería) y *K. marxianus* CBS 6556 no se encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de matraces utilizados. En el caso de la levadura *Schw. occidentalis* ATCC26077, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar matraces convencionales.

Para el caso de *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104, no hay una diferencia significativa con volúmenes de llenado del 20 y 40 %, ni con el uso de matraces con resorte y bafleados.

Con un volumen de llenado del 40 %, y de forma general, se observa una producción de biomasa menor; los resultados más bajos se obtuvieron con uso del matraz convencional.

Utilizar diseños de matraz con resorte o bafleados con un volumen de llenado del 20 %, son las condiciones adecuadas para obtener los valores más altos de  $X_{max}$ ,  $\mu$ ,  $Y_{x/s}'$ .

Las mejores condiciones de producción de inóculo (biomasa) fueron con un volumen de llenado del 20 % y empleando matraces con resorte o bafleados para las levaduras *S. cerevisiae* ITD00196, *S. cerevisiae* (levadura de panadería), *K. marxianus* CBS 6556, *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104. Para *Schw. occidentalis* ATCC26077 el uso de matraces convencionales es lo adecuado para la obtención de la mayor concentración de biomasa.

### 8. Análisis del efecto Crabtree en el cultivo de levaduras

Simultáneamente a las cinéticas de crecimiento de las distintas levaduras estudiadas (Capítulo 7), se obtuvieron cinéticas de consumo de glucosa y de producción de etanol para cada volumen de llenado (20 y 40 %) y diseño de matraz (convencional, con resorte y bafleado).

A partir del análisis de las curvas (Anexo D), se observa una rápida tasa de consumo de la fuente de carbono, asociada a la formación de etanol en una etapa temprana del cultivo (8 y 36 h). A esta fase de metabolismo fermentativo (MF) le siguió una fase de metabolismo respiratorio (MR) con asimilación de etanol para convertirlo en biomasa.

Este fenómeno metabólico se denomina “Efecto Crabtree” o “Contra-Efecto Pasteur”, el cual es definido como la represión catabólica de las enzimas oxidativas por la concentración de los carbohidratos (Crabtree, 1929) y que ha sido muy documentado en cultivos de levaduras (Van Urk y col., 1989). En la actualidad, se define como la capacidad de las levaduras para producir etanol en condiciones aerobias, reduciendo la formación de biomasa (Pronk y col., 1996; Hagman y col., 2013).

A continuación y como ejemplo se presenta, el análisis del efecto Crabtree de *S. cerevisiae* ITD00196, que presenta principalmente un metabolismo fermentativo y *Schw. occidentalis* ATCC26077, que posee mayoritariamente un metabolismo respiratorio en condiciones aerobias.

A partir del análisis de las etapas de metabolismo fermentativo y respiratorio, se estimaron tres parámetros de los cultivos: **a)** la productividad de etanol (g/Lh), que corresponde a la producción máxima de etanol (entre las 8 y 36 h) dividida por el tiempo en el que se obtuvo; **b)** el rendimiento de la producción máxima de etanol (entre las 8 y 36 h) respecto al consumo máximo de glucosa, ( $Y_{p/s}$ ; g/g) y **c)** el rendimiento de formación de biomasa respecto al consumo de etanol ( $Y_{x/p}$ ; g/g), que se define como la diferencia entre la concentración biomasa al final del cultivo y biomasa al tiempo de la producción máxima de etanol (entre las 8 y 36 h) dividida por la diferencia de concentración máxima de etanol y el etanol al final del cultivo (48 h). Como se definió en la sección 6.5 de Materiales y Métodos. El análisis de los resultados se presenta a continuación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 8.1. Análisis del efecto Crabtree en las levaduras *S. cerevisiae* ITD00196 y *Schw. occidentalis* ATCC26077 en la producción de biomasa a partir de glucosa como fuente de carbono

En la Figura 8.1 se muestra un cultivo típico de la formación de biomasa, consumo de glucosa y producción de etanol durante el cultivo en medio líquido de *S. cerevisiae* ITD00196 y *Schw. occidentalis* ATCC26077, con dos volúmenes de llenado 20 % (Figura 8.1A y 8.1C) y 40 % (Figura 8.1B y 8.1D), empleando matraces bafleados.

En el caso de *S. cerevisiae* ITD00196, para ambos volúmenes de llenado (Figura 8.1A y 8.1B), el consumo total de la glucosa y la máxima producción de etanol se observa en una etapa temprana del cultivo, 8 h para volumen de llenado 20 % y 12 h para volumen de llenado 40 %.

Además, se observa que el etanol fue asimilado como fuente de carbono en etapas posteriores de cultivo. A este fenómeno, donde las levaduras producen etanol y biomasa en condiciones aerobias a gran velocidad, presentando metabolismo fermentativo y respiratorio, se le conoce como efecto Crabtree positivo (Postma y col., 1989; Hagman, A. y Piškur, J., 2015).

Este fenómeno se observa en la mayoría de las condiciones ensayadas (Anexo D). Debido a la rápida formación de etanol en las cepas Crabtree positivas, puede deducirse que estas levaduras poseen una gran cantidad de enzimas que forman parte de la ruta de glucólisis anaerobia, incluso en condiciones de limitación de sustrato y aerobias (Hagman, A. y Piškur, J., 2015).

Hickert y col. (2013) compararon la fermentación de hidrolizados de cáscara de arroz en condiciones aerobias y con limitaciones de O<sub>2</sub>. Los resultados de estos autores indicaron que el consumo de etanol se debió a que *S. cerevisiae* lo reasimiló en una fase de metabolismo respiratorio en presencia de O<sub>2</sub> e inhibidores. Estos resultados demuestran que es necesario controlar el proceso de producción de etanol para evitar la pérdida del producto por su asimilación para la formación de biomasa.

En la etapa de MF de *S. cerevisiae* ITD00196 con un volumen de llenado del 20 y 40 %, se observa un crecimiento bajo, mientras que el consumo de glucosa y producción de etanol fue muy rápido (Figuras 8.1A y 8.2B). Entre las 8 y 12 h se observa una fase diáuxica (Figura 8.1A), primero se presenta un crecimiento rápido que implica una fermentación aerobia intensa (MF) a partir del consumo de moléculas de seis átomos de carbono que reprimen la ruta respiratoria oxidativa y segundo, un posterior crecimiento lento (MR) que implica el crecimiento por oxidación de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

moléculas de dos átomos carbonos (etanol acumulado) en CO<sub>2</sub> (Legmoigne y col., 1954; Postma y col., 1989; Fiechter y Seghezzi, 1992).

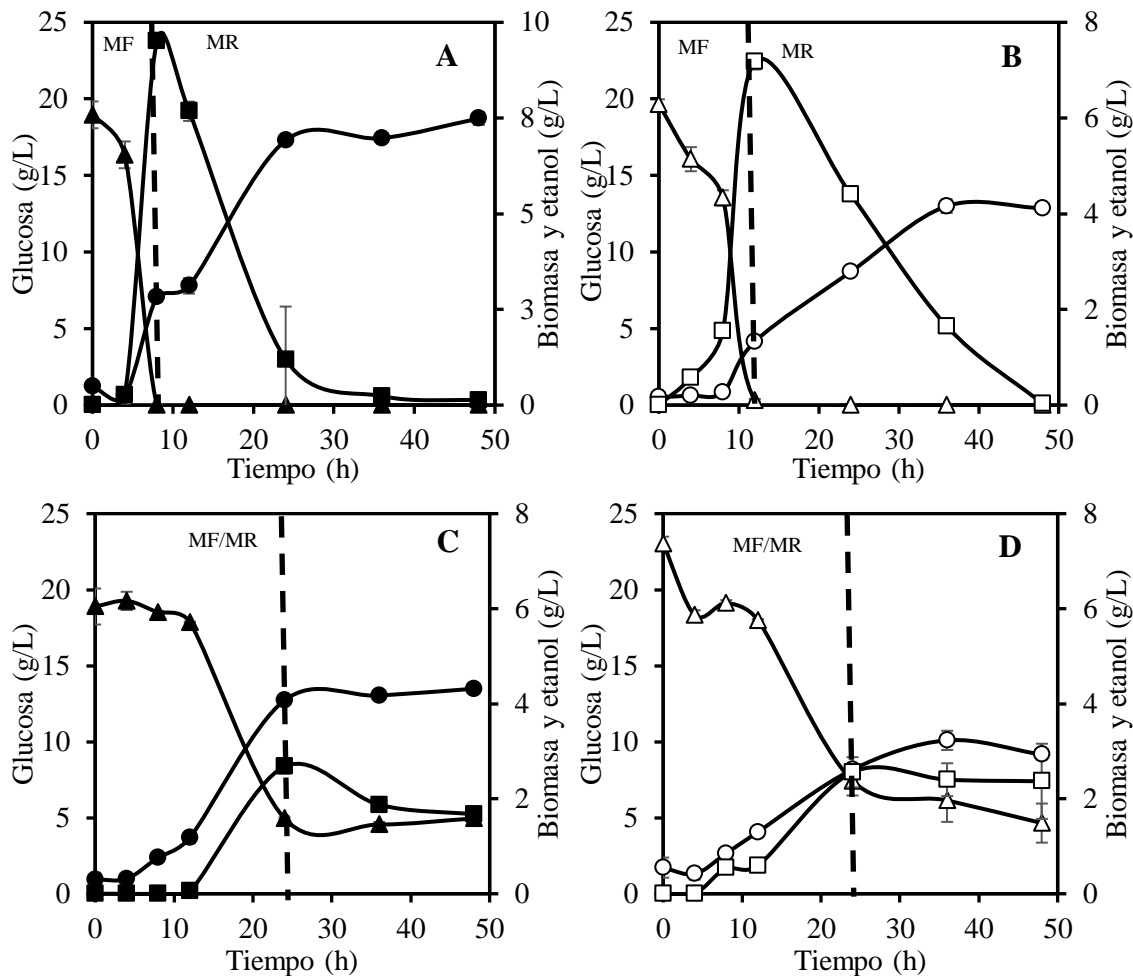
Por su parte, en las cinéticas obtenidas de *Schw. occidentalis* ATCC26077 con un volumen de llenado del 20 %, se observa que el consumo máximo de glucosa (14 g/L) se obtiene a las 24 h y luego su concentración se mantiene prácticamente constante hasta el final del cultivo (48 h) (Figura 8.1C). A las 24 h de cultivo, se alcanza la producción máxima de etanol, concentración que es inferior ( $2.68 \pm 0.15$  g/L) a lo observado con *S. cerevisiae* ITD00196 ( $9.51 \pm 0.07$  g/L) a las 8h de cultivo. Sin embargo, cerca del 60 % del etanol es utilizado para el crecimiento y mantenimiento celular.

Cabe señalar que todos los cultivos se realizaron a una concentración de glucosa relativamente baja (20 g/L). De Deken (1966) indicó que la presencia del metabolismo respiratorio después del metabolismo fermentativo se debe a la compensación de energía necesaria para el crecimiento celular. Esto es debido a que en el metabolismo fermentativo solo se producen 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa y en el metabolismo respiratorio se producen 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa, las cuales sirven como almacén de energía para que el metabolismo celular se lleve a cabo. En el crecimiento de la levadura *Schw. occidentalis* ATCC26077 con un volumen de llenado del 40 % (Figura 8.1D), se observa el consumo máximo de glucosa hasta las 48 h (15 g/L).

Sin embargo, la concentración máxima de biomasa se alcanza a las 36 h y la de etanol a las 24 h, las cuales se mantuvieron con poco cambio el resto de la fermentación. En la zona MF/MR, se pudo observar un metabolismo mixto, donde la levadura crece y fermenta a la misma velocidad. Este fenómeno donde se observa una mayor producción de biomasa y una baja producción de etanol de *Schw. occidentalis* ATCC26077 se observa también en los diferentes diseños de matraz y en ambos volúmenes de llenado (Anexo D).

Por lo anterior, la levadura *Schw. occidentalis* ATCC26077 es considerada como Crabtree negativa, debido a la baja producción de etanol, es decir, la glucosa fue oxidada en lugar de ser fermentada (Rodicio y Heinisch, 2009). La baja concentración de biomasa puede explicarse por una baja actividad de la enzima acetil-CoA sintetasa, enzima responsable de la oxidación completa del piruvato en el ciclo de Krebs (Pronk et al 1996), por lo que la acumulación piruvato desvió la ruta hacia la producción parcial de etanol (Figura 8.1D).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 8.1.** Evolución de la concentración de biomasa (●, ○), glucosa (▲, △) y etanol (■, □) con las levaduras *S. cerevisiae* ITD00196 (A y B) y *Schw. occidentalis* ATCC26077 (C y D) durante su cultivo en medio líquido en un matraz bafleado. Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. MF: Metabolismo fermentativo y MR: Metabolismo respiratorio.

Alexander y Jeffries, (1990) mencionan que en las levaduras Crabtree negativas (por ejemplo, *Candida shehatae*) el metabolismo fermentativo no se presenta durante el crecimiento celular en condiciones aerobias. Sin embargo, González Siso y col. (1996) mencionan que durante el crecimiento de *Kluyveromyces lactis*, una levadura Crabtree negativa, observaron la coexistencia del metabolismo fermentativo y respiratorio a condiciones aerobias, siendo el metabolismo respiratorio el que predominó durante el cultivo; comportamiento que es similar a lo observado en la levadura *Schw. occidentalis* ATCC26077.

Diversos parámetros cinéticos fueron calculados a partir de los datos experimentales obtenidos de la producción de etanol y su consumo para el crecimiento de todas las levaduras

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

estudiadas, en todos los diseños de matraz y en ambos volúmenes de llenado. A continuación, los parámetros cinéticos estimados son analizados estadísticamente.

### 8.2. Parámetros cinéticos derivados de la producción de etanol y su consumo para el crecimiento celular

En la Figura 8.2 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos de la producción de etanol (productividad de etanol,  $Y_{p/s}$  y  $Y_{x/p}$ ) en los tres diseños de matraz Erlenmeyer (convencional, con resorte y bafleado) y dos volúmenes de llenado (20 y 40 %) en las cinéticas de cultivo de todas las levaduras estudiadas, empleando glucosa como fuente de carbono. La productividad de etanol fue calculada al tiempo en que se obtuvo la máxima producción de etanol, para cada una de las levaduras.

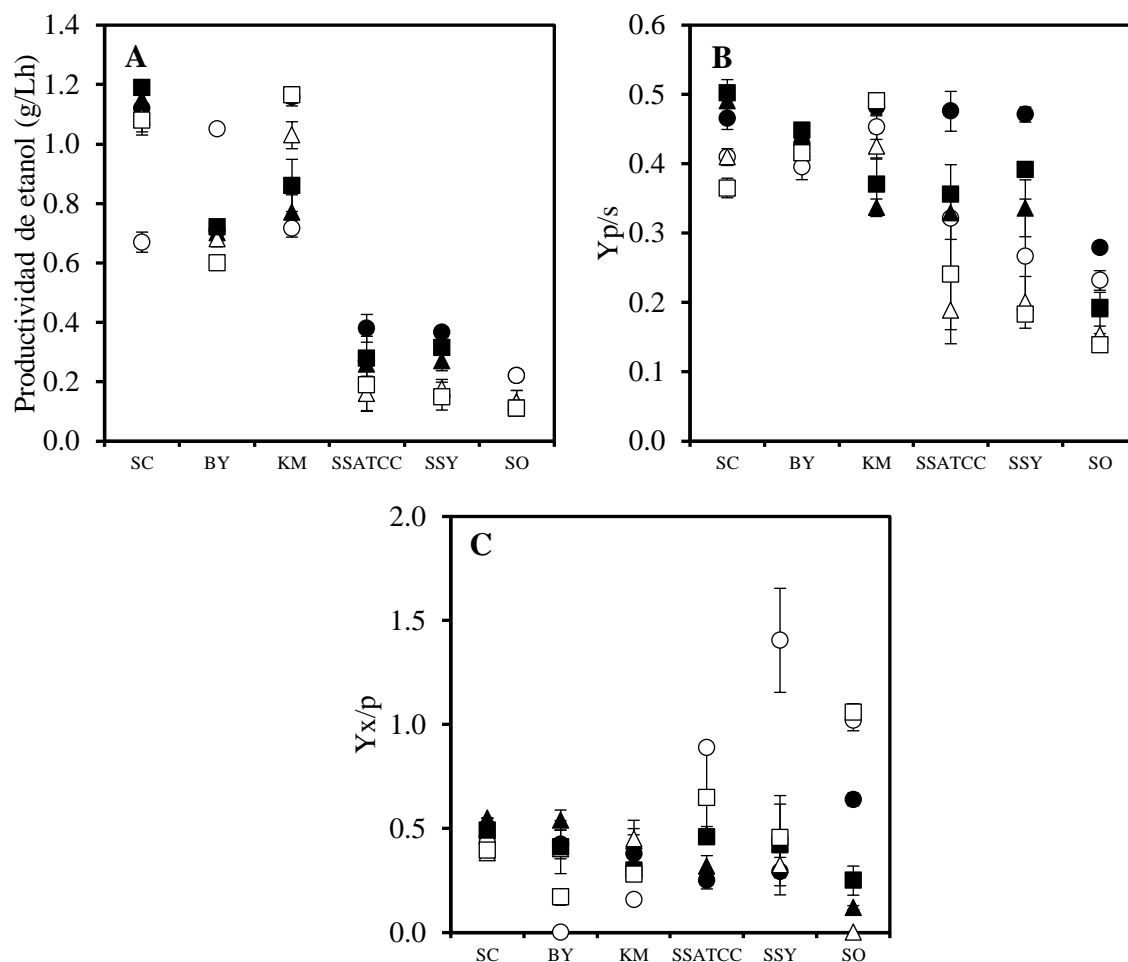
En lo general, se observa que la cepas reconocidas como Crabtree positivas (*S. cerevisiae*) presentan una productividad de etanol mayor mientras, que la reconocida como Crabtree negativa (*Schw. occidentalis* ATCC26077) presenta los valores menores de este parámetro. Hay cepas que tienen un metabolismo mixto y presenta valores de productividad intermedios (las dos cepas de *S. stipitis*). Estas características pueden ser un criterio interesante para definir la composición de cepas a utilizar en un inóculo para producir etanol a partir de la FORSU.

Los mejores resultados de productividad de etanol se obtienen utilizando las levaduras *S. cerevisiae* ITD00196 ( $1.19 \pm 0.01$  g/Lh) utilizando matraces bafleados con un volumen de llenado del 20 %, sin una diferencia estadísticamente significativa con lo obtenido con matraces convencionales con un volumen de llenado del 20 %. En el caso de *K. marxianus* CBS6556, utilizando matraces bafleados con un volumen de llenado del 40 %, no se observó una diferencia estadísticamente significativa con lo obtenido en matraces convencionales con un volumen de llenado del 20 %; y con la levadura *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) utilizando matraces convencionales y un volumen de llenado del 40 % (Figura 8.2A).

Los resultados más bajos de productividad se obtienen con *Schw. occidentalis* ATCC26077 ( $0.22 \pm 0.01$  g/Lh) utilizando matraces convencionales y con ambos volúmenes de llenado, sin observar diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Debido a que en las levaduras antes mencionadas no se presentó una diferencia estadísticamente significativa empleando matraces convencionales se puede indicar que este diseño de matraz favoreció el metabolismo fermentativo.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 8.2.** Parámetros cinéticos de cultivo y coeficientes de rendimientos obtenidos de la producción de etanol en todas las levaduras analizadas y con diferentes diseños de matraz en el consumo de glucosa: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. *S. cerevisiae* ITD00196 (SC); *S. cerevisiae* (levadura de panadería) (BY); *K. marxianus* CBS6556 (KM); *S. stipitis* ATCC58785 (SSATCC); *S. stipitis* Y-17104 (SSY); *Schw. occidentalis* ATCC26077 (SO).

A pesar de que las condiciones de cultivo estaban orientadas para la producción de biomasa, en la Figura 8.2B, se pueden observar rendimientos  $Y_{p/s}$  muy cercanos al teórico (0.51), especialmente para la cepas Crabtree positivo en las primeras etapas del cultivo.

Con un volumen de llenado del 20 % obtienen los mejores resultados de  $Y_{p/s}$  las siguientes cepas: *S. cerevisiae* ITD00196 ( $0.50 \pm 0.02$ ) utilizando matraces bafleados; *S. stipitis* ATCC58785 ( $0.48 \pm 0.03$ ), *S. stipitis* Y-17104 ( $0.47 \pm 0.01$ ) y *Schw. occidentalis* ATCC26077 ( $0.28 \pm 0.01$ ), utilizando matraces convencionales.

En el caso *S. cerevisiae* (Levadura de panadería), no se presenta una diferencia estadísticamente significativa entre los diseños de matraz y los volúmenes de llenado ( $0.45 \pm 0.00$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

También, con la levadura *K. marxianus* CBS6556, no se presentó una diferencia estadísticamente significativa en el diseño de matraz con un volumen de llenado del 40 % ( $0.49 \pm 0.01$ ) (Figura 8.2B).

Los altos rendimientos de producción de etanol pueden explicarse por la acumulación de piruvato intracelular debido a la rápida asimilación de la glucosa, con lo que, se favorece que la enzima piruvato descarboxilasa transforme el piruvato acumulado en acetaldehído, ya que la conversión de acetaldehído a acetil-CoA es limitada y se acumula el etanol (Pronk y col., 1996).

Hagman y col. (2013) cultivando *S. cerevisiae*, reportada como Crabtree positiva, obtuvieron rendimientos de producción de etanol de 0.39 g/g de glucosa y un rendimiento de biomasa de 0.16 g/g de glucosa. El buen crecimiento y la baja producción de etanol de la levadura *Schw. occidentalis* ATCC26077 es debido al efecto Crabtree negativo; esta característica permite mantener un metabolismo respiratorio (oxidativo) en condiciones aerobias (Ingledew, 1987).

Otro fenómeno observado es el crecimiento de las levaduras a partir de etanol como fuente de carbono, fenómeno que fue caracterizado a través del rendimiento  $Y_{xp}$ . Se destacan las levaduras *S. stipitis* Y-17104 ( $1.40 \pm 0.25$ ), *Schw. occidentalis* ATCC26077 ( $1.02 \pm 0.05$ ) y *S. stipitis* ATCC58785 ( $0.89 \pm 0.01$ ) con los mayores valores de  $Y_{xp}$  y utilizando matraces convencionales con un volumen de llenado del 40 % (Figura 8.2C). Esta característica de levaduras Crabtree negativas, indican que el etanol asimilado para el crecimiento de la biomasa fue muy bajo.

En el caso de *S. cerevisiae* ITD00196 se obtuvo un bajo  $Y_{xp}$  al utilizar matraces con resorte y con un volumen de llenado del 40 % ( $0.38 \pm 0.00$ ). Sin embargo, con *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) se obtiene un rendimiento menor ( $0.17 \pm 0.04$ ) a lo observado con *S. cerevisiae* ITD00196, utilizando matraces bafleados y un volumen de llenado del 40 %. En el caso de *K. marxianus* CBS6556 se obtiene un rendimiento  $Y_{xp}$  similar ( $0.16 \pm 0.01$ ) a lo observado con *S. cerevisiae* (Levadura de panadería), utilizando matraces con un volumen de llenado del 40 % (Figura 8.2C). Con un volumen de llenado del 40 % se obtuvieron los rendimientos más bajos, esto podría deberse a que una mayor concentración de etanol es utilizada para el crecimiento de las distintas cepas estudiadas.

Con los rendimientos  $Y_{x/s}$  y  $Y_{p/s}$  es posible estimar cuantitativamente el grado de efecto Crabtree que presentan las levaduras estudiadas. Estos rendimientos podrían indicar que levaduras son las adecuadas para la obtención de un alto rendimiento en la producción de etanol. Sin embargo,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

con el rendimiento  $Y_{x/p}$  se pudo determinar que las levaduras con un efecto Crabtree positivo reasimilan el etanol para su crecimiento.

En la etapa de producción de inóculos la reasimilación del etanol es interesante ya que representa un aumento en la concentración celular. Un inóculo fuerte (alta concentración celular) es importante para los CMS, ya que evita la contaminación por otros microorganismos. Sin embargo, en los CMS para producción de etanol, a partir de la MSE de la FORSU es importante monitorear la producción de etanol para evitar pérdidas por reasimilación.

Se realizó un análisis de varianza para poder indicar el efecto de los factores (diseño de matraz y volumen de llenado) sobre los distintos parámetros cinéticos. Los resultados se analizan a continuación.

### **8.3. Análisis estadístico de los parámetros cinéticos derivados de la producción de etanol y su consumo para el crecimiento celular**

En la Tabla 8.1 se observa el efecto del diseño de matraz (Factor A) y el volumen de llenado (Factor B) y su interacción (Factor AB), en las variables de respuesta productividad de etanol,  $Y_{p/s}$  y  $Y_{x/p}$ . En negritas se resaltan los efectos de los factores que no son significativos en las variables de respuesta señaladas.

El diseño de matraz (Factor A) tiene un efecto estadísticamente significativo en todas las variables medidas de las todas cepas estudiadas, excepto para  $Y_{x/p}$  de *S. cerevisiae* ITD00196 y *S. stipitis* ATCC58785;  $Y_{p/s}$  para la levadura de *S. cerevisiae* (Levadura de panadería), y la productividad de etanol de *S. stipitis* Y-17104 y de *K. marxianus* CBS6556.

El volumen de llenado (Factor B) tiene un efecto significativo en todas las variables medidas de las todas cepas estudiadas, excepto para  $Y_{x/p}$  y la productividad de etanol de *K. marxianus* CBS6556.

La interacción de ambos factores presenta múltiples situaciones donde el efecto no es positivo entre otros ejemplos que se pueden citar, el rendimiento  $Y_{x/p}$  de las dos cepas de *S. cerevisiae* y *K. marxianus* CBS6556. Al mismo tiempo el efecto no es positivo en  $Y_{p/s}$  de las dos cepas de *S. stipitis*, de *Schw. occidentalis* ni en *S. cerevisiae*. Los análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir del análisis estadístico para todas las variables de respuesta, se resumen en el Anexo E.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 8.1.** Análisis estadístico del efecto del diseño de matraz y del volumen de llenado sobre la productividad de etanol,  $Y_{p/s}$  y  $Y_{x/p}$  en los diferentes cultivos utilizados.

Levadura	Factor*	Productividad	$Y_{p/s}$	$Y_{x/p}$
		g/Lh	g/g	g/g
		Valores $p^{**}$		
<i>S. cerevisiae</i> ITD00196	A	0.0001	0.0199	<b>0.6925</b>
	B	0.0000	0.0000	0.0066
	AB	0.0002	0.0066	<b>0.1461</b>
<i>S. cerevisiae</i> (Levadura de panadería)	A	0.0000	<b>0.0691</b>	0.0034
	B	0.0000	0.0042	0.0004
	AB	0.0000	<b>0.1369</b>	<b>0.0532</b>
<i>K. marxianus</i> CBS6556	A	<b>0.0516</b>	0.0031	0.0134
	B	<b>0.2201</b>	0.0024	<b>0.0851</b>
	AB	0.0001	0.0052	<b>0.0743</b>
<i>S. stipitis</i> ATCC58785	A	0.0206	0.0199	<b>0.0782</b>
	B	0.0064	0.0032	0.0011
	AB	<b>0.9212</b>	<b>0.8073</b>	0.0201
<i>S. stipitis</i> Y-17104	A	<b>0.2260</b>	0.0275	0.0117
	B	0.0001	0.0002	0.0094
	AB	<b>0.0552</b>	<b>0.4186</b>	0.0033
<i>Schw. occidentalis</i> ATCC26077	A	0.0000	0.0019	0.0000
	B	0.0167	0.0149	0.0000
	AB	0.0084	<b>0.7489</b>	0.0000

\*Factor A: diseño de matraz y B: volumen de llenado.

\*\*Significante al 95 % nivel de confianza.

En negritas se resaltan los efectos que no son significativos.

Con el análisis estadístico se puede indicar que el efecto de los factores principales, así como de su interacción es muy variado para cada levadura. Sin embargo, en la mayoría de las levaduras estudiadas el volumen de llenado representa el mayor efecto sobre los parámetros cinéticos derivados de la producción de etanol y su consumo para el crecimiento celular.

Se ha reportado que la levadura *S. stipitis* posee la capacidad de crecer y producir etanol a partir del uso de xilosa como fuente de carbono (Negro y col., 2014). Por lo tanto se evaluó el efecto del diseño de matraz y volumen de llenado en el metabolismo de las levaduras *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104.

### 8.4. Conclusiones del análisis del efecto Crabtree

Las levaduras con un efecto Crabtree positivo tienen un potencial para la producción rápida de etanol durante la fermentación directa de una mezcla sólida estándar de la FORSU.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

El efecto Crabtree positivo les da a las levaduras respiro-fermentadoras una ventaja competitiva que permite un consumo rápido de los carbohidratos, principalmente para su crecimiento, pero también para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados en la fermentación (contaminantes).

Es esencial seleccionar cuidadosamente las condiciones utilizadas, para estudiar el metabolismo respiro-fermentativo de una levadura. De lo contrario, puede obtenerse información errónea sobre la biología de la levadura y su posible aplicación en la biotecnología.

Con los rendimientos  $Y_{x/s}'$  y  $Y_{p/s}$  se pudo determinar el grado de efecto Crabtree presentan las levaduras estudiadas.

Las levaduras *S. cerevisiae* ITD00196, *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) y *K. marxianus* CBS6556, presentan un marcado efecto Crabtree positivo ya que presentan rendimientos de  $Y_{x/s}'$  entre 0.13-0.15 y  $Y_{p/s}$  entre 0.40-0.50.

Las levaduras *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104, un efecto Crabtree intermedio, ya que presentan rendimientos de  $Y_{x/s}'$  de  $0.31\pm 0.02$ ;  $0.27\pm 0.02$  y  $Y_{p/s}$  de  $0.48\pm 0.03$ ;  $0.47\pm 0.01$ , respectivamente. La levadura *Schw. occidentalis* ATCC26077 presenta un efecto Crabtree negativo, debido al alto rendimiento de  $Y_{x/s}'$  de  $0.43\pm 0.01$  y bajo  $Y_{p/s}$  de  $0.28\pm 0.01$ .

### **9. Efecto del diseño de matraz y volumen de llenado en el metabolismo de las levaduras *S. stipitis* a partir del uso de xilosa**

En este Capítulo se evaluaron tres diseños de matraz Erlenmeyer y dos volúmenes de llenado para la producción de biomasa de las levaduras *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785 y *Scheffersomyces stipitis* Y-17104, empleando xilosa como fuente de carbono. Simultáneamente las curvas de crecimiento de ambas levaduras se obtuvieron cinéticas de consumo de xilosa y producción de etanol, a partir de esta información se analizó el efecto Crabtree de estas dos cepas empleando xilosa como fuente de carbono. Diversos parámetros cinéticos de crecimiento ( $X_{max}$ ,  $\mu$ ,  $Y_{x/s}$ ' y  $Y_{x/s}$ '') y de la producción de etanol (productividad de etanol,  $Y_{p/s}$  y  $Y_{x/p}$ ) fueron estimados a partir de los datos experimentales. El análisis de las curvas y de los parámetros cinéticos se presenta a continuación.

#### **9.1. Producción de biomasa de las levaduras *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 a partir de xilosa como fuente de carbono**

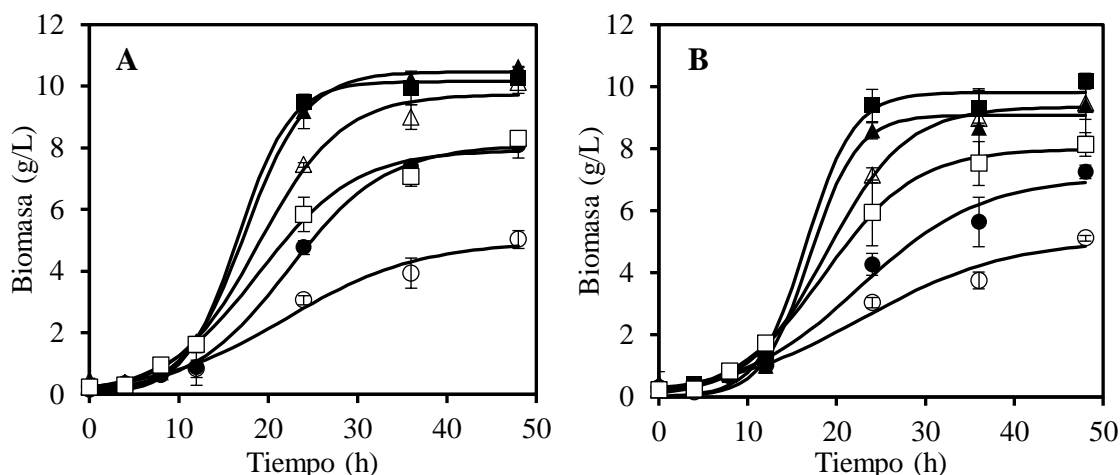
Se evaluó la capacidad fermentativa de *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 empleando xilosa como fuente de carbono. Para ello, se emplearon tres diseños de matraz Erlenmeyer (matraz convencional, con resorte y bafleado), dos volúmenes de llenado (20 y 40 %). En general, se observa que las máximas producciones de biomasa se obtienen al utilizar diseños de matraz con resorte y bafleados en ambos volúmenes de llenado (Figura 9.1).

La producción máxima de biomasa de la levadura *S. stipitis* ATCC58785 se obtuvo al utilizar matraces con resorte (10.63±0.02 g/L) y con un volumen de llenado del 20 %. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el volumen de llenado en los diseños de matraz con resorte y bafleados (Figura 7.2A).

Se observa que la producción máxima de biomasa de *S. stipitis* Y-17104 se obtiene al utilizar matraces bafleados (10.18±0.25 g/L) y con un volumen de llenado del 20 % (Figura 7.2B).

Por otro lado, con un volumen de llenado del 40 %, *S. stipitis* Y-17104 presenta una producción máxima de biomasa al utilizar matraces con resorte (9.47±0.53 g/L) similar a lo obtenido con *S. stipitis* ATCC58785 (10.12±0.34g/L), no se presenta una diferencia estadísticamente significativa entre los datos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 9.1.** Curvas de crecimiento en los tres diseños de matraz para consumo de xilosa: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. La línea continua corresponde al ajuste del modelo logístico integral a las curvas de crecimiento de las levaduras: **A)** *S. stipitis* ATCC58785; **B)** *S. stipitis* Y-17104.

Büchs (2001) indicó que la modificación de los matraces Erlenmeyer mediante la introducción de baffles y otros dispositivos, tales como resortes de acero inoxidable, son a menudo necesarios para proporcionar suficiente aireación para el crecimiento microbiano e indispensable en el metabolismo de la xilosa. Las concentraciones máximas de biomasa de las levaduras *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 fueron mayores a las obtenidas empleando glucosa como fuente de carbono.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de las levaduras *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 al utilizar las diferentes fuentes de carbono. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar xilosa, esto pudo ser debido a la baja producción de etanol obtenida.

Simultáneamente a las curvas de crecimiento de ambas levaduras se obtuvieron curvas de consumo de xilosa y producción de etanol, de las cuales se pudo analizar el efecto Crabtree. Este fenómeno es discutido en la siguiente sección para las dos cepas de *S. stipitis*.

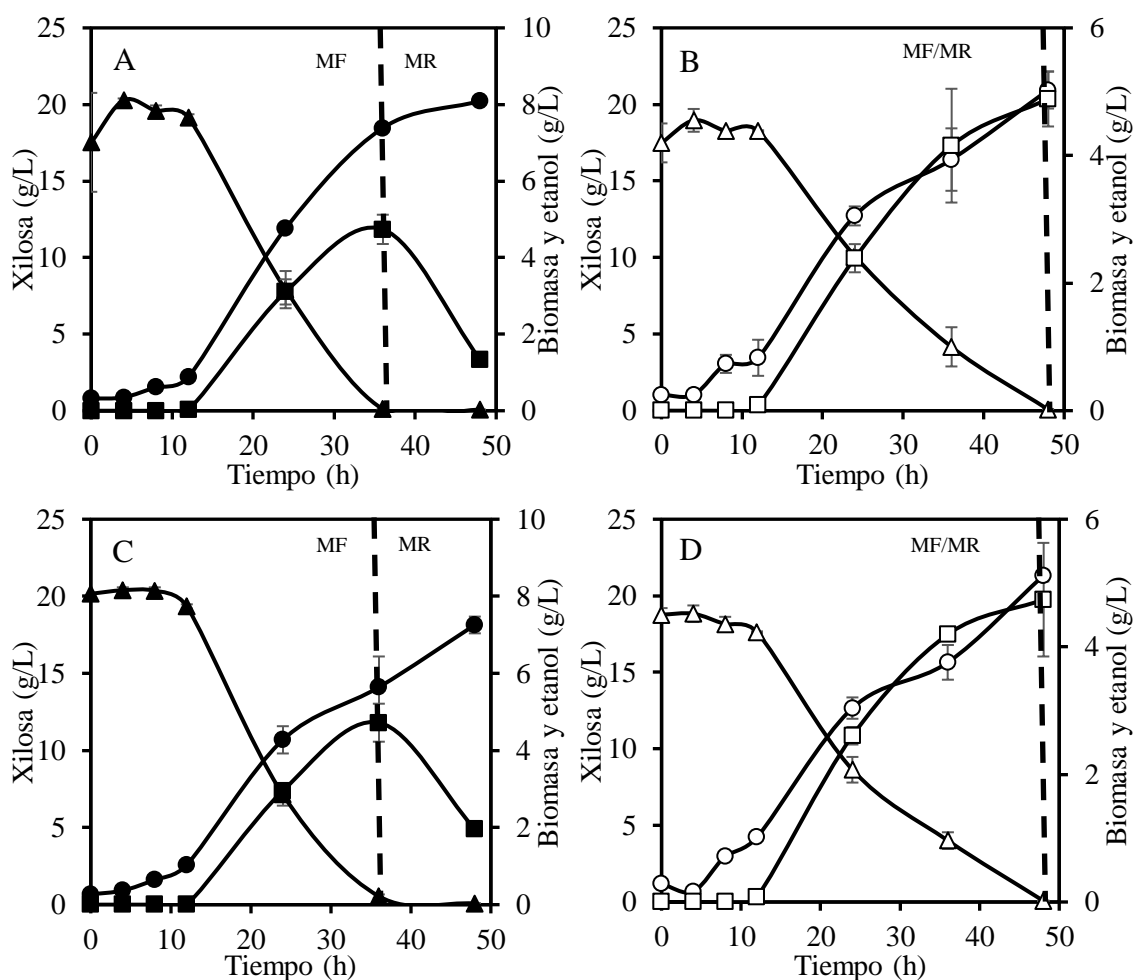
### 9.2. Análisis del efecto Crabtree en las levaduras *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 en la producción de biomasa a partir de xilosa como fuente de carbono

En la Figura 9.2 se muestra un cultivo típico con la evolución de producción de biomasa, concentración de xilosa y producción de etanol durante el cultivo de las levaduras *S. stipitis*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 a los dos volúmenes de llenado 20 % (Figura 9.2A y 9.2C) y 40 % (Figura 9.2B y 9.2D), respectivamente, durante su cultivo en medio líquido con el uso de matraces convencionales y usando xilosa como fuente de carbono.

Con ambas levaduras y con un volumen de llenado del 20 %, se observó que el consumo máximo de xilosa se obtiene hasta las 36 h, en este mismo tiempo se observa la mayor producción de etanol, donde el etanol es entre un 60-70 % reutilizado para metabolismo respiratorio (zona MR) (Figura 9.2A y 9.2C).



**Figura 9.2.** Evolución de la concentración de biomasa (●, ○), xilosa (▲, △) y etanol (■, □) con las levaduras *S. stipitis* ATCC58785 (A y B); *S. stipitis* Y-17104 (C y D), durante su cultivo en medio líquido en un matraz convencional. Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. MF: Metabolismo fermentativo y MR: Metabolismo respiratorio.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Sin embargo, con un volumen de llenado del 40 % y en ambas levaduras, se observa que el consumo máximo de xilosa se obtiene hasta las 48 h, tiempo que corresponde a la producción máxima de biomasa y concentración de etanol (Figura 9.2B y 9.2D).

El consumo total de xilosa se observa hasta las 36 h al utilizar los tres diseños de matraces con un volumen de llenado del 20 %. A estas condiciones, se puede definir el MF y MR debido al consumo de etanol en la etapa final de fermentación. Solo empleando matraces convencionales con un volumen de llenado del 40 % se puede definir un metabolismo mixto (MF/MR) debido a que el consumo máximo de xilosa se obtiene hasta las 48 h. Esto supone que la producción de etanol en su totalidad es por el consumo de xilosa.

Cabe mencionar que se observa un metabolismo muy similar a los obtenidos con la levadura *Schw. occidentalis* ATCC26077 empleando glucosa como fuente de carbono. Por lo que podría considerarse las cepas *S. stipitis* como Crabtree negativas debido a las altas concentraciones de biomasa y las bajas producciones de etanol obtenidas empleando xilosa como fuente de carbono en los diseños de matraz con resorte y bafleado.

Hagman y col. (2013) reportaron que en las levaduras Crabtree positivas, la glucosa se agota al tiempo en que se obtiene la máxima concentración de etanol y este último compuesto empieza a ser utilizado como fuente de carbono. Este tipo de comportamiento delimita el metabolismo fermentativo y respiratorio. Esto es muy similar a lo obtenido con *S. cerevisiae* ITD00196 en ambos volúmenes de llenado y en las dos cepas de *S. stipitis* con un volumen de llenado del 40 % en matraces convencionales. También, se ha demostrado la producción de etanol con la levadura *S. stipitis* en condiciones de alto suministro de O<sub>2</sub> o microaireación en la fermentación de xilosa (du Preez, 1994; Agbogbo y col., 2006).

Al utilizar *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 se obtiene una alta concentración de biomasa, a partir de xilosa como fuente de carbono; así se pretende obtener inóculos con una alta concentración biomasa de estas levaduras. Debido a que el consumo máximo de la glucosa se obtiene a las 24 h, se utilizará esta fuente de carbono para el crecimiento celular de ambas levaduras en etapas posteriores ensayos de producción de inóculos.

*S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 resultan muy atractivas para el aprovechamiento de xilosa, carbohidrato que puede presentarse después del tratamiento térmico de los residuos lignocelulósicos. A continuación se analizan los diversos parámetros cinéticos que

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

fueron estimados a partir de los datos experimentales de los cultivos de *S. stipitis* ATCC58785 y de *S. stipitis* Y-17104.

### 9.3. Análisis de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la formación de biomasa y producción de etanol durante el cultivo de *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 usando xilosa como fuente de carbono

En la Figura 9.3 se presentan los parámetros cinéticos de crecimiento ( $X_{max}$ ,  $\mu$ ,  $Y_{x/s}'$ ,  $Y_{x/s}''$ ) y los parámetros cinéticos obtenidos de la producción de etanol (productividad de etanol,  $Y_{p/s}$  y  $Y_{x/p}$ ) en los tres diseños de matraz Erlenmeyer empleados (matraz convencional, con resorte y bafleado) y dos volúmenes de llenado (20 y 40 %) durante los cultivos de *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 empleando xilosa como fuente de carbono.

En general, se observa que la concentración máxima de biomasa se alcanza utilizando matraces con resorte y con un volumen de llenado del 20 y 40 %; y utilizando matraces bafleados con un volumen de llenado del 20 %, sin presentar una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Figura 9.3A). Esto podría sugerir que la mayor concentración de biomasa en el matraz con resorte es debido al aumento de la transferencia de masa en ambos volúmenes de llenado.

La concentración máxima de biomasa fue de  $10.63 \pm 0.02$  g/L en el crecimiento de *S. stipitis* ATCC58785 utilizando matraces con resorte y un volumen de llenado del 20 %.

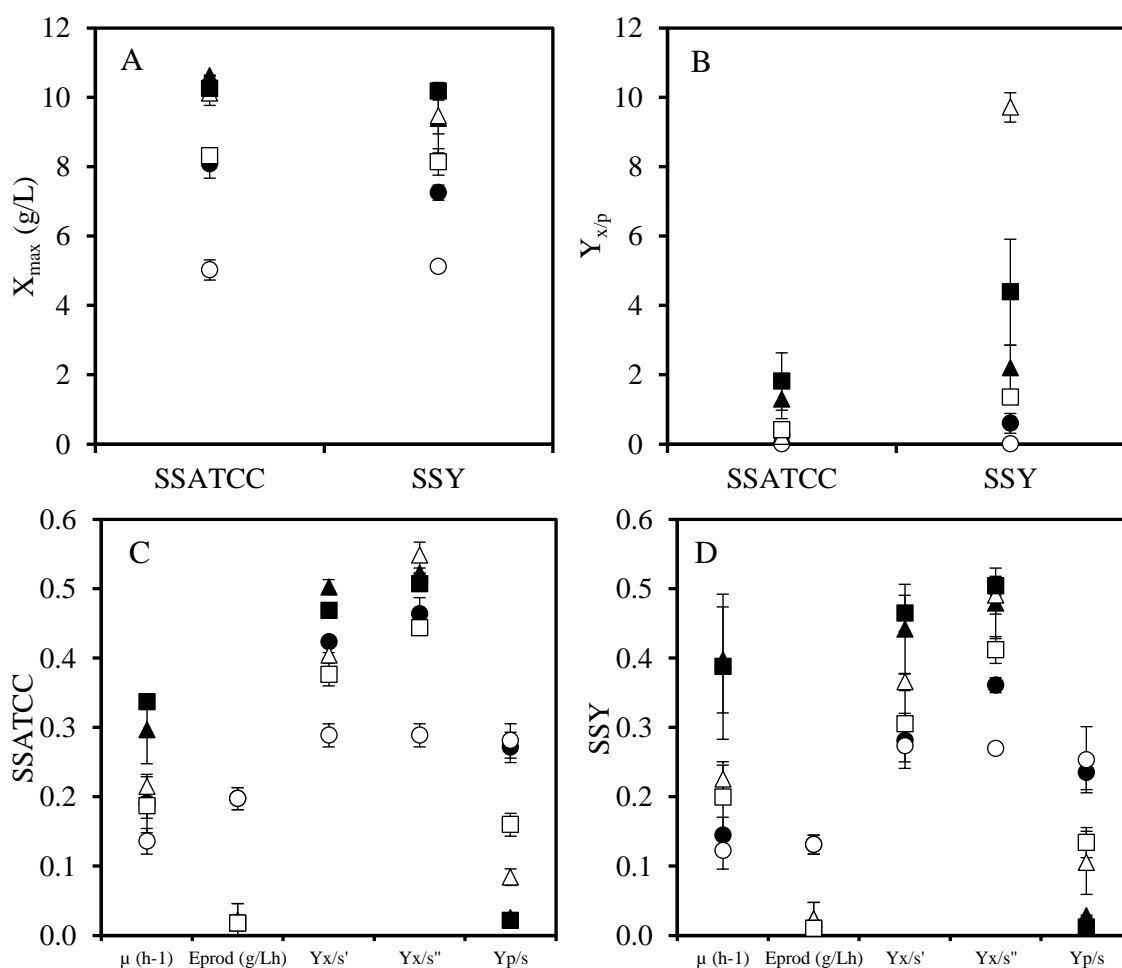
Mientras que la concentración máxima de biomasa de *S. stipitis* Y-17104 fue de  $10.18 \pm 0.25$  g/L, utilizando matraces bafleados con un volumen de llenado del 20 %. Estos resultados fueron mayores a los obtenidos empleando glucosa como fuente de carbono (Figura 7.2A). Negro y col. (2014), reportaron la capacidad de *S. stipitis* en crecer a partir del consumo de xilosa en cultivos agitados.

De igual forma, se observó crecimiento a partir del consumo del etanol producido ( $Y_{x/p}$ ) como fuente de carbono. Durante el cultivo de *S. stipitis* ATCC58785 se obtuvieron valores inferiores a los rendimientos obtenidos con *S. stipitis* Y-17104. Se obtuvieron valores de rendimiento para *S. stipitis* ATCC58785 en un intervalo entre  $0.21 \pm 0.06$  –  $1.81 \pm 0.83$ , estos resultados se obtuvieron utilizando matraces con resorte con un volumen de llenado del 40 % (Figura 9.3B).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sin embargo, en el caso de la levadura *S. stipitis* Y-17104 se obtuvieron valores de  $Y_{x/p}$  en un intervalo entre  $0.60 \pm 0.29 - 9.71 \pm 0.42$ , donde los resultados más bajos se obtuvieron utilizando matraces convencionales con un volumen de llenado del 20 %. Esto podría indicar, de forma general, que el crecimiento de *S. stipitis* Y-17104, se basa principalmente en el consumo de xilosa como fuente de carbono.

Los parámetros cinéticos y rendimientos ( $\mu$ , productividad del etanol (Eprod),  $Y_{x/s}$ ,  $Y_{x/s}$ " y  $Y_{p/s}$ ) se presentan en la Figura 9.3, obtenidos de los cultivos de *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 en los tres diseños de matraz Erlenmeyer (matraz convencional, con resorte y bafleado) y dos volúmenes de llenado (20 y 40 %).



**Figura 9.3.** Parámetros de cinéticos de cultivo y coeficientes de rendimientos obtenidos durante los experimentos con las levaduras en diferentes diseños de matraz en el consumo de xilosa: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado de 20 y 40 %, respectivamente. *S. stipitis* ATCC58785 (SSATCC); *S. stipitis* Y-17104 (SSY).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Se observa que para *S. stipitis* ATCC58785 la  $\mu$  más alta se obtiene utilizando un volumen de llenado del 20 % en matraces con resorte y bafleados. Con respecto a los coeficientes de rendimiento  $Y_{x/s}'$  y  $Y_{x/s}''$  los mejores valores obtenidos fueron  $0.50\pm 0.01$  y de  $0.52\pm 0.00$ , utilizando matraces con resorte y un volumen de llenado del 20 %, respectivamente. Estos valores corresponden, a valores típicos de conversión de azúcares a biomasa, en condiciones aerobias (Pirt, 1975) (Figura 9.3C).

En la productividad de etanol se obtuvieron valores similares ( $0.20\pm 0.02$  g/Lh) utilizando matraces convencionales con un volumen de llenado del 20 y 40 %, donde no se observó una diferencia estadísticamente significativa. Estos valores son inferiores a los encontrados a las mismas condiciones ( $0.38\pm 0.05$ g/Lh) empleando glucosa como fuente de carbono. Esto sugiere que prácticamente toda la xilosa se utilizó para el crecimiento y mantenimiento de la levadura.

Debido a la baja producción de etanol, el rendimiento de producción de etanol ( $Y_{p/s}$ ) respecto al consumo de xilosa fue bajo. Los mejores resultados de  $Y_{p/s}$  ( $0.27\pm 0.02$  y  $0.28\pm 0.02$ ) se obtuvieron utilizando matraces convencionales y un volumen de llenado el 20 y 40 %, sin presentar una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Figura 9.3C).

Se observa que para *S. stipitis* Y-17104 la  $\mu$  más alta se obtiene utilizando un volumen de llenado del 20 % en matraces con resorte y bafleados, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos diseños de matraz. Estos valores fueron superiores a los encontrados con *S. stipitis* ATCC58785. Esto puede ser debido al menor crecimiento observado a estas condiciones. Con respecto a los coeficientes de rendimiento  $Y_{x/s}'$  y  $Y_{x/s}''$  los mejores valores obtenidos fueron  $0.46\pm 0.03$  y  $0.50\pm 0.01$ , utilizando matraces bafleados con un volumen de llenado del 20 %. Esto indica que las condiciones mejor aireadas incrementan el crecimiento de las levaduras usando xilosa como fuente de carbono (Figura 9.3D).

En la productividad del etanol se obtuvieron valores similares ( $0.13\pm 0.01$  g/Lh) utilizando matraces convencionales con un volumen de llenado del 20 y 40 %, donde no se observó una diferencia significativa entre estas condiciones. Estos resultados fueron inferiores a lo obtenido con *S. stipitis* ATCC58785; la baja aireación que se presenta en los matraces convencionales favorece la productividad del etanol empleando xilosa como fuente de carbono. La baja producción de etanol también afectó el rendimiento  $Y_{p/s}$  respecto al consumo de xilosa en *S. stipitis* Y-17104. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando matraces convencionales y un volumen de llenado el

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

20 (0.23±0.02) y 40 % (0.25±0.05), sin presentarse una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Figura 9.3D).

En la Tabla 9.1 se presenta el efecto del diseño de matraz (Factor A) y el volumen de llenado (Factor B) sobre las variables de respuesta  $X_{max}$ ,  $\mu$ ,  $Y_{x/s}'$  y  $Y_{x/s}''$ . En negritas se resaltan los parámetros para los cuales los factores no son significativos.

El diseño de matraz y el volumen de llenado tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre todas las variables de respuesta ( $X_{max}$ ,  $\mu$ ,  $Y_{x/s}'$  y  $Y_{x/s}''$ ) en las dos cepas. Sin embargo, la interacción de los factores solo tuvo un efecto significativo en las variables  $X_{max}$  y  $Y_{x/s}''$ , para ambas levaduras.

**Tabla 9.1.** Análisis estadístico donde se indica el efecto del diseño de matraz y del volumen de llenado sobre la  $X_{max}$ ,  $\mu$ ,  $Y_{x/s}'$  y  $Y_{x/s}''$  en los diferentes cultivos utilizando xilosa como fuente de carbono.

Levadura	Factor**	$X_{max}$	$\mu^{***}$	$Y_{x/s}'$	$Y_{x/s}''$
		g/L	h <sup>-1</sup>	g/g	g/g
		<i>valores p*</i>			
<i>S. stipitis</i> ATCC58785	A	0.0000	0.0050	0.0000	0.0000
	B	0.0000	0.0013	0.0000	0.0002
	AB	0.0015	<b>0.1329</b>	<b>0.0669</b>	0.0002
<i>S. stipitis</i> Y-17104	A	0.0002	0.0100	0.0086	0.0002
	B	0.0034	0.0097	0.0126	0.0084
	AB	0.0356	<b>0.1701</b>	<b>0.0907</b>	0.0458

\*Significante al 95 % nivel de confianza.

\*\*Factor A: diseño de matraz y B: volumen de llenado.

\*\*\*Estimado con el modelo logístico.

En negritas se resaltan los efectos que no son significativos.

En la Tabla 9.2 se presenta el efecto del diseño de matraz (Factor A) y el volumen de llenado (Factor B) y su interacción (Factor AB), sobre las variables de respuesta productividad de etanol,  $Y_{p/s}$  y  $Y_{x/p}$  para ambas levaduras. En negritas se resaltan los parámetros para los cuales los factores no son significativos.

El diseño de matraz y el volumen de llenado, así como su interacción tuvieron un efecto estadísticamente significativo en las respuestas  $Y_{p/s}$  y  $Y_{x/p}$  para las dos cepas. Sin embargo, para la productividad de etanol solo el diseño de matraz tuvo un efecto estadísticamente significativo.

En general, a condiciones de mayor aireación, es decir, diseños de matraz con resorte y bafleados, se obtienen mejores resultados en los parámetros cinéticos de crecimiento a partir de glucosa o xilosa. Por otro lado, con una menor aireación (matraces convencionales) se obtienen

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mejores resultados en los parámetros cinéticos obtenidos de la producción de etanol en el consumo de glucosa o xilosa.

**Tabla 9.2.** Análisis estadístico donde se indica el efecto del diseño de matraz y del volumen de llenado sobre la productividad de etanol,  $Y_{p/s}$  y  $Y_{x/p}$  en los diferentes cultivos utilizando xilosa como fuente de carbono.

Levadura	Factor**	Productividad g/Lh	$Y_{p/s}$ g/g	$Y_{x/p}$ g/g
		valores $p^*$		
<i>S. stipitis</i> ATCC58785	A	0.0000	0.0000	0.0000
	B	<b>0.9999</b>	0.0003	0.0001
	AB	<b>0.9999</b>	0.0038	0.0000
<i>S. stipitis</i> Y-17104	A	0.0001	0.0002	0.0001
	B	<b>0.9999</b>	0.0059	0.0196
	AB	<b>0.9999</b>	0.1280	0.0001

\*Significante al 95 % nivel de confianza.

\*\*Factor A: diseño de matraz y B: volumen de llenado.

En negritas se resaltan los efectos que no son significativos.

Dentro de las posibles aplicaciones de estas levaduras, se presenta la producción de etanol a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU). Para este propósito se ensayaron cultivos axénicos y un cultivo mixto de las levaduras estudiadas. A continuación se presentan los resultados del aprovechamiento de la FORSU a partir del uso de todas las levaduras ensayadas en la etapa de producción de inóculos.

#### 9.4. Aplicación de las levaduras estudiadas en el aprovechamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos para la producción de etanol por cultivo en medio sólido

En la Figura 9.4 se presenta la concentración de etanol y de CF a partir del uso de la FORSU sin pretratamiento térmico por CMS, después de 48 h de fermentación.

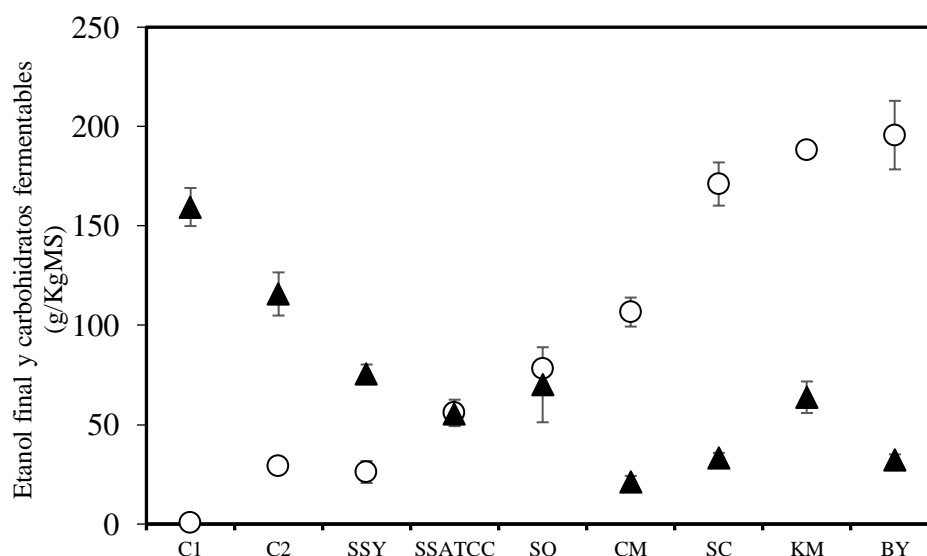
La concentración de CF en el control 1 (C1) se consideró como inicial en todos los casos. Todas las levaduras estudiadas en la etapa de producción de inóculos fueron utilizadas con esta finalidad. Se propone el uso de un cultivo mixto formulado (0.33 % c/u) con las levaduras *S. cerevisiae* ITD00196, *S. stipitis* ATCC58785 y *Schw. occidentalis* ATCC26077.

*S. cerevisiae* ITD00196 se seleccionó por el rápido consumo de glucosa y alta productividad de etanol (Tang y col., 2008). Por su parte, *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) y *K. marxianus* CBS6556 no se consideraron en el cultivos mixtos debido a la baja productividad del etanol y a su bajo rendimiento de crecimiento en la fermentación líquida, respectivamente. *S. stipitis*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ATCC58785 se seleccionó por su capacidad de asimilar pentosas (Negro y col., 2014). La levadura *Schw. occidentalis* ATCC26077 se seleccionó por su capacidad de producir amilasas (Saucedo-Castañeda y col., 1992), especialmente pullulasas (amilasa desramificante), capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1-6 del pululano de la estructura del almidón.

Se probaron dos controles no inoculados el primero analizado al inicio del cultivo (C1) y el segundo analizado después de 48 h de cultivo (C2). Se obtuvo una producción de etanol de  $29.12 \pm 2.47$  g/kg MS en el control C2, que podría deberse a la microflora nativa que fermentó los residuos. Comparando los controles con el resto de las levaduras, se observó un aumento en la concentración de etanol al inocular las levaduras estudiadas (Figura 9.4).



**Figura 9.4.** Concentración de etanol (○) y carbohidratos fermentables (▲) usando diferentes levaduras en la fermentación de una mezcla estándar de FORSU sin pretratamiento térmico. Control 1 (C1) a tiempo inicial; Control 2 (C2) a tiempo final (30h); *S. cerevisiae* ITD00196 (SC); *S. cerevisiae* (levadura de panadería) (BY); *S. stipitis* ATCC58785 (SSATCC); *Schw. occidentalis* ATCC26077 (SO); *S. stipitis* Y-17104 (SSY); *K. marxianus* CBS6556 (KM); Cultivo mixto (CM).

La producción de etanol a partir de la mezcla estándar de la FORSU se incrementó utilizando los cultivos de *S. stipitis* Y-17104 ( $26.19 \pm 5.54$  g/kg MS); *S. stipitis* ATCC58785 ( $55.92 \pm 6.66$  g/kg MS); *Schw. occidentalis* ATCC26077 ( $78.15 \pm 0.38$  g/kg MS); Cultivo mixto ( $106.66 \pm 7.30$  g/kg MS); *S. cerevisiae* ITD00196 ( $171.10 \pm 10.87$  g/kg MS); *K. marxianus* CBS6556 ( $188.30 \pm 3.07$  g/kg MS) y *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) presentó la concentración más alta de etanol ( $195.70 \pm 17.25$  g/kg MS) sin una diferencia estadísticamente significativa con *K.*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

*marxianus* CBS6556 y *S. cerevisiae* ITD00196. La concentración de etanol obtenida por *S. stipitis* Y-17104 ( $26.19 \pm 5.54$  g/kg MS) pudo ser debido a la fermentación de las levaduras presentes en los residuos. A pesar que con la levadura de panadería se obtuvo una alta concentración de etanol, no se consideró en el cultivo mixto debido a que no es una levadura caracterizada y puede contener una mezcla de levaduras; además al no existir una diferencia estadísticamente significativa con la levadura *S. cerevisiae* ITD00196 utilizada principalmente para la producción de etanol (Díaz-Campillo y col., 2012). Con el uso de una levadura caracterizada se busca tener un proceso reproducible.

Se obtuvo una concentración de CF iniciales de  $159.52 \pm 9.58$  g/kg MSI y al final de la fermentación se obtuvieron concentraciones de carbohidratos residuales entre los  $21.16 \pm 3.06$  y  $75.41 \pm 4.87$  g/kg MSI. Aunque se obtiene una alta concentración de etanol a partir de la *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) a partir de una mezcla estándar de FORSU sin pretratamiento térmico, un pretratamiento térmico ayudaría a mejorar el control del proceso y a eliminar contaminantes.

### **9.5. Conclusiones del uso de xilosa como fuente de carbono y del alto potencial de la MSE para la producción de etanol**

En general, a condiciones de mayor aireación, es decir, diseños de matraz con resorte y bafleado, se obtienen mejores resultados en los parámetros cinéticos de crecimiento a partir de glucosa o xilosa. Por otro lado, con una menor aireación (matraces convencionales) se obtienen mejores resultados en los parámetros cinéticos de la producción de etanol en el consumo de glucosa o xilosa. La xilosa es una fuente de carbono atractiva para la producción de inóculos de *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104. Sin embargo, es una fuente de carbono con un alto costo.

Para la formulación de un cultivo mixto las levaduras *S. cerevisiae* ITD00196, *S. stipitis* ATCC58785 y *Schw. occidentalis* ATCC26077, fueron seleccionadas por su alto potencial de producción de etanol, la capacidad de aprovechar xilosa como fuente de carbono y la capacidad de producir enzimas amilolíticas, para el aprovechamiento integral de la FORSU en CMS.

Se demuestra el alto potencial de la MSE como sustrato para su aprovechamiento en la producción de etanol con el uso de levaduras en CMS.



## 10. Determinación de las condiciones de pretratamiento de la FORSU

Al inicio de este Capítulo se presenta la caracterización química de la mezcla sólida estándar (MSE) de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), seguido de la optimización del pretratamiento térmico de la MSE para la liberación de carbohidratos y su posterior aprovechamiento para la producción de etanol. El pretratamiento térmico de la MSE fue optimizado usando un diseño factorial central compuesto (DFCC) y empleando diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0, 1 y 2 % p/p). *S. cerevisiae* ITD00196 fue seleccionada para realizar una prueba preliminar de producción de etanol a escala laboratorio.

### 10.1. Caracterización química y carbohidratos estructurales de la mezcla sólida estándar de la FORSU sin y con pretratamiento térmico

La caracterización química general y el contenido de carbohidratos estructurales de la MSE sin y con pretratamiento térmico (2.7 kg/cm<sup>2</sup> por 15 min, SF=2.35) se muestran en las Tablas 10.1 y 10.2, respectivamente.

La MSE, presentó un contenido de humedad entre 76 y 80 %: Tang y col. (2008) encontraron valores similares empleando residuos de cocina (80.3 %). Uçkun Kiran y col. (2014) reportan valores de humedad de 61.3-87.1 % en residuos de una mezcla de alimentos.

**Tabla 10.1.** Caracterización química de la mezcla estándar con pretratamiento térmico (FS=2.35).

	Contenido (%)
Humedad	79.57 ± 2.50
pH	6.46 ± 0.77
Cenizas	4.93 ± 0.99
Sólidos totales	20.43 ± 2.49
<b>Análisis elemental</b>	
C	34.48 ± 2.59
H	5.84 ± 0.15
N	1.00 ± 0.06
C/N	34.59 ± 0.97

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores elevados humedad, podrían explicarse por la alta proporción de residuos de fruta fresca utilizados en estas mezclas. Por otra parte, el pH relativamente alto puede explicarse por el manejo rápido de los residuos frescos, evitando la acidificación por contaminación microbiana.

En este trabajo, la MSE presentó una relación de C/N cercana a 34.6 (Tabla 10.1), adecuada para la producción de etanol. Uçkun Kiran y col. (2015), reportan que las mejores condiciones para la producción de etanol, utilizando una mezcla de residuos de cocina, se obtuvieron con una relación de C/N entre 28 y 35.

La composición estructural de los carbohidratos (Tabla 10.2) de los residuos depende del origen de la materia orgánica, de las condiciones de suelo y de cultivo, entre otros factores. El pretratamiento térmico aumentó el contenido de la mayoría de los carbohidratos estructurales, excepto la galactosa y sacarosa, que no fueron detectadas.

La sacarosa al ser un disacárido, formado por glucosa y fructosa, pudo ser hidrolizada por el tratamiento térmico ácido utilizado para el análisis de los carbohidratos estructurales. Se observó un aumento del 28.5 % en el total de carbohidratos debido al pretratamiento térmico.

**Tabla 10.2.** Carbohidratos estructurales de la mezcla sólida estándar sin y con pretratamiento térmico (FS=2.35).

	Sin pretratamiento	Con pretratamiento
Sacarosa	ND	ND
Glucosa	21.16 ± 1.64	27.83 ± 1.74
Fructosa	12.58 ± 0.99	15.06 ± 0.54
Xilosa	2.70 ± 0.80	3.21 ± 0.88
Arabinosa	2.52 ± 0.08	3.56 ± 0.18
Galactosa	ND	ND
Manosa	1.39 ± 0.28	2.24 ± 0.12
Carbohidratos totales	40.88 ± 2.97	52.53 ± 3.35

Los valores son reportados como la media del carbohidrato (%) en base seca ± desviaciones estándar.

Análisis realizado de acuerdo a los métodos estandarizados recomendados por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL).

ND: No detectado.

Los carbohidratos totales se encuentran en el intervalo de 40.9 – 52.5 %, similares a lo reportado para otro tipo de residuos orgánicos. Por ejemplo, Ballesteros y col. (2010) reportan una mezcla de residuos con un contenido de 47-49 % de carbohidratos totales. Por otro lado, Uçkun Kiran y col. (2014) utilizan mezclas de alimentos y reportan entre el 35-70 % de carbohidratos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Tomando en cuenta la naturaleza de estos residuos y su bajo costo, la MSE es un sustrato alternativo con un alto potencial para la producción de etanol. El pretratamiento térmico es útil para aumentar el contenido de la mayor parte de los componentes estructurales y reducir los contaminantes en la MSE utilizada.

### **10.2. Optimización de la liberación de carbohidratos fermentables y reducción de inhibidores en la mezcla sólida estándar de la FORSU usando un DFCC sin la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

El efecto de la presión-temperatura y el tiempo de residencia ha sido ampliamente reportado (Ballesteros y col., 2010; Cesaro y col., 2014; Negro y col., 2014; Zhi-Min y col., 2015; Overend y col., 1987; Boluda-Aguilar y López-Gómez, 2013) para el pretratamiento térmico de material orgánico. En esta sección de la tesis el objetivo principal fue liberar el mayor contenido de CF con la menor liberación de factores antifisiológicos, tales como el ácido acético, furfural y HMF. Para ello, se acopló la regresión lineal múltiple con la metodología de superficie de respuesta, así como se analizó el factor de severidad con la ayuda de una ecuación no lineal (Tabla 3) definido en Materiales y Métodos (sección 6.8; ecuación 6.9).

En todas las condiciones analizadas, las muestras de la MSE presentaron un contenido de humedad y pH de  $80.92 \pm 1.72$  % y  $6.48 \pm 0.17$ , respectivamente.

En primer lugar, se analizó la MSE fresca y pretratada térmicamente bajo condiciones de esterilización térmica estándar (ETE;  $1.1 \text{ kg/cm}^2$  y 15 min), para determinar el efecto del pretratamiento térmico en la composición de CF y en la concentración de ácido acético. Los CF, definidos en esta etapa como glucosa, fructosa y sacarosa, presentaron concentraciones similares,  $190.74 \pm 16.79$  y  $191.25 \pm 16.79$  g/kg MSI, en la MSE fresca y pretratada térmicamente, respectivamente (Tabla 10.3). Se determinó una disminución significativa en la concentración de sacarosa (41 %) después de la ETE en comparación con la MSE fresca ( $20.19 \pm 7.80$  g/kg MSI).

El ácido acético es un inhibidor de la fermentación alcohólica, está presente de forma natural en la MSE fresca ( $2.77 \pm 1.10$  g/kg MSI). Después de la ETE no se detectó ninguna reducción significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de ácido acético ( $1.02 \pm 0.62$  g/kg MSI). El furfural y el HMF no fueron detectados después de la ETE.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Para todas las condiciones analizadas (Tabla 10.3), la concentración de sacarosa fue menor al 13.80 % del total de los CF. La glucosa y fructosa fueron los compuestos más abundantes representando el  $45.50 \pm 3.80$  y  $43.90 \pm 2.50$  % del total de los CF, respectivamente.

Aplicando un FS de 2.35 se obtuvo la mayor concentración de glucosa ( $164.81 \pm 7.4$  g/kg MSI). Para el caso de la fructosa, un FS menor (1.35) fue suficiente para obtener la concentración más alta de CF ( $150.31 \pm 9.05$  g/kg MSI), lo que representa un aumento del 96 % (Tabla 10.3). Con un FS de 2.35, se alcanzó la concentración más alta de CF ( $321.71 \pm 22.38$  g/kg MSI); en esta condición de FS se obtiene la máxima concentración de glucosa, una de las principales fuentes de carbono para la producción de etanol. Zhi-Min y col. 2015, utilizando un FS entre 1.41 y 1.73, obtuvieron la mayor concentración de glucosa al pretratar un sustrato compuesto de salvado de trigo y harina de soya. Utilizando un FS de 1.52, estos autores obtuvieron un aumento del 80 % en la concentración de la glucosa. En el pretratamiento de la MSE, se requirió aplicar un FS mayor (2.35) para obtener la liberación máxima de glucosa, esto pudo ser debido al tipo de sustrato utilizado.

Por otra parte, los resultados experimentales (Tabla 10.3) indican que el contenido de ácido acético disminuye en la medida que aumenta el FS. Por ejemplo, se encontraron  $0.83 \pm 0.09$  y  $6.75 \pm 2.00$  g/kg MSI para FS=2.35 ( $2.7 \text{ kg/cm}^2$  y 15 min) y FS=1.35 ( $2 \text{ kg/cm}^2$  y 10 min), respectivamente, lo cual se explica por la volatilidad del ácido acético. El efecto inhibitor del ácido acético en las levaduras es bien conocido (Maiorella y col., 1983; Bellido y col., 2011; Negro y col., 2014).

Maiorella y col. (1983) reportaron una reducción del 80 % en el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* en una concentración de ácido acético de 7.5 g/L. Bellido y col. (2011), indicaron que una concentración de ácido acético de 3.5 g/L tiene un efecto inhibitor sobre la fermentación de *S. stipitis*. Negro y col. (2014) reportaron que el ácido acético es un inhibitor de las levaduras y aparece durante la hidrólisis de la hemicelulosa. En todos los ensayos probados se alcanzó una concentración que varió de 0.02 y 0.33 g/L de ácido acético. No se detectó ningún otro inhibitor como furfural o HMF.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 10.3.** Diseño factorial central compuesto con puntos estrella, usado para evaluar el efecto de la presión (temperatura) y tiempo de residencia en el pretratamiento térmico sobre la mezcla sólida estándar utilizada sin adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Tratamiento	Valores reales		Valores codificados			Variables de respuesta (g/kg MSI)				
	Presión <sup>a</sup> (kg/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (min)	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	FS <sup>b</sup>	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	CF <sup>c</sup>	Ácido acético
Sin pretratamiento térmico	-	-	-	-	-	20.19 ± 7.80	72.78 ± 12.24	98.77 ± 10.67	191.74 ± 18.02	2.77 ± 1.10
ETE	1.1 (121)	15	-	-	1.79	11.91 ± 0.02	84.16 ± 3.06	94.68 ± 4.66	190.74 ± 5.58	1.02 ± 0.62
Diseño factorial central compuesto										
1	2.7 (140)	15	1	1	2.35	30.74 ± 3.93	164.81 ± 7.54	126.15 ± 20.70	321.71 ± 22.38	0.83 ± 0.09
2	2.7 (140)	5	1	-1	1.87	19.06 ± 2.91	95.44 ± 8.79	82.33 ± 10.28	196.82 ± 13.84	0.59 ± 0.11
3	1.3 (124)	15	-1	1	1.88	19.33 ± 0.04	96.53 ± 0.39	89.14 ± 7.44	204.99 ± 7.45	0.64 ± 0.10
4	1.3 (124)	5	-1	-1	1.41	32.64 ± 5.53	90.08 ± 0.85	112.57 ± 6.08	235.30 ± 8.26	1.41 ± 0.46
5	2 (133)	10	0	0	1.35	36.33 ± 1.95	142.55 ± 15.03	150.31 ± 9.05	329.20 ± 17.65	6.22 ± 1.70
6	2 (133)	10	0	0	1.35	33.89 ± 975	142.34 ± 7.72	124.94 ± 8.95	301.18 ± 15.32	6.75 ± 2.00
7	2 (133)	17.05	0	1.41	2.20	24.00 ± 3.96	108.87 ± 0.33	102.33 ± 3.30	235.21 ± 5.16	0.81 ± 0.22
8	2 (133)	2.93	0	-1.41	1.44	13.65 ± 0.32	72.77 ± 15.38	70.48 ± 12.07	156.91 ± 19.55	2.49 ± 0.55
9	3 (143)	10	1.41	0	2.27	20.50 ± 0.78	92.38 ± 2.04	91.02 ± 8.68	203.90 ± 8.95	0.88 ± 0.06
10	1 (120)	10	-1.41	0	1.59	25.64 ± 0.80	72.78 ± 3.03	86.73 ± 1.57	185.15 ± 3.51	0.69 ± 0.02

<sup>a</sup>Valores en paréntesis corresponden a la temperatura (°C).

<sup>b</sup>Factor de severidad (FS) como se define en la ecuación 6.10.

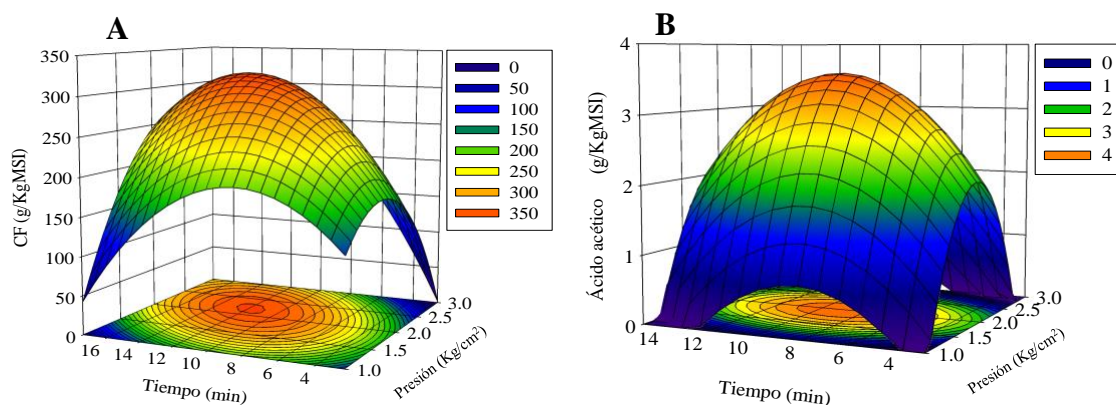
<sup>c</sup>Carbohidratos fermentables (CF) (Sac + Glu + Fru).

ETE: Esterilización térmica estándar.

## 10.3 Análisis estadístico del diseño factorial central compuesto sin la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

En la Figura 10.1 se muestran las superficies de respuesta y los figuras de contornos que corresponden a las representaciones gráficas de los modelos de regresión. La liberación de los CF (sacarosa, glucosa y fructosa) al medio a partir de los pretratamientos térmicos planteados en el DFCC se muestran en la Figura 10.1A. Según el modelo de regresión las condiciones óptimas indicadas por la metodología de superficie de respuesta para la liberación de CF son cercanas a 2.2 kg/cm<sup>2</sup> y 12 min produciendo una concentración de CF de 321.80 g/kg MSI. Este contenido de CF es un 68.3 % superior a lo obtenido a las condiciones de ETE (Tabla 10.3). Sin embargo, bajo las mismas condiciones experimentales, la concentración de ácido acético fue de 3.1 g/kg MSI (Figura 10.1 B).

Los resultados de los coeficientes del modelo polinomial de segundo orden, el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de bondad de ajuste del modelo se presentan en la Tabla 10.4. El modelo presentó un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) de 0.81 para la concentración de CF y de 0.80 para el contenido de ácido acético. Considerando la heterogeneidad de las muestras de la MSE, estos resultados se consideran aceptables.



**Figura 10.1.** Superficie de respuesta y contornos que muestran la interacción de la presión y el tiempo de resistencia en las variables de respuesta carbohidratos fermentables (Sac + Glu + Fru) (A) y ácido acético (B) después del pretratamiento térmico sin la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

El efecto de cada factor en las distintas respuestas analizadas fue determinado por los valores de  $p$  ( $p < 0.05$ ). En la Tabla 10.4, se puede observar que la presión-temperatura ( $X_1$ ), el tiempo de residencia ( $X_2$ ), su interacción ( $X_1X_2$ ) y los términos cuadráticos ( $X_1^2$  y  $X_2^2$ ), tuvieron

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

un efecto significativo en la liberación de CF. Valores de  $p$  más cercanos a 0 corresponden a un mayor efecto sobre las variables de respuesta.

**Tabla 10.4.** Coeficientes de regresión y  $p$ -valores obtenidos del análisis estadístico del diseño factorial central compuesto con puntos estrella en el pretratamiento térmico sobre la mezcla sólida estándar sin adición de  $H_2SO_4$ .

Términos del modelo <sup>a</sup>	CF <sup>b</sup> (g/kg MSI)		Ácido acético (g/kg MSI)	
	Estimado	Valores $p^c$	Estimado	Valores $p^c$
Constante	-147.569		-25.3352	
X <sub>1</sub>	309.728	0.0253	23.2903	0.9068
X <sub>2</sub>	21.7325	0.0004	1.79524	0.3383
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	-100.468	0.0000	-6.01784	0.0001
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	11.0848	0.0002	0.0719	0.6332
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	-1.9346	0.0000	-0.1006	0.0003

<sup>a</sup>X<sub>1</sub>: Presión (kg/cm<sup>2</sup>) and X<sub>2</sub>: Tiempo de residencia (min).

<sup>b</sup>Carbohidratos fermentables (CF) (Sac + Glu + Fru).

<sup>c</sup> $p < 0.05$  Indica un efecto significativo de la variable de respuesta.

En la concentración de CF se puede observar que los factores principales (X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>) presentan un efecto significativo sobre la variable de respuesta, sin embargo, el tiempo de residencia (X<sub>2</sub>) presentó un mayor efecto debido al valor de  $p$  de 0.0004. Por otro lado, en la liberación de ácido acético solo los términos cuadráticos X<sub>1</sub><sup>2</sup> y X<sub>2</sub><sup>2</sup> presenta un efecto significativo en la variable de respuesta.

Las condiciones óptimas para la liberación máxima tanto de CF (cerca de 2.2 kg/cm<sup>2</sup> y 12 min, FS=2.11) como de ácido acético (cerca de 2.0 kg/cm<sup>2</sup> y 9 min, SF=1.93) son bastante similares. Por lo tanto, para aumentar el contenido de CF, sin liberar ácido acético, es necesario aplicar un factor de severidad más alto en el pretratamiento térmico. Esta condición se consigue utilizando un FS de 2.35 (2.7 kg/cm<sup>2</sup> y 15 min) que permite una alta concentración de CF (321.71±22.38 g/kg MSI) y una baja concentración de ácido acético (0.83±0.09 g/kg MSI).

En cuanto a la liberación de CF, obtenida únicamente mediante el pretratamiento térmico, estos resultados concuerdan con lo reportado por Ballesteros y col. (2010) y Zhi-Min y col. (2015).

El aumento de presión-temperatura y tiempo de residencia resulta en el aumento de la liberación de carbohidratos, lo cual, está relacionado con el aumento de un factor de severidad.

Una combinación de presión-temperatura, tiempo de tratamiento y una rápida liberación de vapor, reduce los contaminantes y posiblemente, causa la ruptura de las paredes celulares de los residuos y aumenta la liberación de los CF (Zhi-Min y col., 2015).

### **10.4. Optimización de la liberación de carbohidratos fermentables y la reducción de inhibidores en la mezcla sólida estándar de la FORSU usando un DFCC y la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 y 2 % p/p)**

Con la finalidad de aumentar la concentración de CF y así obtener una mayor producción de etanol, a la MSE fue pretratada térmicamente (DFCC) con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a las concentraciones de 1 y 2 % (p/p). Li y col. (2007) demuestran que la hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido combinado con un tratamiento con vapor es el método más eficiente para obtener glucosa a partir de los residuos sólidos urbanos.

La mezcla sólida estándar con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a las concentraciones de 1 y 2 % (p/p) generará productos con un pH ácido promedio de 1.68 y 1.21, respectivamente. Estos valores de pH fueron utilizados para calcular factor de severidad combinado (FSC) con tratamiento ácido (Ecuación 6.11) en todas las condiciones de los pretratamiento térmicos ensayados en el DFCC.

Las concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa, los CF (Sac+Glu+Fru+Xil), así como de los inhibidores para cada uno de los tratamientos planteados en el DFCC con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se muestran en el Anexo F.

En resumen, en los pretratamientos térmicos con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 % se pudo observar que la concentración máxima de glucosa (129.73±4.55 g/kg MSI) y de fructosa (145.15±4.97 g/kg MSI), se alcanzó utilizando un FS de 0.67. No se observó una diferencia significativa con respecto al FS de 0.19. Cabe resaltar la presencia de xilosa en los pretratamientos térmicos con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 %. Se obtuvieron concentraciones de xilosa en un intervalo de 0.87±0.03 y 8.68±1.75 g/kg MSI.

La presencia de este carbohidrato indica una mejor hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, comparado con los carbohidratos obtenidos en la MSE fresca y la diferentes condiciones de los pretratamientos del DFCC sin la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, condiciones en las que no se detectó xilosa.

Las mayores concentraciones de ácido acético se obtuvieron con FSC de -0.33, -0.27 y -0.09, alcanzando valores de 11.14±0.44, 13.73±0.26 y 13.85±2.45 g/kg MSI, respectivamente (Anexo F). Los FSC con valores negativos se obtienen debido a las bajas condiciones de temperatura y tiempo de residencia, así como de valores bajos de pH (1.68). Los FSC con valores negativos podrían interpretarse como un bajo efecto de la combinación presión-tiempo de residencia con respecto a los valores de pH obtenidos.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Sin embargo, con un factor de severidad de 0.67, se obtuvieron concentraciones de ácido acético menores ( $2.55 \pm 0.98$  g/kg MSI), resultados similares de presión-temperatura y tiempo de residencia en el pretratamiento de la MSE sin la adición de  $H_2SO_4$ .

También, se detectó la presencia de HMF ( $0.32 \pm 0.19$  a  $1.52 \pm 0.55$  g/kg MSI), producto de la degradación de las hexosas, en los pretratamientos térmicos con la adición de  $H_2SO_4$  al 1 %. Las concentraciones más elevadas de HMF se encontraron en FSC más altos, como por ejemplo con el FSC = 0.52 ( $1.52 \pm 0.55$  g/kg MSI) y con el FSC = 0.67 ( $1.07 \pm 0.17$  g/kg MSI).

En los pretratamientos térmicos con la adición de  $H_2SO_4$  al 1 % se pudo observar que las concentraciones más altas de sacarosa ( $39.83 \pm 0.70$  g/kg MSI), glucosa ( $197.64 \pm 4.52$  g/kg MSI), fructosa ( $218.48 \pm 4.71$  g/kg MSI) y xilosa ( $31.00 \pm 7.22$  g/kg MSI) se obtuvieron en un FSC de 1.14. Con respecto a los inhibidores, se obtuvieron concentraciones de ácido acético entre  $2.59 \pm 0.48$  g/kg MSI a  $15.11 \pm 2.11$  g/kg MSI. Por otro lado, se obtuvieron concentraciones de HMF de entre  $0.30 \pm 0.04$  y  $5.55 \pm 0.52$  g/kg MSI, donde la concentración más elevada se obtuvo con el FSC más alto (1.14).

En ambas concentraciones de  $H_2SO_4$  (1 y 2 %), la mayor concentración de CF se obtuvo con un FSC de 0.67 y 1.14, respectivamente (Tabla 10.5). Estas condiciones representan los FSC más altos, lo que es similar a lo obtenido en el DFCC sin la adición de  $H_2SO_4$ . Los CF representan la suma de las concentraciones de sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa, obtenidas.

Con una concentración de  $H_2SO_4$  al 1 % se obtuvo una concentración máxima de CF de  $304.32 \pm 6.88$  g/kg MSI, concentración menor a lo obtenido en la MSE sin la adición de  $H_2SO_4$  en el mismo FS (Tabla 10.5). Sin embargo, con una concentración de  $H_2SO_4$  al 2 % se obtuvo una concentración máxima de CF de  $486.95 \pm 9.75$  g/kg MSI, que representa un aumento del 155.3 y del 51.4 %, con respecto a la concentración de CF obtenidos de la MSE fresca y sin la adición de  $H_2SO_4$ , respectivamente (Tabla 10.5).

Las concentraciones de los inhibidores obtenidos en un FS de 0.67 y 1.14 para ambas concentraciones de  $H_2SO_4$  (1 y 2 %) representan en g/L:  $0.11 \pm 0.04$  y  $0.43 \pm 0.15$ , para el ácido acético; y de  $0.05 \pm 0.01$  y  $0.24 \pm 0.02$ , para el HMF, respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 10.5.** Concentración de carbohidratos fermentables e inhibidores en el pretratamiento térmico de la mezcla sólida estándar con adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Presión <sup>a</sup>	Tiempo	FSC <sup>b</sup>	CF <sup>c</sup>	Ácido acético	HMF
(%)	(kg/cm <sup>2</sup> )	(min)			g/kg MSI	
0	2.7 (140)	15	2.35*	321.71 ± 22.38	0.83 ± 0.09	0.00 ± 0.00
1	2.7 (140)	15	0.67	304.32 ± 6.88	2.55 ± 0.98	1.07 ± 0.17
2	2.7 (140)	15	1.14	486.95 ± 9.75	9.92 ± 3.55	5.55 ± 0.52

\*Este valor representa solo el factor de severidad como se define en la ecuación 6.10.

<sup>a</sup>Valores en paréntesis corresponden a la temperatura (°C).

<sup>b</sup>Factor de severidad combinado (FSC) como se define en la ecuación 6.11.

<sup>c</sup>Carbohidratos fermentables (CF) (Sac + Glu + Fru + Xil).

Negro y col. (2014), mencionaron que el intervalo de inhibición del ácido acético es de 2.7-3.5 g/L y para el HMF de 0.1-0.3 g/L, por lo que los resultados obtenidos se encuentran por debajo del intervalo de inhibición para el ácido acético y en el límite superior para lo obtenido con el HMF.

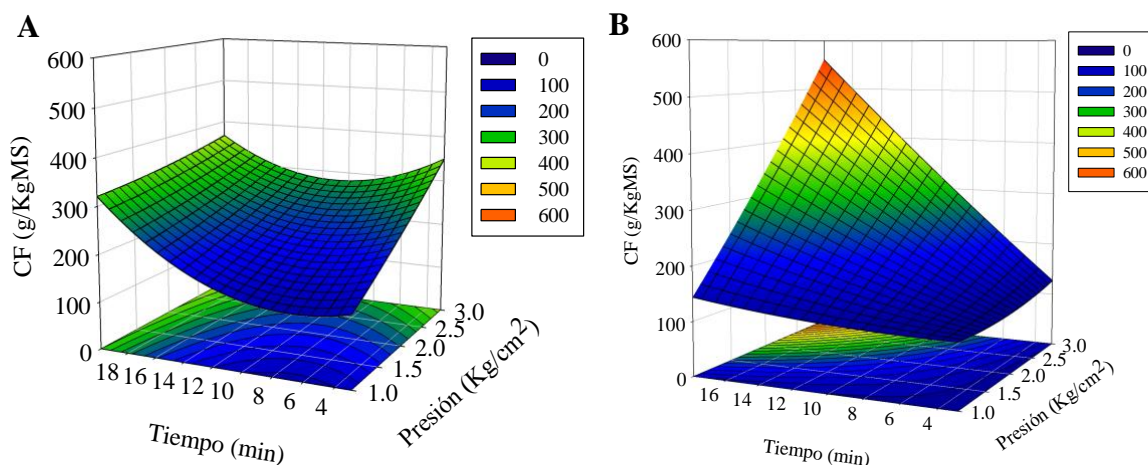
### 10.5 Análisis estadístico del diseño factorial central compuesto con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Los resultados de los coeficientes del modelo polinomial de segundo orden con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de bondad de ajuste del modelo se presentan en el Anexo F.

En la Figura 10.2 se observan las superficies de respuesta y de contornos que muestran la interacción de los factores estudiados, presión-temperatura y tiempo de residencia, para la variable de respuesta CF (Sac + Glu + Fru + Xil), después del pretratamiento con el DFCC con la adición de 1 (Figura 10.2A) y 2 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 10.2B).

El análisis estadístico de las gráficas de superficie de respuesta nos permiten determinar que las condiciones con los FSC=0.67 (Figura 10.2A) y FSC=1.14 (Figura 10.2B) fueron las adecuadas para obtener la mayor concentración de CF. Estos FSC representan las condiciones más altas de presión-temperatura y tiempo de residencia planteadas en el DFCC.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 10.2.** Superficie de respuesta y contornos que muestran la interacción de la presión y el tiempo de resistencia para la variable de respuesta carbohidratos fermentables (CF; Sac + Glu + Fru + Xil) después del pretratamiento térmico con la adición de 1 (A) y 2 % (B) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Los coeficientes de regresión y los valores  $p$  obtenidos del análisis estadístico del DFCC con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una concentración del 1 y 2 %, se presentan en el Anexo F. Se obtuvo que la presión-temperatura ( $X_1$ ), tiempo de residencia ( $X_2$ ) y su interacción ( $X_1X_2$ ) tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la liberación de los CF de la MSE con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una concentración del 1 y 2 %.

Los FSC de 2.35, 0.67 y 1.14, representaron las condiciones más adecuadas para el pretratamiento de la MSE a las concentraciones de 0, 1 y 2 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y su posterior fermentación para la producción de etanol sin y con ajuste de pH.

### 10.6. Prueba preliminar de producción de etanol a partir de la fermentación de la mezcla sólida estándar pretratada a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0, 1 y 2 % p/p) a escala laboratorio

Con la finalidad de producir etanol a partir de la MSE pretratada con los FSC de 2.35, 0.67 y 1.14, se realizó una prueba preliminar ajustando el pH de la MSE (10 g) con hidróxido de calcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) a diferentes concentraciones (0.5 a 5.0 % p/p).

La MSE fresca presenta un pH promedio de  $6.46 \pm 0.77$ . A este pH las levaduras han sido capaces de producir etanol (Figura 9.4).

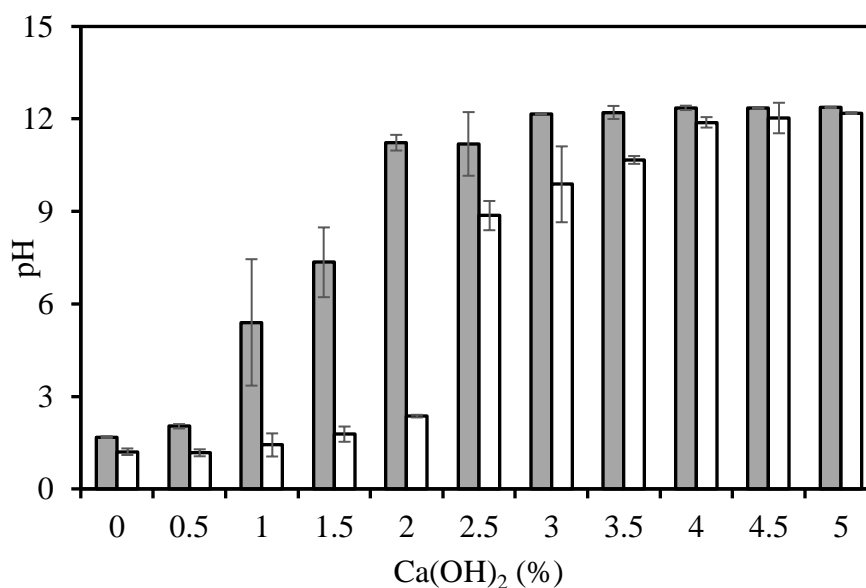
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sin embargo, al pretratar con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a concentraciones de 1 y 2 % se obtienen valores de pH de  $1.68 \pm 0.03$  y  $1.21 \pm 0.11$ , respectivamente. La mayoría de las levaduras muestran un pH óptimo de 4 a 6 para la producción de etanol (Converti y col., 1989). Por lo que valores de pH menores a 4 representan un problema en la etapa de producción de etanol a escala laboratorio.

Por lo tanto, se ajustó el pH de la MSE con hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) con una variación en la concentración de 0.5 % p/p (Figura 10.3).

Con una concentración entre 1 y 1.5 % de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se puede ajustar el pH entre  $5.40 \pm 2.05$  y  $7.35 \pm 1.13$  de la MSE con 1 % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Con una concentración entre 2 y 2.5 % de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se puede ajustar el pH entre  $2.36 \pm 0.04$  y  $8.87 \pm 0.47$  de la MSE con 2 % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Figura 10.3).

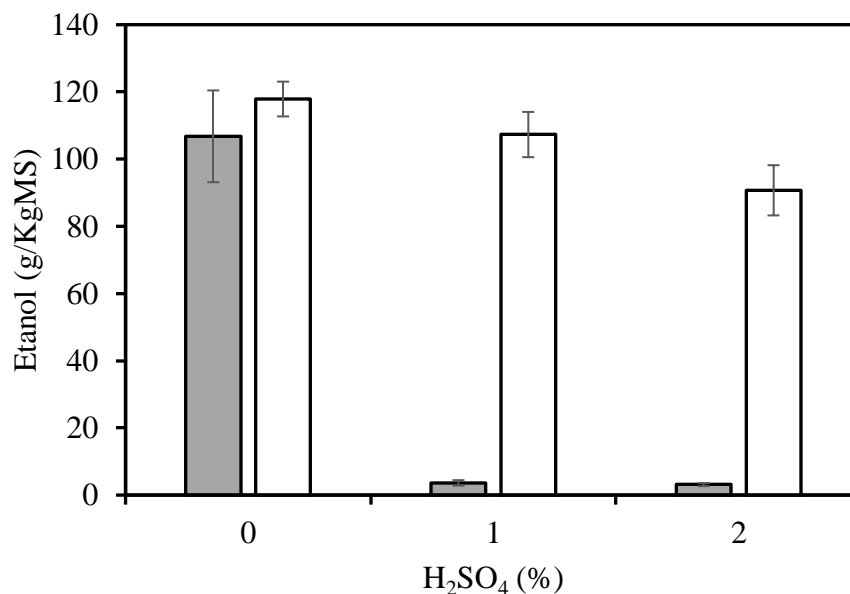
En ambos casos el ajuste del pH fue erróneo, esto se debe a que la MSE no se encontraba en suspensión por lo que fue muy susceptible a las variaciones en la concentración de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Para ajustar el pH de la MSE con el pretratamiento a las concentraciones de 1 y 2 % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , se utilizaron las concentraciones de 1.5 y 2.5 % de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , respectivamente, con la finalidad de evitar valores de pH ácidos.



**Figura 10.3.** Ajuste del pH con hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) de una mezcla sólida estándar de FORSU con pretratamiento térmico con un  $\text{FS}=2.35$  ( $2.7 \text{ kg}/\text{cm}^2\text{-15 min}$ ) y con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a concentración del 1 (barras grises) y 2 % (barras blancas).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 10.4 se observa la concentración final de etanol de la fermentación de la MSE pretratada con FSC de 2.35, 0.67 y 1.14 sin y con ajuste de pH, usando *S. cerevisiae* ITD00196 en CMS.



**Figura 10.4.** Concentración de etanol en la fermentación de una mezcla sólida estándar utilizada con pretratamiento térmico con un FS=2.35 ( $2.7 \text{ kg/cm}^2\text{-15 min}$ ) y con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a concentración de 0, 1 y 2 %, sin ajuste de pH (barras grises) y con ajuste de pH (barras blancas) usando la levadura *S. cerevisiae* ITD00196.

En la producción de etanol sin ajuste de pH de la MSE con un pretratamiento térmico (SF=2.35) y con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a concentración de 1 y 2 % (SFC=0.67 y 1.14), se obtuvieron valores de pH iniciales de  $5.55\pm 0.81$ ,  $1.89\pm 0.19$  y  $1.52\pm 0.20$ ; y una producción de etanol de  $106.78\pm 13.65$ ,  $3.62\pm 0.81$  y  $3.13\pm 0.47$  g/kg MS, respectivamente.

Debido a la baja concentración de etanol obtenida, la MSE pretratada termoquímicamente (SFC= 0.67) a una concentración del 1 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se ajustó el pH con 1.5g de Ca(OH)<sub>2</sub> y a una concentración del 2 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (SF=1.14) con 2.5g de Ca(OH)<sub>2</sub> por cada 100g de sustrato.

Con el ajuste de pH de la MSE, se obtuvieron valores de pH iniciales de  $5.82\pm 0.02$ ,  $5.95\pm 0.43$  y  $3.99\pm 0.67$ ; y una producción de etanol de  $117.88\pm 5.18$ ,  $107\pm 6.73$  y  $90.71\pm 7.47$  g/kg MS, respectivamente.

La MSE pretratada térmicamente, con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sin ajuste de pH no es un sustrato adecuado para la producción de etanol en CMS. Sin embargo, se observa que con el ajuste de pH y al aumentar la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se obtiene una disminución en la producción de etanol, esto pudo ser debido al mal ajuste de pH en la MSE y a la presencia de inhibidores.

### 10.7. Conclusiones del pretratamiento térmico de la MSE

El pretratamiento térmico optimizado de una mezcla sólida estándar que contiene el 93 % de la FORSU, aumenta la concentración de CF, reduce los niveles de contaminantes microbianos y el ácido acético presente de forma natural en las frutas, aumentando así la producción de etanol.

El FS de 2.35 y los FSC de 0.67 y 1.14, representaron las condiciones más adecuadas para el pretratamiento de la MSE. Con un FS de 2.35 se obtuvo un aumento del 68 % en la liberación de la concentración de CF en comparación con las condiciones sin pretratamiento térmico y a las condiciones de ETE. Con un FSC de 1.14 se obtuvo un aumento del 155 % en la liberación de los CF de la MSE, comparado con las condiciones sin pretratamiento térmico y a las condiciones de ETE. Sin embargo, debido a la dificultad de ajustar el pH de un sustrato sólido, no es viable utilizar esta condición para la producción de etanol (FSC 0.67 y 1.14).

El FS y el FSC son un criterio práctico para la comparación del pretratamiento térmico utilizado en la mezcla sólida estándar de la FORSU y su conversión a etanol.

La adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el pretratamiento térmico de una mezcla sólida estándar de la FORSU disminuye la producción de etanol en todas las levaduras estudiadas.

Para los siguientes ensayos de producción de etanol en cultivo en medio sólido, se utilizó un pretratamiento térmico con un FS de 2.11 (2.2 kg/cm<sup>2</sup> - 12 min) a escala de laboratorio; y un FS de 2.35 (2.7 kg/cm<sup>2</sup> - 15 min) a escala de laboratorio y piloto. Los cultivos axénicos de las levaduras estudiadas y el cultivo mixto se utilizaron como inóculos a escala de laboratorio y piloto.

### 11. Evaluación del potencial de la FORSU pretratada para la producción de etanol

Se evaluó la producción de etanol a partir de la MSE pretratada térmicamente con un FS de 2.11 y 2.35, sin la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, así como con un FSC de 0.67 y 1.14 con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a una concentración de 1 y 2 % p/p, respectivamente, utilizando un biorreactor tubular a escala laboratorio. A escala piloto se evaluó la fermentación de MSE sin pretratamiento térmico (25 kg) utilizando un biorreactor con un tornillo sin fin y con pretratamiento térmico con un FS de 2.35 (18 kg) utilizando un biorreactor con listones helicoidales. Se utilizaron cultivos axénicos y un cultivo mixto compuesto por *S. cerevisiae* ITD00196, *S. stipitis* ATCC58785 y *Schw. occidentalis* ATCC26077. El cultivo mixto estuvo compuesto por *S. cerevisiae* ITD00196 que fue seleccionada por su alta productividad de etanol, *Schw. occidentalis* ATCC26077 por su producción de enzimas amilolíticas y *S. stipitis* ATCC58785 por la utilización de xilosa y glucosa para la producción de etanol (Horn y col., 1992; Saucedo-Castañeda y col., 1992; Negro y col., 2014).

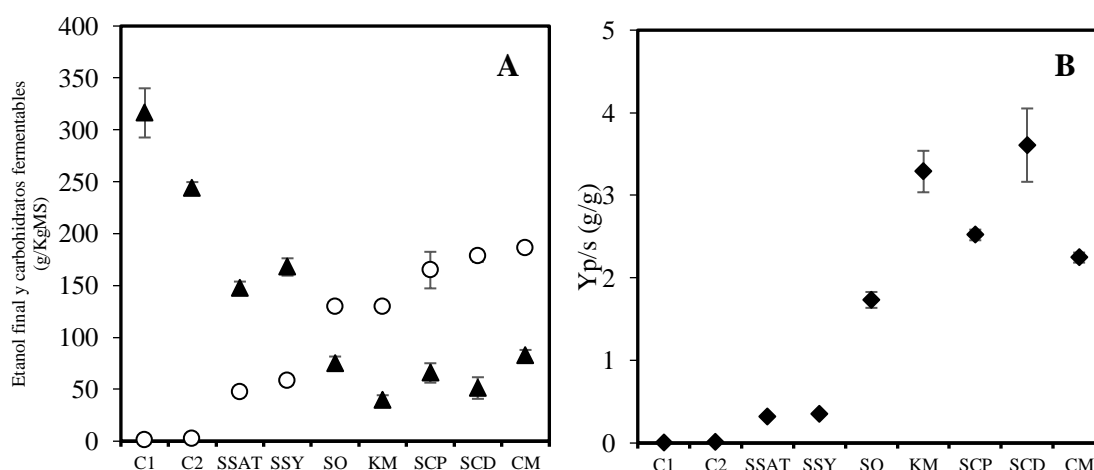
#### 11.1 Producción de etanol por cultivo en medio sólido a partir de la FORSU a escala laboratorio

Los resultados de la producción de etanol y la concentración de los carbohidratos fermentables en la fermentación de la MSE con un pretratamiento térmico con un FS de 2.11 (2.2 kg/cm<sup>2</sup>-12 min) sin adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se presentan en la Figura 11.1A. Se utilizaron dos controles no inoculados al momento inicial de la fermentación (C1) y después de 30 h (C2) de incubación. Se detectaron concentraciones bajas de etanol, en los ensayos control no inoculados, de 0.92±0.35 (C1) y 2.47±0.18 g/kg MS (C2). Esto explica porque el pretratamiento térmico disminuye la carga microbiana endógena del sustrato.

La producción de etanol a partir de la MSE se incrementó al utilizar los cultivos de *S. stipitis* ATCC58785 (47.29±2.02 g/kg MS); *S. stipitis* Y-17104 (58.56±4.56 g/kg MS); *Schw. occidentalis* ATCC26077 (129.44±0.89 g/kg MS); *K. marxianus* CBS6556 (129.63±0.27 g/kg MS); *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) (164±17.61 g/kg MS); *S. cerevisiae* ITD00196 (178.29±5.36 g/kg MS) y el cultivo mixto presentó la concentración más alta de etanol (185.92±4.04 g/kg MS) (Figura 11.1A).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto a los CF, se obtuvo una concentración inicial de  $316.31 \pm 23.71$  g/kg MSI y al final de la fermentación (30 h) se obtuvieron concentraciones de CF residuales entre  $39.90 \pm 4.39$  y  $82.98 \pm 4.98$  g/kg MSI. Los carbohidratos fermentables residuales de *S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104 fueron de  $147.75 \pm 6.04$  y  $167.88 \pm 8.35$  g/kg MSI, respectivamente, mayores a las concentraciones residuales en el resto de las levaduras (Figura 11.1B). Esto pudo ser debido a la baja velocidad de asimilación de carbohidratos que presentan estas levaduras, las cuales presentaron la menor producción de etanol en los ensayos preliminares de producción de etanol sin pretratamiento térmico (Figura 9.4).



**Figura 11.1.** Concentración final de etanol (○) y carbohidratos fermentables (▲) en la fermentación de una mezcla sólida estándar de FORSU con pretratamiento térmico con un  $FS=2.11$  ( $2.2 \text{ kg/cm}^2\text{-}12 \text{ min}$ ) sin  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (A) y Rendimiento de producción (◆) por consumo de sustrato ( $Y_{p/s}$ ) (B). Control 1 (C1) a tiempo inicial; Control 2 (C2) a tiempo final (30 h); *S. cerevisiae* ITD00196 (SCD); *S. cerevisiae* (levadura de panadería) (SCP); *S. stipitis* ATCC58785 (SSAT); *Schw. occidentalis* ATCC26077 (SO); *S. stipitis* Y-17104 (SSY); *K. marxianus* CBS6556 (KM); Cultivo mixto (CM).

En general, el pretratamiento térmico con  $FS=2.11$  mejoró la producción de etanol comparado con los experimentos donde no se empleó un pretratamiento térmico (Figura 9.4). Se calcularon los rendimientos de producción de etanol por consumo de sustrato ( $Y_{p/s}$ ) para cada una de las condiciones a partir de los cultivos axénicos y mixtos. Se observa que con las levaduras *Schw. occidentalis* ATCC26077, *K. marxianus* CBS6556, *S. cerevisiae* (Levadura de panadería), *S. cerevisiae* ITD00196 y con el cultivo mixto, se obtienen rendimientos por arriba del teórico (0.51). Esto puede ser debido a la heterogeneidad del sustrato, ya que la muestra tomada para la determinación de carbohidratos fermentables no es representativa de todo el sustrato. Solo en el



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

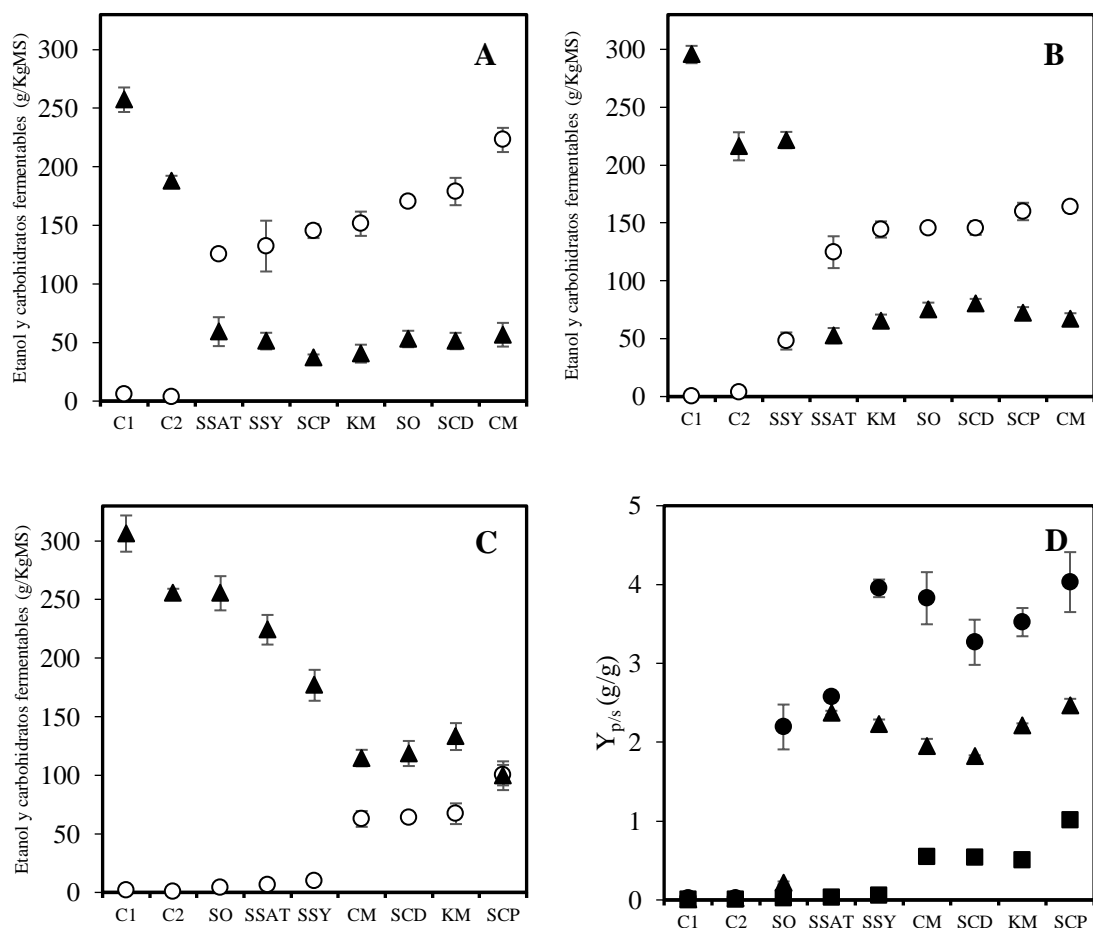
caso de *S. stipitis* ATCC58785 ( $0.32\pm 0.00$ ) y *S. stipitis* Y-17104 ( $0.35\pm 0.01$ ) se obtienen rendimientos por debajo del teórico. Sin embargo, una alta concentración de carbohidratos fermentables fue determinada al final de la fermentación (Figura 11.1B).

En la Figura 11.2 se presenta la producción de etanol y la concentración de CF en la fermentación de la MSE con un FSC de 2.35, 0.67 y 1.14 y con  $H_2SO_4$  a concentraciones de 0, 1 y 2 % p/p. El pH de la MSE pretratada térmicamente con  $H_2SO_4$  a las concentraciones de 1 y 2 % p/p, se ajustó con la adición de  $Ca(OH)_2$  de 1.5 y 2.5 % p/p, respectivamente. Se utilizaron dos controles no inoculados, al momento inicial de la fermentación (C1) y después de 30 h (C2) de incubación. En el control C1 se obtuvieron concentraciones de etanol de  $5.67\pm 0.21$ ,  $0.16\pm 0.11$  y  $1.58\pm 0.11$  g/kg MS; y para el control C2 se obtuvieron concentraciones de etanol de  $3.66\pm 0.54$ ,  $3.54\pm 0.00$  y  $0.60\pm 0.23$  g/kg MS en la fermentación de la MSE con pretratamiento térmico y con contenidos de  $H_2SO_4$  de 0, 1 y 2 %, respectivamente.

La producción de etanol a partir de la MSE pretratada térmicamente (FS=2.35) y sin la adición de  $H_2SO_4$  (Figura 11.2A) se incrementó gradualmente al utilizar *S. stipitis* ATCC58785 ( $125\pm 3.23$  g/kg MS); *S. stipitis* Y-17104 ( $132.35\pm 21.69$  g/kg MS); la *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) ( $145.13\pm 5.94$  g/kg MS); *K. marxianus* CBS6556 ( $151.43\pm 10.36$  g/kg MS); *Schw. occidentalis* ATCC26077 ( $170.42\pm 1.50$  g/kg MS); *S. cerevisiae* ITD00196 ( $178.95\pm 11.67$  g/kg MS) y el cultivo mixto (*S. cerevisiae* ITD00196, *S. stipitis* ATCC58785 y *Schw. occidentalis* ATCC26077) presentó la concentración mayor de etanol ( $222.98\pm 10.33$  g/kg MS). Se obtuvo una concentración de CF inicial de  $257.34\pm 10.48$  g/kg MSI y al final de la fermentación (30 h) y se obtuvo una concentración de CF residuales entre  $36.84\pm 2.97$  y  $59.29\pm 12.34$  g/kg MSI. En general, se observa un mayor consumo de carbohidratos en la fermentación de la MSE con pretratamiento térmico con un FS=2.35 (Figura 11.2A)

Como patrón general, se obtuvo una mayor producción de etanol con un FS de 2.35 que con un FS de 2.11. En estas condiciones (FS=2.35), se observó un aumento del 20 % en la producción de etanol al usar el cultivo mixto. En el caso de las levaduras *S. stipitis* y la levadura *Schw. occidentalis* ATCC26077, la producción de etanol aumenta a medida que aumenta el FS. En el caso de *S. cerevisiae* ITD00196, no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se aplicaron los diferentes FS para la producción de etanol (Figura 11.1A y 11.2A).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 11.2.** Concentración final de etanol (○) y carbohidratos fermentables (▲) en la fermentación de una mezcla sólida estándar de FORSU con pretratamiento térmico con un FS=2.35, 0.67 y 1.14 y a concentración de 0(A), 1(B) y 2%(C) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rendimiento de producción de etanol por consumo de los CF (Y<sub>p/s</sub>) (D) a concentración de 0 (●), 1 (▲) y 2% (■) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Control 1 (C1) a tiempo inicial; Control 2 (C2) a tiempo final (30 h); *S. cerevisiae* ITD00196 (SCD); *S. cerevisiae* (levadura de panadería) (SCP); *S. stipitis* ATCC58785 (SSAT); *Schw. occidentalis* ATCC26077 (SO); *S. stipitis* Y-17104 (SSY); *K. marxianus* CBS6556 (KM); Cultivo mixto (CM).

Al aplicar un pretratamiento térmico, se detectaron compuestos inhibitorios productos del pretratamiento, como el ácido acético, probablemente procedentes de la hidrólisis de los grupos acetilo (Negro y col., 2014). El ácido acético disminuye a medida que aumenta el FS. Aplicando un FS de 2.11 se observó una concentración de ácido acético entre  $14.19 \pm 1.69$  y  $23.22 \pm 1.20$  g/kg MSI y con un FS de 2.35 se observó una concentración de ácido acético entre  $3.31 \pm 1.22$  y  $6.69 \pm 2.75$  g/kg MSI. En ambos casos, no se obtuvo una concentración inhibitoria de ácido acético ( $< 0.57 \pm 0.03$  g/L). A mayor FS la disminución en la concentración de ácido acético puede deberse a la volatilidad del inhibidor.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En la producción de etanol a partir de la MSE de la FORSU pretratada con FSC de 0.67, se pudo observar un incremento al utilizar los cultivos de *S. stipitis* Y-17104 ( $48.01 \pm 7.40$  g/kg MS); *S. stipitis* ATCC58785 ( $124.75 \pm 13.75$  g/kg MS); *K. marxianus* CBS6556 ( $144.36 \pm 6.99$  g/kg MS); *Schw. occidentalis* ATCC26077 ( $145.50 \pm 2.12$  g/kg MS); *S. cerevisiae* ITD00196 ( $145.61 \pm 5.92$  g/kg MS); *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) ( $159.90 \pm 7.53$  g/kg MS) y nuevamente el cultivo mixto presentó la mayor concentración de etanol ( $163.92 \pm 4.73$  g/kg MS) (Figura 11.2B). La producción de etanol se llevó a cabo en un intervalo de pH entre  $5.52 \pm 0.72$  y  $7.01 \pm 0.35$ , valores muy cercanos a lo obtenido en la MSE de la FORSU fresca sin inoculación ( $7.30 \pm 2.79$ ). Se obtuvo una concentración inicial de CF de  $295.52 \pm 7.49$  g/kg MSI y al final del tiempo de fermentación (30 h) se obtuvo una concentración de CF residuales entre  $52.65 \pm 6.58$  y  $80.13 \pm 4.26$  g/kg MSI.

Solo con *S. stipitis* Y-17104 se obtuvo una concentración final elevada de carbohidratos fermentables ( $221.62 \pm 7.06$  g/kg MSI) (Figura 11.2B). La alta concentración de carbohidratos residuales que presenta las levaduras *S. stipitis* puede ser debido a la presencia de inhibidores, al  $H_2SO_4$  o al bajo rendimiento de producción de etanol en CMS. Se obtuvo una concentración de ácido acético entre  $8.55 \pm 1.37$  y  $24.52 \pm 6.18$  g/kg MS. La concentración de ácido acético en g/L fue de:  $0.89 \pm 0.22$  y es considerada no inhibitoria. En estos ensayos, no se detectó la presencia de furfural ni de HMF.

En la producción de etanol a partir de la MSE de la FORSU pretratada con un FSC de 1.14, se observa un incremento al utilizar los cultivos de *Schw. occidentalis* ATCC26077 ( $4.33 \pm 1.22$  g/kg MS); *S. stipitis* ATCC58785 ( $6.50 \pm 0.75$  g/kg MS); *S. stipitis* Y-17104 ( $9.57 \pm 2.17$  g/kg MS); cultivo mixto ( $62.75 \pm 6.75$  g/kg MS); *S. cerevisiae* ITD00196 ( $63.75 \pm 3.48$  g/kg MS); *K. marxianus* CBS6556 ( $67.21 \pm 8.84$  g/kg MS) y la levadura *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) presentó la concentración más alta de etanol ( $100.14 \pm 8.73$  g/kg MS) (Figura 11.2C).

La producción de etanol se llevó a cabo en un intervalo de pH entre  $3.82 \pm 0.15$  y  $5.84 \pm 0.50$ , valores muy cercanos a lo obtenido en la MSE fresca sin inoculación ( $5.98 \pm 2.28$ ). Se obtuvo una concentración de carbohidratos fermentables inicial de  $306.41 \pm 15.47$  g/kg MSI y al final del tiempo de fermentación (30 h) se obtuvieron concentraciones de CF residuales entre  $99.66 \pm 12.28$  y  $255.44 \pm 14.61$  g/kg MSI (Figura 11.2C). En las fermentaciones de la MSE con FSC de 0.67 (Figura 11.2B) y 1.14 (Figura 11.2C) se pudo observar una disminución en la producción de etanol, comparado con el FS de 2.35, sin la adición de  $H_2SO_4$  (Figura 11.2A). Se obtuvo una concentración

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

de ácido acético entre  $3.91 \pm 0.42$  y  $16.15 \pm 1.92$  g/kg MS. La concentración de ácido acético en g/L fue de:  $0.67 \pm 0.08$  g/L, esta concentración es no inhibitoria.

A estas condiciones (FSC=1.14) se detectó HMF un intervalo concentraciones entre  $1.00 \pm 0.01$  y  $4.46 \pm 1.69$  g/kg MSI. La concentración de HMF en g/L es:  $0.23 \pm 0.09$ , este valor se encuentra por debajo del límite superior de inhibición (0.3 g/L) reportado por Negro y col. (2014).

De nuevo, se observan rendimientos  $Y_{p/s}$  superiores al rendimiento teórico (0.51) en la producción de etanol al fermentar la MSE de la FORSU con un FS de 2.35 y con un FSC de 0.67 (Figura 11.2D). Sin embargo, al utilizar un FSC de 1.14 los rendimientos son más congruentes, esto puede ser debido a la cantidad de carbohidratos fermentables sin consumir. También, los rendimientos más altos pueden deberse a las deficiencias en el método de extracción de los carbohidratos y al no contar con un sustrato homogéneo o en solución acuosa. Con los resultados obtenidos se indica que la mayor producción de etanol se obtuvo utilizando el cultivo mixto como inóculo en la fermentación de la MSE pretratada con un FS de 2.35 y sin la adición de  $H_2SO_4$ , alcanzando una concentración de  $222.98 \pm 10.33$  g/kg MS. Esta alta concentración de etanol podría deberse a que el pretratamiento térmico antes de la fermentación aumenta la liberación de CF, disminuye el contenido de ácido acético y reduce la presencia de contaminantes microbianos.

Con un cultivo mixto se evita el uso de microorganismos genéticamente modificados y se aprovechan las características fermentativas de levaduras silvestres especialmente aisladas para la producción de etanol (Bader y col., 2010). Se ha reportado la producción de enzimas amilolíticas para los cultivos de la levadura *Schw. occidentalis* ATCC26077 y de la producción de etanol a partir de glucosa y xilosa por parte de la levadura *S. stipitis* ATCC58785; esto podría explicar también la mayor concentración de etanol empleando el cultivo mixto, aunque estas levaduras tienen una baja tolerancia al etanol (Saucedo-Castañeda y col., 1992; Negro y col., 2014). Además, la presencia de *S. cerevisiae* ITD00196 en el cultivo mixto explicaría la mayor concentración de etanol encontrada (Jeong y col., 2012).

En los ensayos siguientes se monitoreo la cinética de producción a escala laboratorio y piloto. A escala laboratorio se utilizó la MSE pretratada con un FS de 2.35 y el cultivo mixto como inóculo. A escala piloto se utilizaron dos tipos de biorreactores: el primero que se utilizó fue uno compuesto con un tornillo sin fin en el cual, se utilizó la MSE sin pretratamiento térmico y la levadura *S. cerevisiae* ITD00196 como inóculo y el segundo fue uno compuesto con listones

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

helicoidales en el cual, se utilizó la MSE pretratada con un FS de 2.35 y el cultivo mixto como inóculo, condiciones similares a las utilizadas a escala laboratorio.

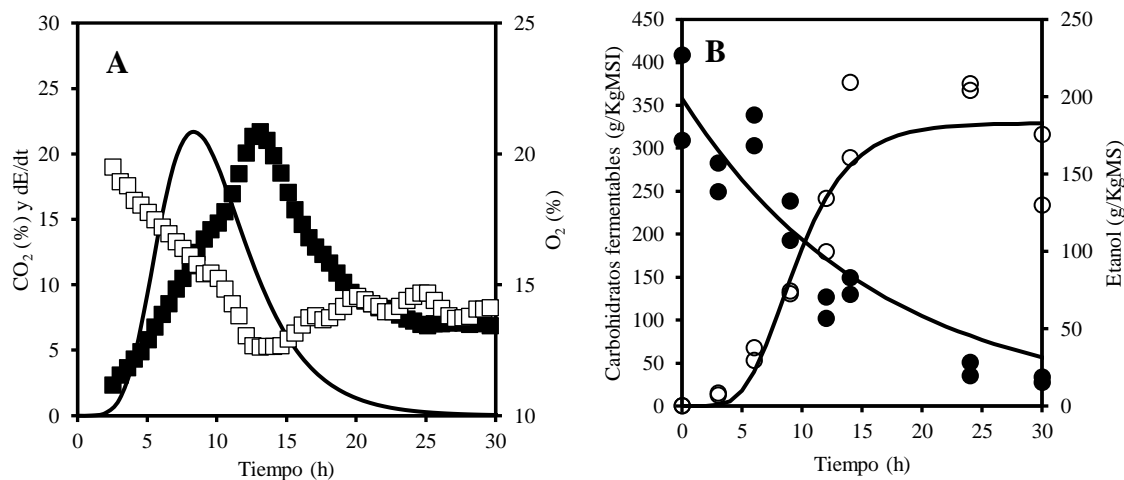
### 11.2 Cinética de producción de etanol por cultivo en medio sólido a partir de la FORSU a escala laboratorio

Una vez seleccionadas las condiciones de pretratamiento térmico (FS=2.35) y el tipo de inóculo (cultivo mixto), se realizaron estudios cinéticos de producción de CO<sub>2</sub>, de etanol, consumo de O<sub>2</sub> y de CF a escala laboratorio (Figura 11.3). Se observa que la concentración máxima de CO<sub>2</sub> (22.6 %), se alcanzó a las 12 h de cultivo (Figura 11.3A). El aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza (headspace) del biorreactor, se debe a la generación de CO<sub>2</sub> durante la conversión de los carbohidratos fermentables a etanol. El análisis en línea de la fase gaseosa, sin perturbar el sistema, proporciona un proceso de control útil para determinar el final del proceso (Saucedo-Castañeda y col., 1994).

La reducción en la concentración de O<sub>2</sub> en el espacio de cabeza en el biorreactor tubular, es un resultado combinado del consumo de O<sub>2</sub> para el crecimiento de levaduras durante las primeras horas de fermentación (4 h) a condiciones aerobias y el efecto de la dilución por el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub>. La correlación de la tasa de producción de etanol y la concentración de CO<sub>2</sub> con respecto al tiempo, proporciona un panorama de control de proceso (Figura 11.3A). El consumo de los CF fue simulado utilizando una cinética de decaimiento de primer orden, donde el coeficiente de determinación fue de 0.898 (Figura 11.3B). Los valores de la constante de primer orden ( $k$ ) fue de  $0.06 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  (Ecuación 6.14). La producción de etanol se simuló usando el modelo de Gompertz, esta ecuación sigmoideal es un modelo flexible, ya que permite modelar la producción de etanol sin que exista simetría alrededor del punto de inflexión (Ecuación 6.16). La bondad de ajuste se evaluó a través del coeficiente de correlación entre los datos experimentales y los calculados por el modelo de la concentración de etanol. El coeficiente de correlación fue de 0.96 a escala laboratorio.

La concentración más alta de etanol ( $205.96 \pm 3.17 \text{ g/kg MS}$ ) se alcanzó a las 24 h y se debe al rápido consumo de los CF más la liberación de los CF por las enzimas amilolíticas producidas por *Schw. occidentalis*, a partir de parte del material amiláceo presente en el MSE inicial (Figura 11.3B).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 11.3.** Concentración de CO<sub>2</sub> (■), concentración de O<sub>2</sub> (□) (A) en el espacio de cabeza del biorreactor; las líneas sólidas representan la tasa de producción de etanol (dE/dt) simulada con el modelo de Gompertz. Consumo de carbohidratos fermentables (●) y producción de etanol (○) (B) durante la fermentación de una mezcla sólida estándar de FORSU con pretratamiento térmico con un FS=2.35 usando cultivo mixto a escala laboratorio. Las líneas sólidas representan el ajuste del modelo de primer orden para el consumo de los carbohidratos fermentables y el ajuste del modelo integral de Gompertz para la producción de etanol.

En la producción de etanol a partir de la MSE a escala piloto, se realizaron dos ensayos utilizando un biorreactor tipo tornillo sin fin (BTSF, 25 kg) sin pretratamiento térmico usando *S. cerevisiae* ITD00196 como inóculo y posteriormente, se utilizó un biorreactor con listones helicoidales (BLH, 18 kg) con la MSE pretratada con un FS de 2.35 y usando el cultivo mixto como inóculo, ya referido en la sección 11.2.

### 11.3 Cinética de la producción de etanol por cultivo en medio sólido a partir de la FORSU a escala piloto en un biorreactor con un tornillo sin fin (BTSF)

Los ensayos en el BTSF se realizaron con el propósito de evaluar el potencial de producir etanol con este tipo de biorreactor, para ello se monitoreo la producción de CO<sub>2</sub>, de etanol, consumo de O<sub>2</sub> y de carbohidratos fermentables a escala laboratorio (Figura 11.4).

En los dos ensayos realizados en el BTSF, se obtuvieron perfiles similares para las concentraciones de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (Figura 11.4A y 11.4C) en el espacio de cabeza de biorreactor. Sin embargo, en el primer ensayo (Figura 11.4A) la concentración máxima de CO<sub>2</sub> (44.17 %) se obtuvo a las 26 h de cultivo y en el segundo ensayo (Figura 11.4C) a las 16 h (46.27 %). Esta diferencia en el tiempo necesario para alcanzar la producción máxima de CO<sub>2</sub>, podría deberse a la heterogeneidad de la MSE de cada lote. En el segundo lote la concentración de CF fue mayor lo

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

que puede explicar las diferencias. La disponibilidad de los CF depende de las características de los residuos orgánicos utilizada en cada ensayo. Se observó un aumento del 105 % en la concentración de CO<sub>2</sub> a escala piloto con el uso del BTSF, comparado con lo obtenido a escala laboratorio (22.6 %) como se muestra en la Figura 11.3.

Esto pudo ser debido a la contaminación del sustrato por la presencia de microorganismos que consumen los CF para la producción de otros compuestos que no son de interés, pero también, la agitación en el BTSF, pudo ayudar a la homogenización de la FORSU y mejorar la rapidez del proceso. La alta concentración de CO<sub>2</sub> no indicaría una mayor concentración de etanol debido a que no tenemos únicamente microorganismos productores de etanol en la MSE.

Con la ecuación de decaimiento de primer orden, fue posible simular el consumo de los carbohidratos fermentables. Los coeficientes de determinación fueron de 0.90 y 0.99, para el primer y segundo ensayo (Figuras 11.4B y 11.4D), respectivamente.

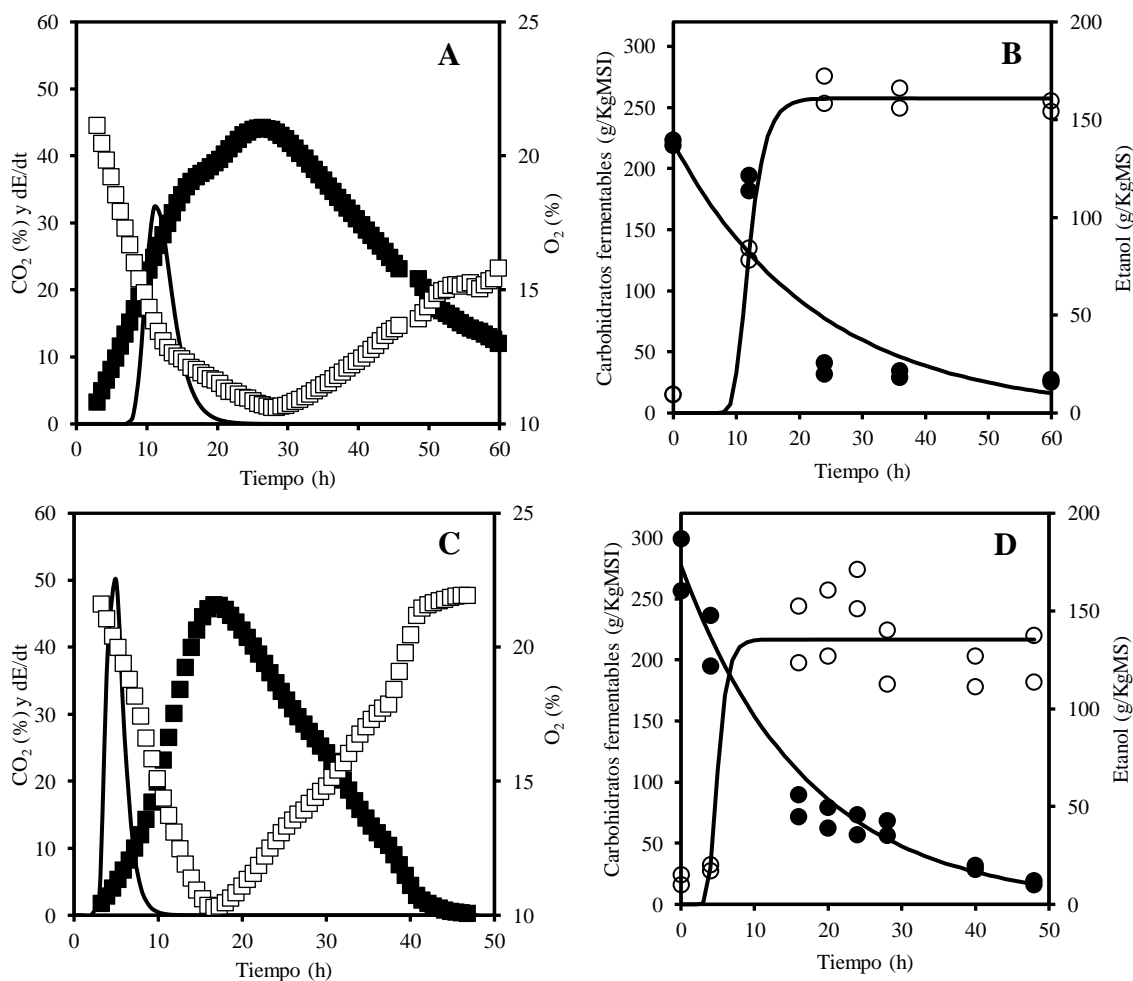
Los valores de las  $k$  fueron de 0.55 y 1.07 h<sup>-1</sup>, lo que podría indicar un comportamiento bioquímico diferente, debido posiblemente a la ausencia de un tratamiento térmico que mejore el control del proceso al eliminar contaminantes.

Sin embargo, la máxima producción de etanol fue de 165.03±9.90 y 160.95±14.40 g/kg MS, para el primer y segundo ensayo, respectivamente, a las 24 h de cultivo. Con el modelo de Gompertz fue posible simular la producción de etanol obteniendo coeficientes de correlación de 0.99 y 0.95, respectivamente.

La simulación de los datos experimentales describe una tendencia general similar del patrón de fermentación en biorreactores de laboratorio y a escala piloto. Considerando la volatilidad del etanol y la heterogeneidad del sistema, la simulación del consumo de carbohidratos fermentables y de la producción de etanol consideramos que es satisfactoria en función de los coeficientes de determinación y correlación obtenidos.

Una descripción cinética adecuada del proceso es fundamental para el diseño del biorreactor (Levenspiel, 1999). Con estos resultados se demuestra la posibilidad de producir etanol con un biorreactor con un tornillo sin fin utilizando 25 kg de MH de la MSE sin pretratamiento térmico, sin embargo se encontraron diferencias que pudieran ser disminuidas con un mejor control del proceso, usando por ejemplo, un pretratamiento térmico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 11.4.** Concentración de CO<sub>2</sub> (■), concentración de O<sub>2</sub> (□) (A y C) en el espacio de cabeza del biorreactor; las líneas sólidas representan la tasa de producción de etanol (dE/dt) simulada con el modelo de Gompertz. Consumo de carbohidratos fermentables (●) y producción de etanol (○) (B y D) durante la fermentación de la mezcla sólida estándar de FORSU con pretratamiento térmico usando *S. cerevisiae* ITD00196 a escala piloto en un biorreactor con un tornillo sin fin (25kg). Las líneas sólidas representan el ajuste del modelo de primer orden para el consumo de los carbohidratos fermentables y el ajuste del modelo integral de Gompertz para la producción de etanol.

### 11.4 Cinética de la producción de etanol por cultivo en medio sólido a partir de la FORSU a escala piloto en un biorreactor de listones helicoidales (BLH)

Para continuar con los ensayos a escala piloto, se realizaron estudios cinéticos de producción de CO<sub>2</sub>, de etanol, consumo de O<sub>2</sub> y de carbohidratos fermentables en un biorreactor con listones helicoidales a partir de la fermentación de 18 kg en base húmeda de la MSE pretratada con un FS de 2.35 y empleando el cultivo mixto como inóculo (Figura 11.5).

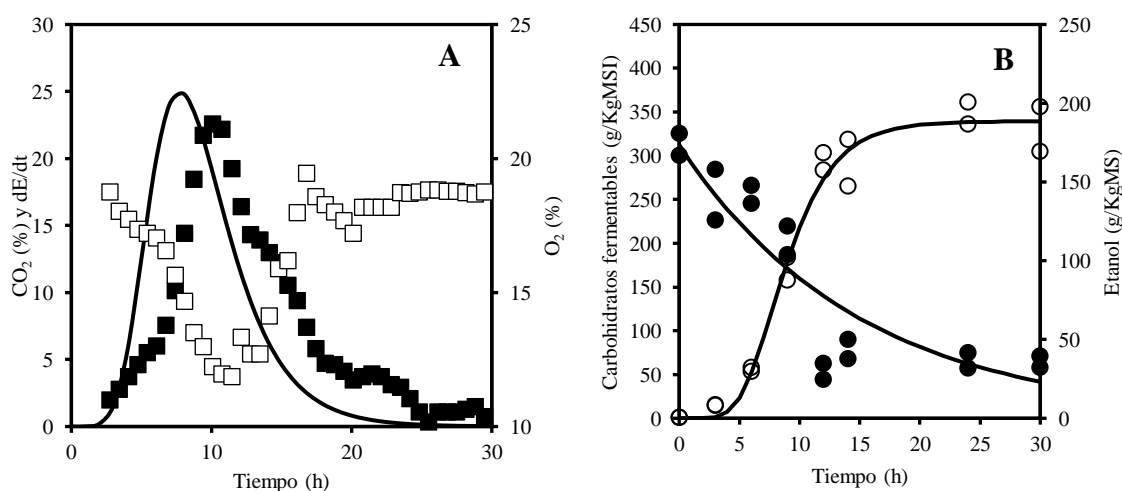
Se obtuvo una concentración máxima de CO<sub>2</sub> (27.9 %) a las 8 h de cultivo (Figura 11.5A). Este perfil es similar pero más rápido a lo obtenido a escala laboratorio (Figura 11.3A). La



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

disminución en la concentración de  $\text{CO}_2$ , comparado con el perfil (44-46 %) obtenido en el BTSF (Figura 11.4), es debida muy probablemente al pretratamiento térmico de la MSE.

Con la simulación del consumo de los carbohidratos fermentables (ecuación de decaimiento de primer orden) se pudo determinar que el coeficiente de determinación fue de 0.86 y el valor de la  $k$  de  $0.07 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ , este resultado es similar a lo obtenido a escala laboratorio ( $0.06 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ ), lo cual que indicaría un comportamiento bioquímico similar a escala laboratorio y piloto. Se llevó a cabo con éxito un escalamiento, desde nivel laboratorio (BRT) hasta nivel piloto (BRLH), con un factor de escala cercano a 180. La producción máxima de etanol se alcanzó a las 24 h y fue de  $193.56 \pm 10.10 \text{ g/kg MS}$ . Con la simulación de la producción de etanol (modelo de Gompertz) se pudo obtener que el coeficiente de correlación entre los datos experimentales y los datos calculados de la concentración de etanol fue de 0.99 (Figura 11.5B).



**Figura 11.5.** Concentración de  $\text{CO}_2$  (■), concentración de  $\text{O}_2$  (□) (A) en el espacio de cabeza del biorreactor; las líneas sólidas representan la tasa de producción de etanol ( $dE/dt$ ) simulada con el modelo de Gompertz. Consumo de carbohidratos fermentables (●) etanol (○) (B) durante el CMS de una mezcla sólida estándar de FORSU, tratada con un pretratamiento térmico con un  $FS=2.35$  usando un cultivo mixto como inóculo a escala piloto usando un biorreactor de listones helicoidales (18kg). Las líneas sólidas representan el ajuste del modelo de primer orden para el consumo de los carbohidratos fermentables y el ajuste del modelo integral de Gompertz para la producción de etanol.

El BLH utilizado a escala piloto no es completamente hermético, por lo que al utilizar agitación intermitente pueden aparecer pérdidas de etanol debidas a la evaporación.

El ajuste del modelo utilizado en la simulación de la producción de etanol es menor a escala piloto, sin embargo, el análisis de datos experimentales indicó que la evaporación del etanol en el biorreactor a escala piloto, podría explicar la mayor concentración a escala de laboratorio.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Se observó una diferencia del 6.4 % a 24 h (Figura 11.3B y 11.5B) y de 15.2 % a 30 h (Tabla 11.2) entre la producción de etanol a escala laboratorio y piloto. Si la duración del proceso es superior a 24 h, pueden producirse pérdidas de etanol por evaporación o reasimilación de éste para ser usado como sustrato por la biomasa celular. Las diferencias entre las escalas de laboratorio y piloto son pequeñas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

### **11.5 Comparación de la producción de etanol por CMS a partir de residuos orgánicos a escala de laboratorio y piloto**

En la Tabla 11.1 se presenta un resumen de todos los datos de producción de etanol a escala laboratorio y piloto de este trabajo. Los ensayos a escala laboratorio indican que se puede alcanzar una producción de etanol entre 185.92 – 222.98 g de etanol por kg de MS utilizando un FS de 2.35 y un cultivo mixto.

Estas concentraciones son cercanas a la producción de etanol (186.36 – 193.56 g/kg MS) alcanzada a escala piloto. La mayor producción de etanol se obtuvo aplicando un FS de 2.35 y no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se aplicó un FS de 2.11 a escala de laboratorio. La aplicación de un tratamiento térmico es esencial para el control del proceso.

La comparación de los resultados no es fácil debido a las diferencias en la escala utilizada, la naturaleza de los residuos orgánicos y las características del bioproceso utilizado para la producción de etanol (Tabla 11.2). La MSE utilizada en este trabajo es una fuente de CF para la producción directa de etanol, sin la separación de los carbohidratos en una fase líquida. Se han realizado varios estudios sobre el uso de residuos orgánicos como sustrato para la producción de etanol.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 11.1.** Producción de etanol a escala laboratorio y piloto a diferentes condiciones de pretratamiento.

Tipo de biorreactor		Levadura	Condiciones kg/cm <sup>2</sup> (Temperatura) - min - H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)		FS**	g/kg MS	L/Ton MS	L/Ton MH
<b>Laboratorio</b>	Tubular	Levadura de panadería	-	-	-	195.70 ± 17.25	248.04 ± 21.86	41.50 ± 3.66
		Cultivo mixto	-	-	-	106.66 ± 7.30	135.19 ± 9.26	33.91 ± 2.32
		<i>S. cerevisiae</i> ITD00196	2.2(135)–12	-	2.11	178.29 ± 5.36	225.97 ± 6.79	29.07 ± 0.87
		Cultivo mixto	2.2(135)–12	-	2.11	185.92 ± 4.04	235.64 ± 5.12	33.14 ± 0.72
		<i>S. cerevisiae</i> ITD00196	2.7(140)–15	0%	2.35	178.94 ± 11.67	226.79 ± 14.79	46.81 ± 3.05
		Cultivo mixto	2.7(140)–15	0%	2.35	222.98 ± 10.33	282.61 ± 13.09	42.74 ± 1.98
		Levadura de panadería	2.7(140)–15	1%	0.67***	159.90 ± 7.53	202.67 ± 9.55	45.02 ± 2.12
		Cultivo mixto	2.7(140)–15	1%	0.67***	163.92 ± 4.73	207.79 ± 5.99	46.00 ± 1.33
		Levadura de panadería	2.7(140)–15	2%	1.14***	100.14 ± 8.73	126.92 ± 11.07	33.08 ± 2.89
		Cultivo mixto	2.7(140)–15	2%	1.14***	62.75 ± 6.75	79.53 ± 8.55	23.60 ± 2.54
<b>Biorreactor</b>	LH*	Cultivo mixto	-	-	-	151.85 ± 2.49	192.46 ± 11.46	41.81 ± 2.49
	LH	Cultivo mixto	-	-	-	186.62 ± 12.22	236.52 ± 15.49	51.80 ± 3.39
	LH	Cultivo mixto	2.7(140)–15	-	2.35	193.56 ± 10.10	245.72 ± 17.76	38.88 ± 2.81
	LH	Cultivo mixto	2.7(140)–15	-	2.35	186.36 ± 3.54	236.20 ± 4.49	46.86 ± 0.89
	TSF*	<i>S. cerevisiae</i> ITD00196	-	-	-	165.03 ± 9.90	209.16 ± 12.55	44.73 ± 2.66
	TSF	<i>S. cerevisiae</i> ITD00196	-	-	-	160.95 ± 14.40	203.99 ± 18.25	39.12 ± 3.50

\*Biorreactor con listones helicoidales (LH) y con tornillo sin fin (TSF).

\*\*FS: Factor de severidad.

\*\*\*FSC: Factor de severidad combinado

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Sin embargo, en todos los casos reportados en la literatura, la fracción sólida de los residuos orgánicos se resuspende en un medio líquido para el pretratamiento térmico o enzimático; y en algunos otros casos, los carbohidratos se extraen en medio líquido para la producción de etanol.

En todos estos casos, el número de etapas del proceso se incrementa (Tang y col., 2008; Kim y col., 2008; Wang y col., 2008; Ballesteros y col., 2010; Uncu y Cekmecelioglu, 2011; Uçkun Kiran y Liu, 2015).

En la Tabla 11.2 se observa que la mayoría de los procesos combina el pretratamiento térmico con la hidrólisis enzimática y se utilizan frecuentemente a escala laboratorio (Ballesteros y col., 2010; Uncu y Cekmecelioglu, 2011; Boluda-Aguilar y col., 2013; Canabarro y col., 2017) y a escala piloto (Li y col., 2013).

A escala laboratorio, la producción de etanol obtenida en este trabajo, sin utilizar una hidrólisis enzimática, es superior a la reportada en cultivos en medio líquido (CML) (Ballesteros y col., 2010; Uncu y Cekmecelioglu, 2011) y CMS (Saucedo-Castañeda y col., 1992; Canabarro y col., 2017; Mazaheri y col., 2015) (Tabla 11.2).

A escala piloto, la producción de etanol obtenida en este trabajo, sin utilizar pretratamiento termoquímico, es superior a la reportada en CML (Jeong y col., 2018). Sin embargo, a escala de laboratorio y piloto, utilizando como sustrato residuos de cáscara de limón hidrolizada enzimáticamente (Boluda-Aguilar y col., 2013) y sorgo dulce (Li y col., 2013), los autores obtuvieron una producción de etanol en 14.3 % y en 76 % superior, respectivamente, a la reportada en este trabajo (Tabla 11.2).

Estos resultados demuestran el potencial de producir etanol a partir de la MSE de la FORSU pretratada térmicamente ( $282.61 \pm 13.09$  L de etanol/tonelada de MS), sin tratamientos termoquímicos agresivos y/o enzimáticos. El FS es un criterio práctico para la comparación de los pretratamientos térmicos sobre biomasa orgánica. Los resultados indican que la FORSU es un sustrato potencial para la producción de etanol, siendo una alternativa a la caña de azúcar y al almidón de maíz.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 11.2.** Comparación en la producción de etanol a escala laboratorio y piloto, a partir de residuos orgánicos pretratados a diferentes condiciones en CML y CMS.

Escala	Sustrato	Levadura	Condiciones	FS	Tipo de cultivo	Producción de etanol (g/kg MS)	Referencias
Laboratorio	FORSU	<i>S. cerevisiae</i>	160 °C-30 min + Celulasas/amilasas	3.24	CML	126.2	Ballesteros y col., 2010
	Residuos de cocina	<i>S. cerevisiae</i>	121 °C-30 min + $\alpha$ -amilasas/amiloglucosidasas/celulasas/ $\beta$ -glucosidasas	2.10		161.00	Uncu y Cekmecelioglu, 2011
	Residuos de cascara de limón	<i>S. cerevisiae</i> CECT 1329	160 °C-5 min + Pectinasas/celulasas/ $\beta$ -glucosidasas	2.47		254.85±41.82	Boluda-Aguilar y col., 2013
	Almidón con soporte de bagazo de caña de azúcar	<i>Schw. castelli</i> CBS2863	121 °C-30 min	2.10	CMS	89.30	Saucedo-Castañeda y col., 1992
	Cáscara de arroz	<i>S. cerevisiae</i>	121 °C-20 min + $\alpha$ -amilasas/celulasas	1.92		135.00±10.8	Canabarro y col., 2017
	Fruta de algarrobo /Salvado de trigo MSE	<i>Z. mobilis</i> PTCC1718	121 °C-15 min	1.79		60.90	Mazaheri y col., 2015
			<i>S. cerevisiae</i> ITD00196 Cultivo mixto	135 °C-12 min	2.11	CMS	178.29±5.36 185.92±4.04
	<i>S. cerevisiae</i> ITD00196 Cultivo mixto	140 °C-15 min	2.35		178.94±11.67 222.98±10.33		
Piloto	Roble Mongol	<i>S. cerevisiae</i> DXSP	0.05 % (p/p) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -380 °C por 1 seg.	-	CML	141.00	Jeong y col., 2018
	Sorgo dulce	<i>S. cerevisiae</i> TSH1	$\alpha$ -1,4-glucon-glucohidrolasas	-	CMS	208.30	Li y col., 2013
	MSE	Cultivo mixto <sup>1</sup> Cultivo mixto <sup>2</sup>	140 °C-15 min	2.35	CMS	193.56±10.10 186.36±3.54	Este trabajo

Abreviaciones: Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos, FORSU; mezcla sólida estándar, MSE; factor de severidad, FS; cultivo en medio líquido, CML; cultivo en medio sólido, CMS; materia seca, MS; *S. cerevisiae* ITD00196, *S. stipitis* ATCC58785, y *Schw. occidentalis* ATCC26077, cultivo mixto.

<sup>1</sup> Ensayo 1. <sup>2</sup> Ensayo 2.

### 11.6 Conclusiones en la producción de etanol a escala laboratorio y piloto

La utilización de un cultivo mixto de tres levaduras (*S. cerevisiae*, *S. stipitis*, y *Schw. occidentalis*) presentó los mejores resultados en la producción de etanol a escala laboratorio y piloto en cultivos en medio sólido.

Los ensayos a escala de laboratorio indicaron que entre 225.97-282.61 L de etanol podrían ser producidos usando una tonelada de materia seca; este intervalo de concentraciones es cercano a lo que podría ser producido a escala piloto (236.2-245.72 L/Ton MS) usando un biorreactor con listones helicoidales.

Con un biorreactor tipo tornillo sin fin se alcanzó una concentración entre 160.95 y 165.03 L de etanol por tonelada de la mezcla sólida estándar de la FOSRU sin pretratamiento térmico, esta concentración es 17 % menor a lo alcanzado con tratamiento térmico usando un biorreactor con listones helicoidales.

El FS es un criterio práctico para la comparación del pretratamiento térmico de la MSE de la FORSU; sin embargo, la comparación del rendimiento del etanol no es fácil de realizar ya que la composición del sustrato puede ser muy heterogénea.

Se demostró que el proceso puede simularse con éxito utilizando una ecuación cinética de decaimiento de primer orden para el consumo de carbohidratos fermentables y el modelo de Gompertz para la producción de etanol; estos modelos son útiles para describir el la tasa y el alcance de la bioreacción.

Los resultados demuestran que el monitoreo del proceso es factible y práctico, usando el monitoreo en línea de los gases.

La mezcla sólida estándar pretratada térmicamente, compuesta por un 93 % de la FORSU, es un sustrato potencial para la producción directa de etanol sin la separación de carbohidratos en una fase líquida, siendo una alternativa a otras fuentes de biomasa.

Se propone un proceso más sencillo para la producción de etanol a partir de residuos de frutas y vegetales, utilizando únicamente un tratamiento térmico y sin hidrólisis química o enzimática.

## CONCLUSIONES

---

### ***CAPÍTULO 12*** ***CONCLUSIONES***

### 12. CONCLUSIONES GENERALES

El uso de matraces bafleados o con resorte y un volumen de llenado del 20 % proporcionan las mejores condiciones para el desarrollo de inóculos en levaduras utilizadas para CMS.

De las seis levaduras estudiadas, tres presentan un marcado efecto Crabtree positivo (*S. cerevisiae* ITD00196, *S. cerevisiae* (Levadura de panadería) y *K. marxianus* CBS6556), mientras que dos un efecto Crabtree ligero (*S. stipitis* ATCC58785 y *S. stipitis* Y-17104). Así mismo, una se determinó con efecto Crabtree negativo (*Schw. occidentalis* ATCC26077). El efecto Crabtree se determinó cualitativa y cuantitativamente a través de los rendimientos de crecimiento ( $Y_{x/s}$ ) y producción de etanol ( $Y_{p/s}$ ) a partir del consumo de glucosa o xilosa. Las levaduras con un efecto Crabtree positivo tienen un potencial para la producción rápida de etanol durante la fermentación directa de una mezcla sólida estándar de la FORSU.

Los residuos de frutas y verduras generados en la Central de Abastos de la Ciudad de México fueron directamente usados para la producción de bioetanol por fermentación en medio sólido. Se determinó una metodología que permitió realizar la producción de etanol a partir de la MSE de la FORSU de manera reproducible e independiente de la estacionalidad de la FORSU.

Con el pretratamiento térmico optimizado de la mezcla sólida estándar se aumentó en un 68 % la concentración de carbohidratos fermentables, se redujeron los niveles de contaminantes microbianos y el ácido acético presente de forma natural en las frutas, aumentando la producción de etanol. La mezcla sólida estándar de la FORSU pretratada térmicamente es un sustrato con un alto potencial para la producción de etanol, ya que, a escala laboratorio se incrementa la producción de etanol en un 109 %, mientras que, a escala piloto, el aumento es del 82 %, utilizando un cultivo mixto.

El presente trabajo demostró, por primera vez, que un pretratamiento térmico suave de la FORSU, permite una alta concentración de etanol utilizando condiciones de CMS tanto en biorreactores estáticos a escala de laboratorio como en biorreactores agitados a escala piloto. Una de las ventajas de utilizar este tipo de residuos es que pueden ser recolectados y procesados en el mismo lugar de generación, evitando los costos de transporte y almacenamiento, como suele ocurrir con los productos derivados de la agroindustria, como la caña de azúcar, el maíz y el trigo.



***CAPÍTULO 13***  
***PERSPECTIVAS***

### 13. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos en la producción de etanol a escala laboratorio y piloto a partir de una mezcla sólida estándar de la FORSU en cultivo en estado sólido, se sugiere seguir estudiando y analizando el proceso a escala piloto, con la finalidad de mejorar el proceso y obtener una posible aplicación industrial. Se debe seguir trabajando en el análisis de los balances del proceso para poder obtener rendimientos de producción de etanol comparables con la literatura.

El CO<sub>2</sub> producto del proceso de fermentación de los carbohidratos fermentables de la mezcla sólida estándar de la FORSU a etanol, podría ser capturado para disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero o ser utilizado como sustrato para el crecimiento de microalgas, consideradas el futuro de las energías renovables.

Es importante seguir estudiando la etapa de pretratamiento o hidrólisis de la mezcla sólida estándar de la FORSU para aumentar la liberación de carbohidratos fermentables, ya que esta etapa es considerada el cuello de botella en los procesos de producción de etanol a partir de las diferentes biomásas lignocelulósicas. La producción de enzimas hidrolíticas por CMS sería una alternativa económica para el pretratamiento térmico y enzimático de la mezcla sólida estándar de la FORSU.

El efecto Crabtree es un fenómeno metabólico importante a considerar en la selección de levaduras para su uso en la producción de etanol. Levaduras con Crabtree positivo tienen un alto potencial para la producción rápida de etanol.

Sin embargo, se debe seguir trabajando en la selección de levaduras productoras de etanol considerando la asimilación de un amplio rango de carbohidratos, su termotolerancia, la tasa de producción de etanol, su tolerancia al etanol y pH, entre otros.

En este trabajo, se propone un proceso más sencillo para la producción de etanol a partir de residuos de frutas y vegetales, utilizando únicamente un tratamiento térmico y sin hidrólisis enzimática o termoquímica.

La estrategia y metodología empleada es factible para la creación de una planta productora de etanol en la zona de generación de residuos. Un esquema de biorefinería debería implementarse para mejorar el aprovechamiento de la FORSU y disminuir costos de producción.

## REFERENCIAS

---

### ***CAPÍTULO 14*** ***REFERENCIAS***

### 14. REFERENCIAS

1. Abatzoglou, N., Chronet, E., Belkacemi, K., Overend, R. P. (1992). Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. *Chem Eng Sci.* 47(5), 1109-1122.
2. Agbogbo, F., Coward, G., Torry, M. and Wenger, K. (2006). Fermentation glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochem.* 11, 2333-2336.
3. Alberts, E. and Larsson, C. (2009). A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36, 1085-1091.
4. Alexander, M. A. and Jeffries, T. W. (1990). Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. *Enzyme Microb Technol.* 12, 2-19.
5. Alvira, P., Negro, M. J., Ballesteros, I., González, A., Ballesteros, M. (2016). Steam explosion for wheat straw pretreatment for sugars production. *Bioethanol.* 2, 66-75.
6. Aro, N., Pakula, T. and Penttila, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 29, 719-739.
7. Arora, S., Rani, R. and Ghosh, S. (2008). Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects: A review. *J Biotechnol.* 269, 16-34.
8. Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popovic, M. K., Bajpai, R. and Stahl, U. (2010). Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology – a review article. *J Appl Microbiol.* 109, 371-387.
9. Ballesteros, M., Saez, F., Ballesteros, I., Manzanares, P., Negro, M. J., Martinez, J. M., Castaneda, R. and Dominguez, J. M. (2010). Ethanol production from the organic fraction obtained after thermal pretreatment of municipal solid waste. *Appl Biochem Biotechnol.* 161, 423-431.
10. Bellido, C., Bolado, S., Coca, M., Gonzalez-Benito, G. and García-Cubero, M.T. (2011). Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresour Technol.* 102, 10868-10874.
11. Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog Polym Sci.* 19, 797-841.
12. Boluda-Aguilar, M. and López-Gómez, A. (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limón L.*) peel wastes pretreated with steam explosion. *Ind Crop Prod.* 41, 188-197.
13. Bradley, R. L. Jr. (2010). Moisture and total solids analysis, Ch. 6, in: Nielsen S.S. (Ed.), Food analysis, 4th ed. Springer, New York. pp. 17-27.
14. Brown, S. W., Oliver, S. G., Harrison, D. E. F. and Righelato, R. C. (1981). Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation. Differences in the magnitude and complexity of the effect. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 11, 151-155.
15. Büchs, J., (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng. J.* 7, 91-98.
16. Canabarro, N. I., Alessio, C., Foletto, E. L., Kuhn, R. C., Priamo, W. L. and Mazutti, M. A. (2017). Ethanol production by solid-state saccharification and fermentation in a packed-bed bioreactor. *Renew Energ.* 102, 9-14.
17. Cesaro, A. and Belgiorno, V. (2014). Pretreatment methods to improve anaerobic biodegradability of organic municipal solid waste fractions. *Chem Eng J.* 240, 24-37.
18. Chandel, A., Kapoor, R., Singh, A. and Kuhad R. (2007). Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysates improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour Technol.* 98, 1947-1950.

## REFERENCIAS

---

19. Chen, H. and Li, G. (2013). An industrial level system with nonisothermal simultaneous solid state saccharification, fermentation and separation for ethanol production. A review. *Biochem Eng J.* 74, 121-126.
20. Chum, H. L., Johnson, D. K., Black, S. K., Overend, S. K. (1990). Pretreatment catalyst effects and the combined severity parameter. *Appl Biochem Biotechnol.* 25, 1-14.
21. Clark, T. A. and Mackie, K. L. (1984). Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *Chem Technol Biotechnol.* 34, 101-110
22. Clausen, E. C. and Gaddy, J. L. (1988). Ethanol from biomass by concentrated acid hydrolysis and fermentation. *Energ Biomass Waste.* 12, 1319 -1342.
23. Cofré, O., Ramírez, M., Gómez, J. M. and Cantero, D. (2012). Optimization of culture media for ethanol production from glycerol by *Escherichia coli*. *Biomass Bioenerg.* 37, 275-281.
24. Converti, A., Perego, P., Borghi, M. D. and Ferraiolo, G. (1989). Pretreatment operations and alcohol fermentation of orange wastes. *J Ferm Bioeng.* 68 (4), 277-281.
25. Cortinas de Nava, C. (2006). Bases para Legislar la Prevención y Gestión Integral de Residuos. Semarnat. México. 1 Ed.
26. Crabtree, H. G. (1929). Observation on the carbohydrate metabolism of tumors. *Biochem J.* 23 (3), 536-545.
27. Cuervo, L., Folch, J. y Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología.* 13 (3), 11-25.
28. da Costa, J. A., Marques Jr., J. E., Rocha Barros Gonçalves, L. and Valderez Ponte Rocha, M. (2015). Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. *Bioresour Technol.* 179, 249-259.
29. De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol.* 44, 149-156.
30. Deindoerfer, F. H., (1957). Calculation of heat sterilization times for fermentation media. *Appl Microbiol.* 5, 221.
31. Demirbas, A. (2005). Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energ Source.* 27, 327-333.
32. Díaz-Campillo, M., Urtíz, N., Soto, Ó., Barrio, E., Rutiaga, M., Páez, J., (2012). Effect of glucose concentration on the rate of fructose consumption in native strains isolated from the fermentation of *Agave duranguensis*. *World J Microbiol Biotechnol.* 28, 3387-3391.
33. Doelle, H. W., Mitchell, D. A. and Rolz, C. E. (1992). "Solid Substrate Cultivation". *Elsevier Applied Science*, London, N. York, Chapter 3, 35.
34. du Preez, J. C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting D-xilose fermentation by yeasts. *Enzym Microb Tech.* 16, 944-956.
35. Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., Ponce-Noyola, M. and Poggi-Varaldo. (2012). Gas biofuels from solid substrate hydrogenogenic-methanogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste. *Process Biochem.* 4, 1572-1587.
36. Fan, L. T., Lee, Y-H., and Gharpuray, M. M. (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 23, 158-187.
37. FAO. (2012). Towards the future we want: End hunger and make the transition to sustainable agricultural and food systems. Food and agriculture organization of the United Nations. Rome, Italy.
38. Fiechter, A. and Seghezzi, W. (1992). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *J Biotechnol.* 27, 27-45.

## REFERENCIAS

---

39. Fockink, D. H., Sánchez, J. H., Ramos, L. P. (2018). Comprehensive analysis of sugarcane bagasse steam explosion using autocatalysis and dilute acid hydrolysis (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) at equivalent combined severity factors. *Ind Crop Prod.* 123, 563-572.
40. Franks, C. D., Burow, G. B. and Burke, J. J. (2006). A comparison of US and Chinese sorghum germplasm for early season cold tolerance. *Crop Sci.* 46, 1371-1376.
41. Fulton, L., Howes, T. and Hardy, J. (2004). Biofuels for transport: an international perspective. *International Energy Agency*, Paris, France.
42. García, A. (2006). Estudio de la degradación de residuos lignocelulósicos derivados del procesamiento industrial del cranberry (*Vaccinium macrocarpon* ait). Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. Tesis de Doctorado.
43. Gonzáles Siso, M. I., Ramil, E., Cerdán M. E. and Freire-Picos, M. A. (1996). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme Microb Technol.* 18, 585-591.
44. Gray, W. D., Stark, W. H. and Kolachov, P. (1942). *J Bacteriol.* 43, 270.
45. Gupta, A. and Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renew Sust Energ Rev.* 41, 550-567.
46. Hagman, A., Säll, T., Compagno, C. and Piškur, J. (2013). Yeast “Make-accumulate-consume” life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLoS ONE.* 8(7): e68734.
47. Hagman, A. and Piškur, J. (2015). A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast. *PLoS ONE.* 10(1), e0116942.
48. Haukeli, A. D and Lie, S. (1971). Controlled supply of trace amounts of oxygen in laboratory scale fermentation. *Biotechnol Bioeng.* 13, 619-628.
49. He, M., Sun, Y., Zou, D., Yuan, H., Zhu, B., Li, X. and Pang, Y. (2012). Influence of temperature on hydrolysis acidification of food waste. *Procedia Environ Sci.* 16, 85-94.
50. Hickert, L., Cunha-Pereira, F., De Souza-Cruz, P., Rosa, C. and Záchia, M. (2013). Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. *Bioresour Technol.* 131, 508-514.
51. Hölker, U., Höfer, M. and Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, *Appl Microbiol Biotechnol.* 64, 175-186.
52. Holzer, H. (1968). Biochemistry of adaptation of yeast. In: Mills A, Krebids S (eds) Aspects of yeast metabolism. Blackwell, Oxford. p. 155.
53. Horn, C., du Preez, J. and Kilian, S. (1992). Amylase production by a *Schwanniomyces occidentalis* mutant in chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 37, 147-151.
54. Imura, M., Iwakiri, R., Bamba, T. And Fukusaki, E. (2018). Metabolomics approach to reduce the Crabtree effect in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 126(2), 183-188.
55. Ingledew, W. M., (1987). *Schwanniomyces*: potential superyeast? *CRC Crit Rev Biotechnol.* 5 (2), 159-176.
56. INSK, (2002). [https://www.insk.com/media/1141/frut\\_verduras\\_temporada.pdf](https://www.insk.com/media/1141/frut_verduras_temporada.pdf) (Consultado, 2015).
57. Jeong, S., Kim, Y. and Lee, D. (2012). Ethanol production by co-fermentation of hexose and pentose from food wastes using *Saccharomyces coreanus* and *Pichia stipitis*. *Korean J Chem Eng.* 29, 1038-1043.
58. Jeong, H., Park, Y-C., Seong, Y-J. and Lee, S. M. (2018). Sugar and ethanol production from woody biomass via supercritical water hydrolysis in a continuous pilot-scale system using acid catalyst. *Bioresour Technol.* 245, 351-357.

## REFERENCIAS

---

59. Jiménez-Islas, D., Páez-Lerma, J., Soto-Cruz, N. and Gracida, J. (2014). Modelling of ethanol production from red beet juice by *Saccharomyces cerevisiae* under thermal and acid stress conditions. *Food Technol Biotechnol.* 52(1) 93-100.
60. Jones, R. P., Pamment, N. and Greenfield, P. F. (1981). Alcohol fermentation by yeasts-The effect of environmental and other variables. *Process Biochem.* 16, 42-49.
61. Joshi, V. K., Walia, A. and Rana, N. S. (2012). Production of bioethanol from food industry waste: microbiology, biochemistry and technology. In Baskar, C. *et al.* (Eds.), Biomass conversion. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 251-311.
62. Kalogo, Y., Habibi, S., Maclean, H. and Joshi, S. (2007). Environmental implications of municipal solid waste-derived ethanol. *Environ Sci Technol.* 41, 35-41.
63. Kim, J. K., Oh, B. R., Shin, H.-J., Eom, C.-Y., Kim, S. W. (2008). Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste. *Process Biochem.* 43, 1308-1312. Short communication.
64. Kim, K.-C., Kim, S.-W., Kim, M.-J. and Kim, S.-J. (2005). Saccharification of foodwastes using cellulolytic and amylolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* FJ1 and its kinetics. *Biotechnol Bioproc E.* 10(1), 52-59.
65. Krishna, S. H., Reddy, T. J., and Chowdary, G. V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresour Technol.* 77, 193 - 196.
66. Kuhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P., Singh, A., Zhang, Y. H. P. (2011). Bioethanol production from pentose sugars: current status and future prospects. *Renew sust energ rev.* 15, 4950-4962.
67. Kumar Saini, J., Saini, R. and Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech.* 5, 337-353.
68. Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J. and Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res.* 48, 3713-3729.
69. Lavarack, B. P. (2003). Estimates of ethanol production from sugar cane feedstocks. *Proc Aust Soc Sugar Cane Technol.* Vol. 25.
70. Lemoigne, M., Aubert, J. P. and Millet, J. (1954). La production d'alcool et le rendement de croissance de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose. *Ann Inst Pasteur.* 87, 427.
71. Levenspiel, O. (1999) *Chemical Reaction Engineering.* 3rd edn. pp. 4140-4143. Wiley, New York.
72. Ley de residuos sólidos del Distrito Federal. (2013). Gaceta Oficial del Distrito Federal. Consultado el 22 de Abril de 2013.
73. Li, A., Antizar-Ladislao, B. and Khraisheh, M. (2007). Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bio-ethanol production. *Bioprocess Biosyst Eng.* 30, 189-196.
74. Li, S., Li, G, Zhang, L., Zhou, Z., Han, B., Hou, W., Wang, J. and Li, T. (2013). A demonstration study of ethanol production from sweet sorghum stems with advanced solid state fermentation technology. *Appl Energ.* 102, 260-265.
75. Liu, Z-H., Qin, L., Pang, F., Jin, M-J., Li, B-Z., Kang, Y., Dale, B. E. and Yuan Y-J. (2013a). Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. *Ind Crop Prod.* 44, 176-184.
76. Liu, X. L., Zhou, W. R., Wu, Y. H., Cheng, Y. and Zheng, Y.F. (2013b). Effect of sterilization process on surface characteristics and biocompatibility of pure Mg and MgCa alloys. *Mat Sci Eng.* 33, 4144-4154.
77. López-Alvarez, A., Díaz-Pérez, A., Sosa-Aguirre, C., Macías-Rodríguez, L. And Campos-García, C. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus*

## REFERENCIAS

---

- UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *J Biosci Bioeng.* 113(5), 614-618.
78. Lund, D. (1988). Effects of heat processing on nutrients. In: Karmas, E., Harris, R.S. (Eds.), *Nutritional Evaluation of Food Processing*. Springer, Netherlands, pp. 319–354.
79. Luo, S., Xiao, B., Hu, Z., Liu, S. and Guo, X. (2009). An experimental study on a novel shredder for municipal solid waste (MSW). *Int J Hydrogen Energy.* 34(3), 1270–1274.
80. Maiorella, B., Blanch, H.W., Wilke, C.R. (1983). By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech Bioeng.* 25, 103–121.
81. Mann, A., Kiefer, M. and Leuenberger, H. (2001). Thermal sterilization of heat-sensitive products using high-temperature short-time sterilization. *J Pharm Sci.* 90, 275–287.
82. Marín-Palacio, L. D., Gamboa-Suasnarvart, R. A., Valdez-Cruz, N. A., Servín-González, L., Córdova-Aguilar, M. S., Soto, E., Klöckner, W. Büchs, J. and Trujillo-Roldán, M. A. (2014). The role of volumetric power input in the growth, morphology, and production of a recombinant glycoprotein by *Streptomyces lividans* in shake flasks. *Biochem Eng.* 90, 224–233.
83. Martínez-Valdes, F., Martínez-Ramírez, C., Martínez-Montiel, L., Favela-Torres, E., Soto-Cruz, N., Ramírez-Vives, F. and Saucedo-Castañeda, G. (2015). Rapid mineralization of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste. *Bioresour Technol.* 180, 112-118.
84. Mazaheri, D. and Shojaosadati, S. A., (2013). Mathematical models for microbial kinetics in solid-state fermentation: a review. *Iran J Biotechnol.* 11 (3), 156–167.
85. Mazaheri, D., Shojaosadati, S. A., Hejazi, P. and Mousavi, S. M. (2015). Bioethanol production performance in a packed bed solid-state fermenter: evaluation of operational factors and intermittent aeration strategies. *Ann Microbiol.* 65, 351-357.
86. McCabe, W. L., Smith J. C. and Harriott, P. (2001). *Unit operations of chemical engineering*. Ed. Mc Graw-Hill.
87. Miller, D. G., Griffiths-Smith, F., Algar, E. and Scopes, R. K. (1982). Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol Lett.* 4, 601-606.
88. Molaverdi, M., Karimi, K., Khanahmadi, M. and Goshadrrou, A. (2013). Enhanced sweet sorghum stalk to ethanol by fungus *Mucor indicus* using solid state fermentation followed by simultaneous saccharification and fermentation. *Ind Crop Prod.* 49, 580-585.
89. Molaverdi, M., Karimi, K., Mirmohamadsadeghi, S. and Galbe, M. (2019). High titer ethanol production from rice straw via solid-state simultaneous saccharification and fermentation by *Mucor indicus* at low enzyme loading. *Energy Convers Manag.* 182, 520-529.
90. Moss, F. J., Rickard, P. A. D., Beech, G. A. and Bush, F. E. (1971). The response by microorganisms to steady-state growth in controlled concentrations of oxygen and glucose. II. *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biotechnol Bioeng.* 13, 63-75.
91. Nakanishi, S. C., Nascimento, V. M., Rabelo, S. C., Sampaio, I. L. M., Junqueira, T. L. and Rocha, G. J. M. (2018). Comparative material balances and preliminary technical analysis of pilot scale sugarcane bagasse alkaline pretreatment to 2G ethanol production. *Ind Crop Prod.* 120, 187-197.
92. Narra, M. James, J. and Balasubramanian, V. (2015). Simultaneous saccharification and fermentation of delignified lignocellulosic biomass at high solid loadings by a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces* sp. For ethanol production. *Bioresour Technol.* 179, 331-338.
93. Nava-Villagómez, J. I. (2011). Efecto del mezclado sobre la actividad metabólica de *Aspergillus tamararii* V12307 en bio-reactores de fermentación en medio sólido en pulpa de café a nivel laboratorio y semi-piloto. Tesis de Doctorado. UAM-I.



## REFERENCIAS

---

94. Ndaba, B., Chiyanzu, I., Marx, S. and Obiero, G. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* on the co-fermentation of sweet sorghum bagasse hydrolysates pretreated under varying conditions. *Biomass Bioenergy*. 71, 350-356.
95. Negro, M. J., Alvarez, C., Ballesteros I., Romero, I., Ballesteros, M., Castro, E., Manzanares, P., Moya, M. and Oliva, J. M. (2014). Ethanol production from glucose and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric and as catalyst. *Bioresour Technol*. 153, 101-107.
96. Nigam, J. N. (2001). Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J Biotechnol*. 87, 17-27.
97. Ovando-Chacón, S. L. and Waliszewski, K. N. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21, 111-120.
98. Overend, R.P., Chornet, E. and Gascoigne, J.A. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Phil Trans R Soc A*. 321, 523-536.
99. Palmqvist, E., Almeida, J. and Hahn-Hägerdal, B. (1999). Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol Bioeng*. 62 (4) 447-454.
100. Pandey, A. (1991) Aspects of fermenter design for solid state fermentations. *Process Biochem*. 26, 355-361.
101. Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochem Eng J*. 13, 81-84.
102. Payán, C. (2011). Aislamiento, identificación y conservación de microorganismos presentes en residuos lignocelulósicos (pulpa) provenientes del beneficio del café. Universidad Católica de Manizales. Tesis de licenciatura.
103. Peña, C. and Arango, R. (2009). Evaluation of ethanol production using recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* from sugar cane molasses. *Dyna*. 159, 153-161.
104. Pérez-Torralla, M. (2012). Reciclado y tratamiento de residuos. *Biomasa. Transformación de la biomasa en energía*. Cap. 9. Universidad Nacional de Educación a Distancia. ISBN: 978-84-362-6006-9.
105. Pérez, J., Muñoz-Dorado, A., De la Rubia, T. and Martínez, E. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol*. 5, 53-63.
106. Pirt, S. J. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell scientific publications.
107. Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A. and van Dijken, J. P. (1989). Enzymatic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 55, 468-477.
108. Pronk, J. T., Yde Steensma, H., and Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 12, 1607-1633.
109. Reynoso-Cereceda, G., Garcia-Cabrera, R., Valdez-Cruz, A., Trujillo-Roldán, M. (2016). Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: mass transfer coefficient  $K_L a$  characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochem Eng J*. 105, 379-390.
110. Ridley, B. L., O'Neill, M. A. and Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57, 929-967. A review.
111. Rodicio, R. and Heinisch, J. J. (2009). Sugar metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast. In: Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Helmut, k., Fröhlich, G. U. J., ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. pp.115-130.
112. Rodríguez León, J. A., Soccol, C. R., Singhanía, R. R., Pandey, A., Sturm, W., Alberto Jr Letti, L., Vandenberghe, L. S. and Rodríguez Fernández, D. E. (2001). Solid-state fermentation, in: A. Pandey, C. Larroche, C.R. Soccol, C.G. Dussap (Eds.), Current Developments in Solid-state Fermentation, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, India, pp. 554-569.

## REFERENCIAS

---

113. Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Woolfit, M., Compagno, C. and Piškur, J. (2011). Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat Commun.* 2, 302.
114. Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature.* 454, 841-845.
115. Saleemdeen, R., zu Ermgassen, E. K. H. J., Kim, M. H., Balmford, A. and Al-Tabbaa, A. (2017). Environmental and health impacts of using food waste as animal feed: a comparative analysis of food waste management options. *J Clean Prod.* 140, 871-880.
116. Salari, R. and Salari, R. (2017). Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* growth conditions. *Electron Physician.* 9(1), 3592-3597.
117. Saucedo-Castañeda, G., Lonsane, B. K., Navarro, J. M., Roussos, S. and Raimbault, M. (1992). Potential of using a single fermenter for biomass build-up, starch hydrolysis, and ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol.* 36, 47-61.
118. Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M. R., Lonsane, B. K., Navarro, J. M., Roussos, S., Dufour, D. and Raimbault M. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentation. *Process Biochem.* 29, 13-24.
119. Saucedo-Castañeda G., Favela-Torres E., Torres-Mancera M. T., Rosas-Ramírez T., Ruíz-Sánchez P., Estrada-Martínez R., Loera-Corral O., Viniegra González G., García-Hernández J. C., Figueroa-Montero A. A. y Martínez Valdéz F. J. Biorreactor para la obtención de productos de alto valor agregado mediante cultivos en medio sólidos y sistema que lo comprende. MX/E/2016/009654. (25 Julio 2016).
120. Secretaría de Desarrollo y Medio Ambiente, (2015). Inventario de residuos sólidos. Ciudad de México, México. Consultado el 26 de Junio de 2016.
121. Shi, J., Ebrik, M., Yang, B. and Wyman, C. E., (2009). The Potential of Cellulosic Ethanol Production from Municipal Solid Waste: A Technical and Economical Evaluation. Development of Technology, University of California Energy Institute.
122. Silva, J. P. A., Mussatto, S. L., Roberto, I. C. and Teixeira, J. A. (2012). Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renew energ.* 37, 259-265.
123. Singh, A., Bajar, S. and Bishnoi, N. (2014). Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. *Fuel.* 116, 699-702.
124. Singhanía, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R. and Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation: A review. *Biochem Eng J.* 44, 13-18.
125. Slonimski, P. P. (1956). Adaption respiratoire: développement du système hémoprotéique induit par l'oxygène. *Proc 3rd Int Congr Biochem.* pp. 242.
126. Sluiter, A., Hames B., Hyman D., Payne C., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., and Wolfe J. (2008). Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. *Technical Report NREL/TP-510-42621*. National Renewable Energy Laboratory. Golden, USA.
127. Sluiter, A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., and Croker D. (2011). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Technical Report NREL/TP-510-42618*. National Renewable Energy Laboratory. Golden, USA.
128. Sonnleitner, B. and Käppeli, O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol Bioeng.* 28, 927-937.
129. Soto-Cruz, O., Favela-Torres. E. and Saucedo-Castañeda, G. (2002). Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnol Prog.* 18, 193-200.

## REFERENCIAS

---

130. Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J. and Stanley, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol.* 109, 13-24.
131. Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L. Niklasson, C. and Lidén, G. (2000). Physiological effects of 5-hydroxymethyl furfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53, 701-708.
132. Tang, Y., Koike, Y., Liu, K., An, M., Morimura, S., Wu, X. and Kida, K. (2008). Ethanol production from kitchen waste using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *Biomass Bioenerg.* 32, 1037-1045.
133. Uçkun Kiran, E., Trzcinski, A. P., Ng, W. J. and Liu, Y. (2014). Bioconversion of food waste to energy: A review. *Fuel.* 134, 389-399.
134. Uçkun Kiran, E. and Liu, Y. (2015). Bioethanol production from mixed food waste by and effective enzymatic pre-treatment. *Fuel.* 159, 463-469.
135. Ulbricht, R. J., Northup, S. J. and Thomas, J. A. (1984). A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fund Appl Toxicol.* 4, 843-853.
136. Uncu, O. N. and Cekmecelioglu, D. (2011). Cost-effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology. *Waste Manage.* 31(4), 636-643.
137. Van Urk, H., Postma, E., Scheffers, W. A. and Van Dijken, J. P. (1989). Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *J Gen Microbiol.* 135, 2399 – 2406.
138. Vavouraki, A. I., Angelis, E. M. and Kornaros, M. (2014). Optimization of thermo-chemical hydrolysis of kitchen wastes. *Waste Manage.* 34(1), 167-173.
139. Viniegra-González G. (1997). Solid state fermentation: Definition, Characteristics, Limitations and Monitoring. In: Roussos S., Lonsane B.K., Raimbault M., Viniegra-Gonzalez G. (eds) *Advances in Solid State Fermentation*. Springer, Dordrecht.
140. Wang, Q., Ma, H., Xu, W., Gong, L., Zhang, W. and Zou, D. (2008). Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology. *Biochem Eng J.* 39(3) 604-610.
141. Yu, J., Zhang, X. and Tan, T. (2008). Ethanol production by solid state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast. *Fuel Process Technol.* 89, 1056-1059.
142. Zamora-Hernández, T., Prado-Fuentes, A., Capataz-Tafur, J., Barrera-Figueroa, B. E. y Peña-Castro, J. M. (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educ. Quím.* 25(2), 122-127.
143. Zhang, R. X., Xue, G., Zhang, C. J., Guo, C. G. and Xu, Q. (2007). A device for discharging of spherical digester used in pulping. China Patent. 200720079330. X.
144. Zhang, Y., Yue, D., Liu, J., He, L. and Nie, Y. (2012a). Effect of organic compositions o aerobically pretreated municipal solid waste on non-methane organic compound emissions during anaerobic degradation. *Waste Manage.* 32, 1116-1121.
145. Zhang, L. and Jahng, D. (2012b). Long-term anaerobic digestion of food waste stabilized by trace elements. *Waste Manage.* 32(8), 1509-1515.
146. Zhang, K., Wells, P., Liang, Y., Love, J., Parker, D. A. and Botella, C. (2019). Effect of diluted hydrolysate as yeast propagation medium on ethanol production. *Bioresour Technol.* 271, 1-8.
147. Zhi-Min, Z., Lan, W. and Hong-Zhang, C. (2015). A novel steam explosion sterilization improving solid-state fermentation performance. *Bioresour Technol.* 192, 547-555.
148. Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Vantriet, K., (1990). Modeling of the bacterial-growth curve. *Appl Environ Microbiol.* 56(6), 1875-1881.

***CAPÍTULO 15***  
***ANEXOS***

15. ANEXOS

15.1. Anexo A. Modelo logístico para simular el crecimiento a partir de la biomasa obtenida (Zwietering y col, 1990; Mazaheri y col., 2013)

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left[ 1 - \frac{X}{X_{max}} \right]$$

Se integra:

$$\int \frac{dx}{X \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right)} = \int \mu dt$$

Se multiplica por  $X_{max}$ :

$$\left( \frac{X_{max}}{X_{max}} \right) \frac{1}{X \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right)}$$

$$\left( \frac{X_{max}}{X(max - X)} \right)$$

Para resolver el resultado obtenido se utiliza el método de fracciones parciales:

$$\frac{A}{X} + \frac{B}{X_{max} - X}$$

Se multiplica ambos lados de la igualdad con  $(X(X_{max} - X))$ :

$$(X(X_{max} - X)) \left( \frac{X_{max}}{X(X_{max} - X)} \right) = \left( \frac{A}{X} + \frac{B}{X_{max} - X} \right) (X(X_{max} - X))$$

$$X_{max} = A(X_{max} - X) + B(X)$$

Si  $X=0$

$$X_{max} = A(X_{max} - 0) + B(0)$$

Se multiplica ambos lados de la igualdad con  $\left( \frac{1}{X_{max}} \right)$ :

$$\left( \frac{1}{X_{max}} \right) X_{max} = A(X_{max}) \left( \frac{1}{X_{max}} \right)$$

$$1 = A$$

Si  $X = X_{max}$

$$X_{max} = A(X_{max} - X_{max}) + B(X_{max})$$

$$B = \frac{X_{max}}{X_{max}} = 1$$

Sustituyendo los valores de A y B:

$$\int \left( \frac{1}{X} + \frac{1}{X_{max} - X} \right) dx = \int \mu dt$$

Resolviendo:

$$\ln|X| - \ln|X_{max} - X| = \mu t + C$$

## ANEXOS

---

$$(-1)(\ln|X| - \ln|X_{max} - X| = \mu t + C)$$

$$-\ln|X| + \ln|X_{max} - X| = -\mu t - C$$

Reajustando la ecuación obtenida:

$$e^{\ln\left|\frac{X_{max}-X}{X}\right|} = e^{-\mu t - C}$$

$$\left|\frac{X_{max} - X}{X}\right| = e^{-\mu t - C}$$

$$\frac{X_{max} - X}{X} = \pm(e^{-\mu t})(e^{-C})$$

Si  $A = (e^{-C})$

$$\frac{X_{max} - X}{X} = A(e^{-\mu t})$$

$$\frac{X_{max}}{X} - 1 = A(e^{-\mu t})$$

$$\frac{X_{max}}{X} = 1 + A(e^{-\mu t})$$

$$\frac{X_{max}}{1 + A(e^{-\mu t})} = X$$

Si  $t = 0$  y  $X = X(t)$

Entonces  $X(0) = X_0$  (crecimiento inicial)

$$\frac{X_{max} - X_0}{X_0} = A(e^{-\mu(0)})$$

$$\frac{X_{max} - X_0}{X_0} = A$$

Resolviendo la ecuación logística:

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 + A(e^{-\mu t})}$$

Cuando:

$$\frac{X_{max} - X_0}{X_0} = A$$

Sustituyendo A, se obtiene:

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 + \frac{X_{max} - X_0}{X_0}(e^{-\mu t})}$$

**15.2. Anexo B. Modelo matemático para simular el crecimiento microbiano (X) y el consumo de sustrato (S) (Soto-Cruz y col., 2002)**

Modelo Logístico para crecimiento microbiano (Zwietering y col, 1990).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left[ 1 - \frac{X}{X_{max}} \right]$$

Modelo de Pirt para consumo de sustrato (Pirt, 1975).

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} + mX$$

El desarrollo propuesto por Soto-Cruz y col. (2002), fue utilizado cuando se consideró a la glucosa como sustrato y al peso seco como una medida indirecta del crecimiento biomásico. Este modelo resulta de la combinación del modelo Logístico y el Modelo propuesto por Pirt.

Se divide el modelo de Pirt entre el modelo Logístico:

$$-\frac{\frac{dS}{dt}}{\frac{dX}{dt}} = \frac{\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt}}{\mu X \left[ 1 - \frac{X}{X_{max}} \right]} = \frac{mX}{\mu X \left[ 1 - \frac{X}{X_{max}} \right]}$$

Se integra:

$$-\int_{S_0}^S dS - \frac{1}{Y_{x/s}} \int_{X_0}^X \frac{dX}{dt} = \frac{m}{\mu} \int_{X_0}^X \frac{dX}{1 - \frac{X}{X_{max}}}$$

$$-(S - S_0) - \frac{1}{Y_{x/s}} (X - X_0) = \frac{mX_{max}}{\mu} \int_{X_0}^X \frac{dX}{X_{max} - X}$$

Da como resultado:

$$-(S - S_0) - \frac{1}{Y_{x/s}} (X - X_0) = -\frac{mX_{max}}{\mu} \ln \left[ \frac{X_{max} - X}{X_{max} - X_0} \right]$$

$$-(S - S_0) - \frac{1}{Y_{x/s}} (X - X_0) = \frac{mX_{max}}{\mu} \ln \left[ \frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X} \right]$$

$$-S = -S_0 + \frac{1}{Y_{x/s}} (X - X_0) + \frac{mX_{max}}{\mu} \ln \left[ \frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X} \right]$$

$$S = S_0 - \frac{1}{Y_{x/s}} (X - X_0) - \frac{mX_{max}}{\mu} \ln \left[ \frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X} \right]$$

15.3. Anexo C. Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación de carbohidratos, inhibidores y etanol por HPLC

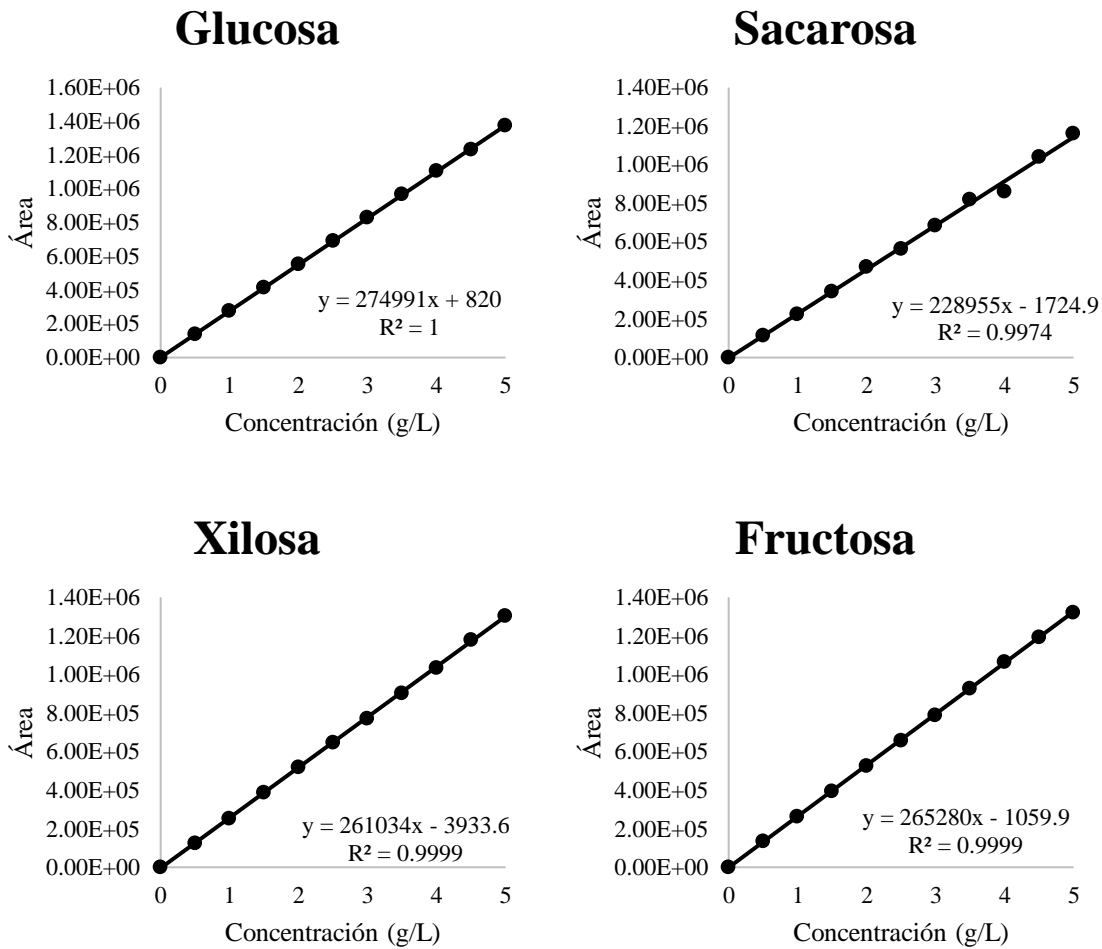


Figura AC1. Curvas de calibración de glucosa, sacarosa, xilosa y fructosa.



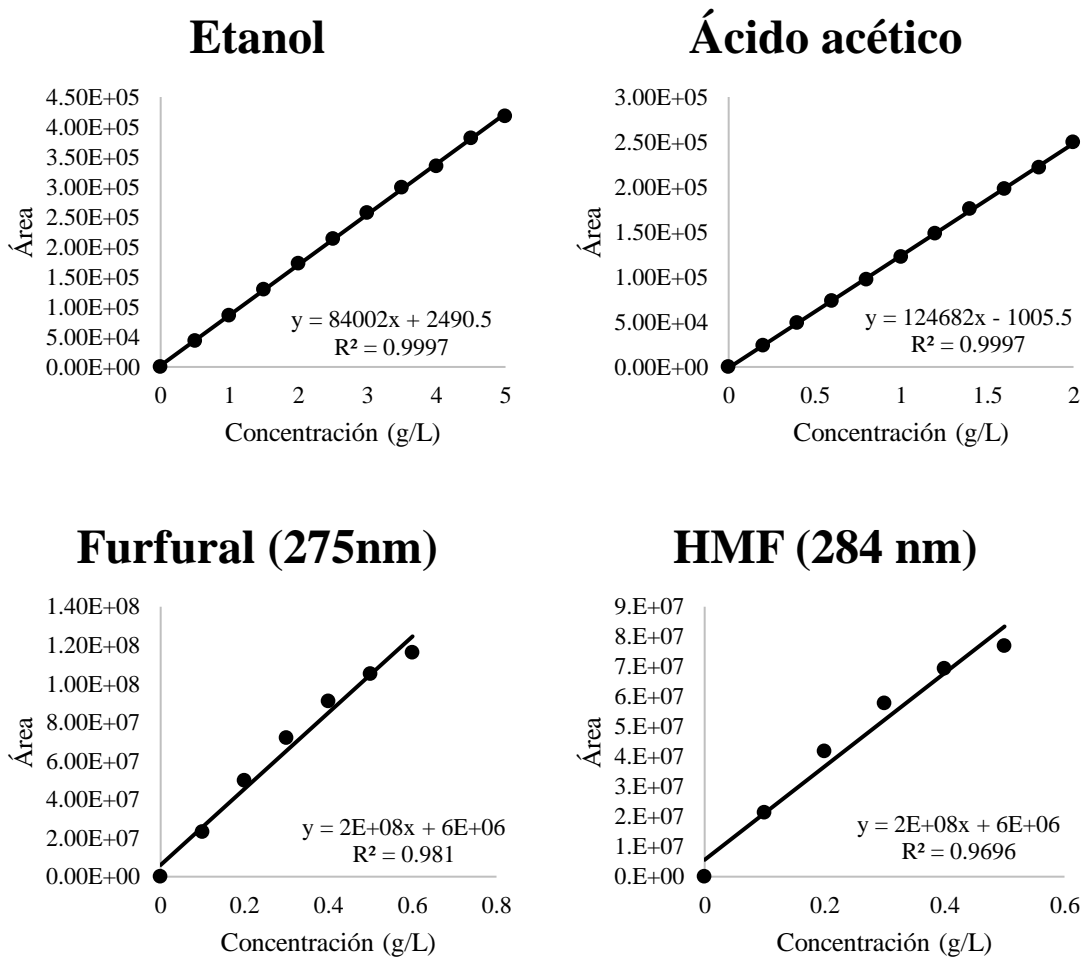
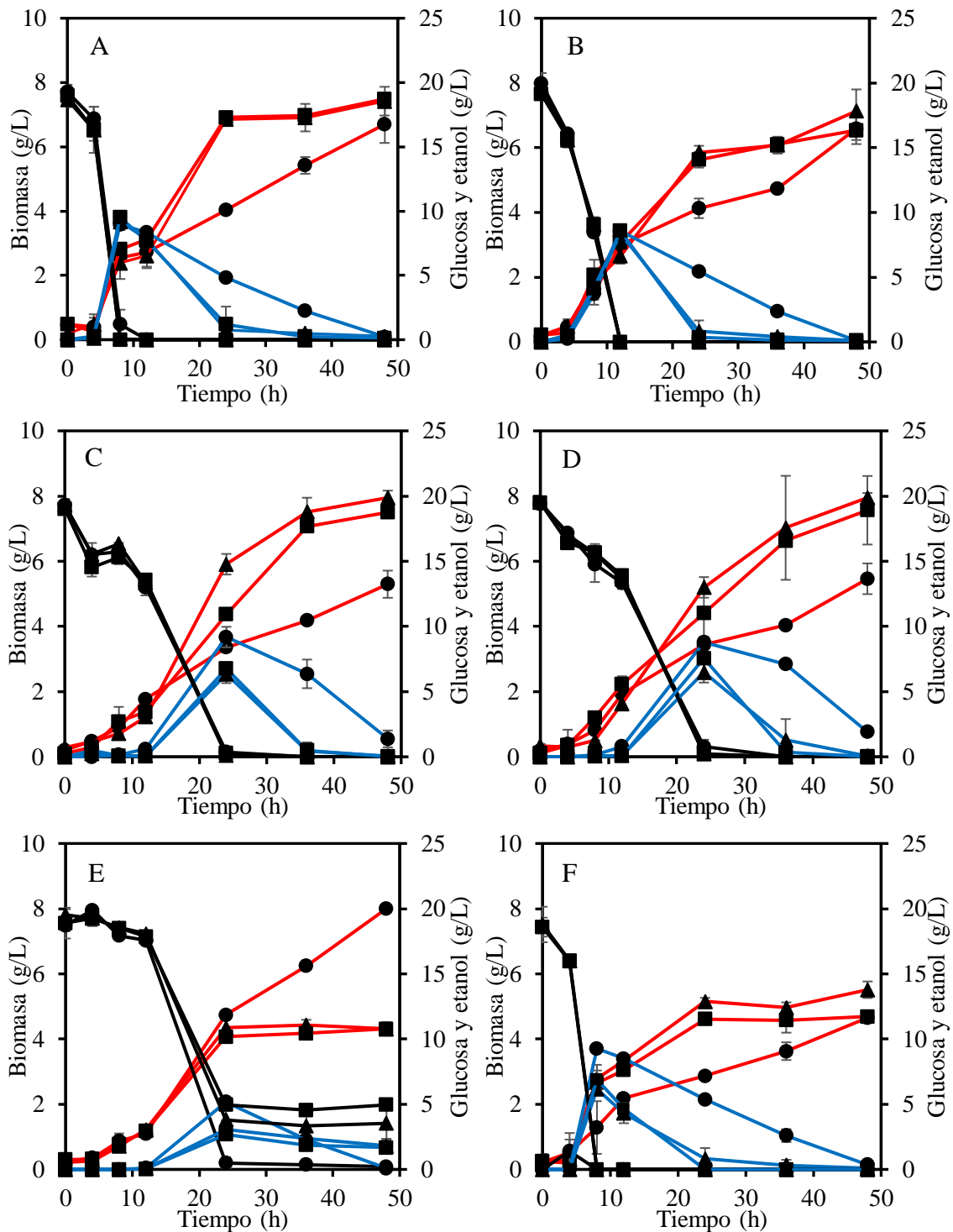


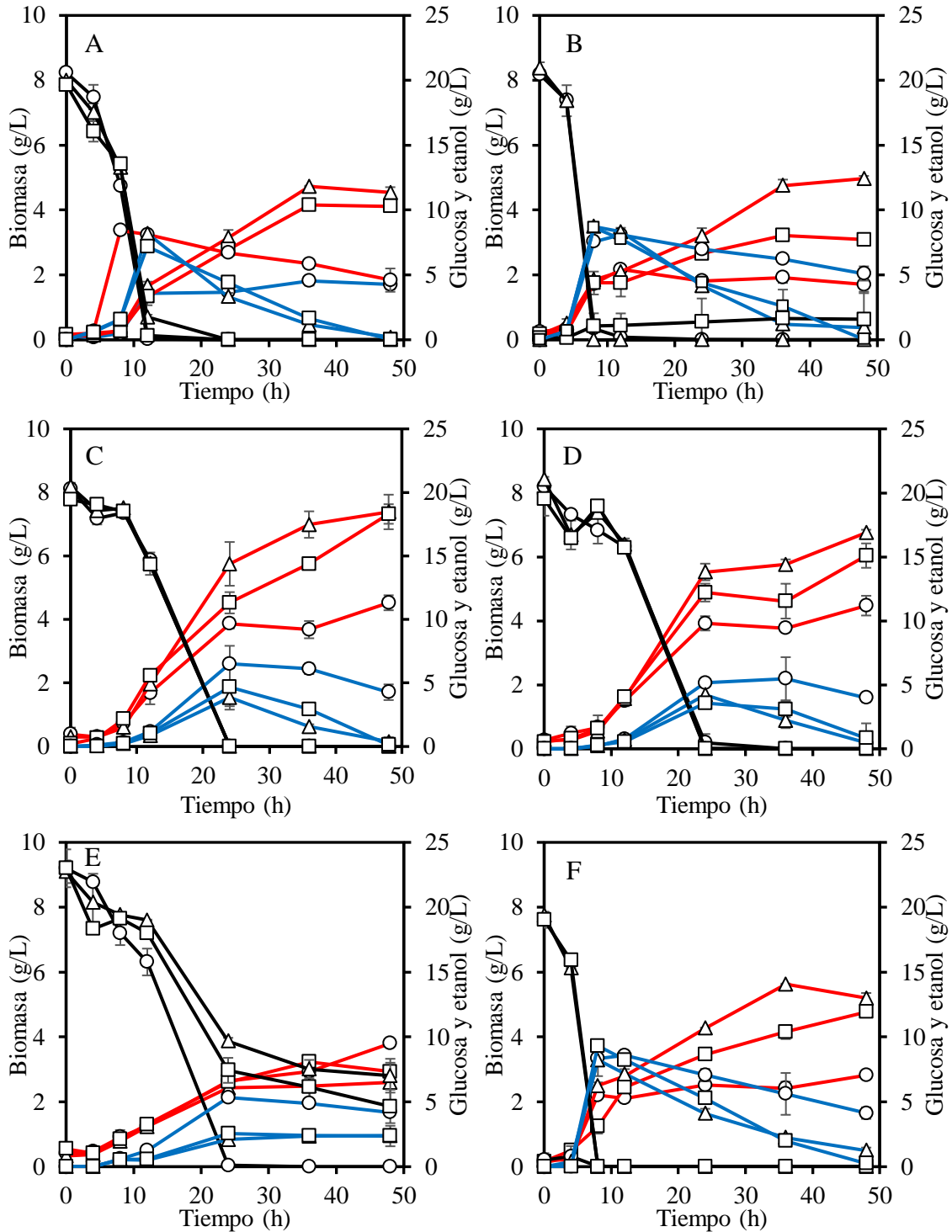
Figura AC2. Curvas de calibración de etanol, ácido acético, furfural e HMF.

**15.4. Anexo D. Producción de biomasa y evolución de la concentración de glucosa y etanol durante los experimentos con las diferentes levaduras utilizadas, los diferentes diseños de matraz, volúmenes de llenado y fuentes de carbono**

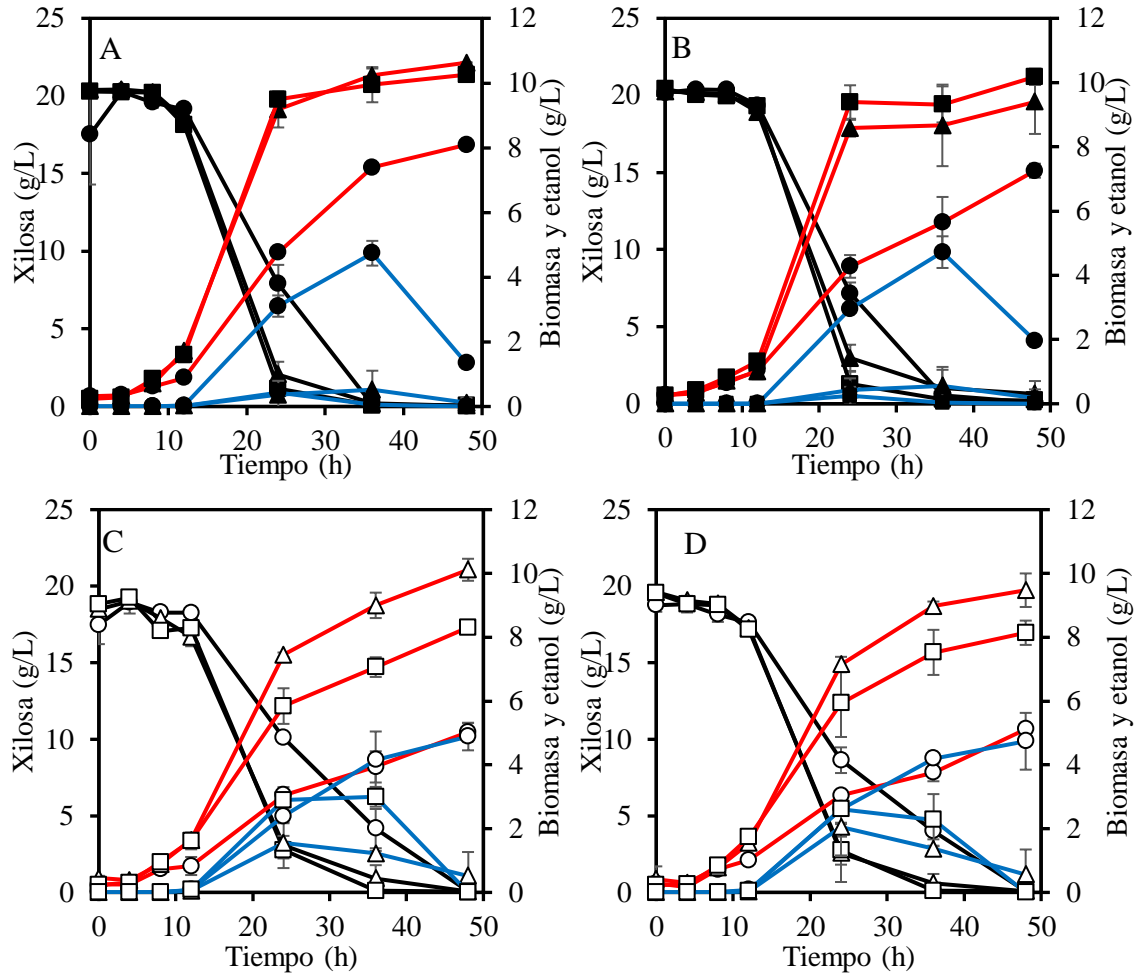


**Figura AD1.** Producción de biomasa (línea roja) y evolución de la concentración de glucosa (línea negra) y etanol (línea azul) durante los experimentos con las levaduras en diferentes diseños de matraz: convencional (●), con resorte (▲) y bafleado (■), con un volumen de llenado del 20%. *Saccharomyces cerevisiae* ITD00196 (A); *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería) (B); *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785 (C); *Scheffersomyces stipitis* Y-17104 (D); *Schwanniomyces occidentalis* ATCC26077 (E); *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 (F).

## ANEXOS



**Figura AD2.** Producción de biomasa (línea roja) y evolución de la concentración de glucosa (línea negra) y etanol (línea azul) durante los experimentos con las levaduras en diferentes diseños de matraz: convencional (○), con resorte (△) y bafleado (□), con un volumen de llenado del 40 %. *Saccharomyces cerevisiae* ITD00196 (A); *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería) (B); *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785 (C); *Scheffersomyces stipitis* Y-17104 (D); *Schwanniomyces occidentalis* ATCC26077 (E); *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 (F).



**Figura AD3.** Producción de biomasa (línea roja) y evolución de la concentración de xilosa (línea negra) y etanol (línea azul) durante los experimentos con las levaduras en diferentes diseños de matraz: convencional (●, ○), con resorte (▲, △) y bafleado (■, □). Los símbolos llenos y vacíos corresponden a un volumen de llenado del 20 y 40 %, respectivamente. *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785 (A y C); *Scheffersomyces stipitis* Y-17104 (B y D).

# ANEXOS

## 15.5. Anexo E. Análisis de varianza de los parámetros cinéticos obtenidos de la producción de biomasa y evolución de la concentración de glucosa y etanol durante los experimentos con las diferentes levaduras utilizadas, los diferentes diseños de matraz, volúmenes de llenado y fuentes de carbono

### AE5.1. *Saccharomyces cerevisiae* ITD00196

**Tabla AE5.1.1.** Análisis de varianza para  $X_{max}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	7.76713	2	3.88357	38.79	0.0004
B: Volumen de llenado	39.6419	1	39.6419	396.00	0.0000
INTERACCIÓN					
AB	2.53933	2	1.26967	12.68	0.0070
RESIDUO	0.600631	6	0.100105		
TOTAL (CORREGIDO)	50.549	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.1.3.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}'$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.00300289	2	0.00150144	9.80	0.0129
B: Volumen de llenado	0.0206172	1	0.0206172	134.56	0.0000
INTERACCIÓN					
AB	0.0044315	2	0.00221575	14.46	0.0051
RESIDUO	0.00091933	6	0.000153222		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0289709	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.1.5.** Análisis de varianza para productividad etanol - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.13953	2	0.0697649	78.32	0.0001
B: Volumen de llenado	0.12381	1	0.12381	139.00	0.0000
INTERACCIÓN					
AB	0.090803	2	0.0454015	50.97	0.0002
RESIDUO	0.00534448	6	0.000890747		
TOTAL (CORREGIDO)	0.359487	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.1.7.** Análisis de varianza para  $Y_{x/p}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.00134216	2	0.000671081	0.39	0.6925
B: Volumen de llenado	0.0284311	1	0.0284311	16.56	0.0066
INTERACCIÓN					
AB	0.00925888	2	0.00462944	2.70	0.1461
RESIDUO	0.0103025	6	0.00171709		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0493346	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.1.2.** Análisis de varianza para  $\alpha$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.281132	2	0.140566	219.40	0.0000
B: Volumen de llenado	0.181056	1	0.181056	282.60	0.0000
INTERACCIÓN					
AB	0.538381	2	0.269191	420.17	0.0000
RESIDUO	0.00384403	6	0.000640672		
TOTAL (CORREGIDO)	1.00441	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.1.4.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}''$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.023119	2	0.0115595	41.51	0.0003
B: Volumen de llenado	0.121686	1	0.121686	436.95	0.0000
INTERACCIÓN					
AB	0.00530295	2	0.00265148	9.52	0.0138
RESIDUO	0.00167092	6	0.000278487		
TOTAL (CORREGIDO)	0.151779	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.1.6.** Análisis de varianza para  $Y_{p/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.00235331	2	0.00117665	8.08	0.0199
B: Volumen de llenado	0.0224641	1	0.0224641	154.22	0.0000
INTERACCIÓN					
AB	0.00377685	2	0.00188842	12.96	0.0066
RESIDUO	0.00087398	6	0.000145663		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0294682	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

# ANEXOS

## AE5.2. *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería)

**Tabla AE5.2.1.** Análisis de varianza para  $X_{max}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	5.88403	2	2.94202	22.81	0.0016
B: Volumen de llenado	32.7096	1	32.7096	253.66	0.0000
INTERACCIÓN					
AB	2.55574	2	1.27787	9.91	0.0125
RESIDUO	0.773714	6	0.128952		
TOTAL (CORREGIDO)	41.9231	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.2.3.** Análisis de varianza para  $Y_{s/s}^1$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.000613307	2	0.000306653	1.34	0.3311
B: Volumen de llenado	0.0091356	1	0.0091356	39.81	0.0007
INTERACCIÓN					
AB	0.000689007	2	0.000344503	1.50	0.2961
RESIDUO	0.00137692	6	0.000229486		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0118148	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.2.5.** Análisis de varianza para productividad etanol - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.120232	2	0.0601158	499.02	0.0000
B: Volumen de llenado	0.0145047	1	0.0145047	120.40	0.0000
INTERACCIÓN					
AB	0.114476	2	0.0572379	475.14	0.0000
RESIDUO	0.0007228	6	0.000120467		
TOTAL (CORREGIDO)	0.249935	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.2.7.** Análisis de varianza para  $Y_{s/p}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.141314	2	0.0706571	16.87	0.0034
B: Volumen de llenado	0.214936	1	0.214936	51.30	0.0004
INTERACCIÓN					
AB	0.0417037	2	0.0208518	4.98	0.0532
RESIDUO	0.0251367	6	0.00418945		
TOTAL (CORREGIDO)	0.423091	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.2.2.** Análisis de varianza para  $\alpha$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.30012	2	0.15006	108.20	0.0000
B: Volumen de llenado	0.189857	1	0.189857	136.89	0.0000
INTERACCIÓN					
AB	0.513983	2	0.256992	185.30	0.0000
RESIDUO	0.00832136	6	0.00138689		
TOTAL (CORREGIDO)	1.01228	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.2.4.** Análisis de varianza para  $Y_{s/s}^2$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.0133577	2	0.00667886	10.91	0.0100
B: Volumen de llenado	0.0956046	1	0.0956046	156.12	0.0000
INTERACCIÓN					
AB	0.00521829	2	0.00260914	4.26	0.0705
RESIDUO	0.00367433	6	0.000612389		
TOTAL (CORREGIDO)	0.117855	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.2.6.** Análisis de varianza para  $Y_{p/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Configuración de matraz	0.000681795	2	0.000340898	4.31	0.0691
B: Volumen de llenado	0.0015893	1	0.0015893	20.10	0.0042
INTERACCIÓN					
AB	0.000446132	2	0.000223066	2.82	0.1369
RESIDUO	0.000474495	6	0.0000790825		
TOTAL (CORREGIDO)	0.00319172	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

# ANEXOS

## AE5.3. *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785

**Tabla AE5.3.1.** Análisis de varianza para  $X_{max}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	18.5517	2	9.27583	83.00	<b>0.0000</b>
B: Volumen de llenado	0.762855	1	0.762855	6.83	<b>0.0400</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.179282	2	0.0896408	0.80	0.4912
RESIDUO	0.67056	6	0.111176		
TOTAL (CORREGIDO)	20.1644	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.3.2.** Análisis de varianza para  $\alpha$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.00897662	2	0.00448831	17.26	<b>0.0032</b>
B: Volumen de llenado	0.00372064	1	0.00372064	14.31	<b>0.0091</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.0126456	2	0.0063228	24.32	<b>0.0013</b>
RESIDUO	0.00155989	6	0.000259981		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0269027	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.3.3.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}'$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0251928	2	0.0125964	41.75	<b>0.0003</b>
B: Volumen de llenado	0.00006075	1	0.00006075	0.20	0.6694
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.000996905	2	0.000498452	1.65	0.2682
RESIDUO	0.00181027	6	0.000301712		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0280607	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.3.4.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}''$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0502066	2	0.0251033	77.51	<b>0.0001</b>
B: Volumen de llenado	0.00490456	1	0.00490456	15.14	<b>0.0081</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.000738362	2	0.000369181	1.14	0.3805
RESIDUO	0.00194315	6	0.000323858		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0577927	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.3.5.** Análisis de varianza para productividad etanol - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0288502	2	0.0144251	7.93	<b>0.0206</b>
B: Volumen de llenado	0.0304114	1	0.0304114	16.73	<b>0.0064</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.000302682	2	0.000151341	0.08	0.9212
RESIDUO	0.0109076	6	0.00181793		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0704718	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.3.6.** Análisis de varianza para  $Y_{p/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.04337	2	0.021685	8.08	<b>0.0199</b>
B: Volumen de llenado	0.0603075	1	0.0603075	22.47	<b>0.0032</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.00119131	2	0.000595656	0.22	0.8073
RESIDUO	0.0161062	6	0.00268436		
TOTAL (CORREGIDO)	0.120975	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.3.7.** Análisis de varianza para  $Y_{x/p}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0735438	2	0.0367719	4.01	0.0782
B: Volumen de llenado	0.317753	1	0.317753	34.69	<b>0.0011</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.147146	2	0.0735729	8.03	<b>0.0201</b>
RESIDUO	0.05496	6	0.00915999		
TOTAL (CORREGIDO)	0.593403	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

# ANEXOS

## AE5.4. *Scheffersomyces stipitis* (Y-17104)

**Tabla AE5.4.1.** Análisis de varianza para  $X_{max}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	12.4686	2	6.2343	23.42	<b>0.0015</b>
B: Volumen de llenado	4.57617	1	4.57617	17.19	<b>0.0060</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.147701	2	0.0738506	0.28	0.7670
RESIDUO	1.59737	6	0.266229		
TOTAL (CORREGIDO)	18.7898	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.4.2.** Análisis de varianza para  $\alpha$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.00303751	2	0.00151876	1.30	0.3406
B: Volumen de llenado	0.0326355	1	0.0326355	27.84	<b>0.0019</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.000484595	2	0.000242297	0.21	0.8188
RESIDUO	0.00703315	6	0.00117219		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0431907	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.4.3.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}^1$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0139766	2	0.00698828	20.05	<b>0.0022</b>
B: Volumen de llenado	0.0000755008	1	0.0000755008	0.22	0.6581
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.000425252	2	0.000212626	0.61	0.5739
RESIDUO	0.0020917	6	0.000348616		
TOTAL (CORREGIDO)	0.016569	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.4.4.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}^2$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0307744	2	0.0153872	14.64	<b>0.0049</b>
B: Volumen de llenado	0.0170857	1	0.0170857	16.25	<b>0.0069</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.000273382	2	0.000136691	0.13	0.8805
RESIDUO	0.00630719	6	0.0010512		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0544406	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.4.5.** Análisis de varianza para productividad etanol - Suma de cuadrados tipo II

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.00283706	2	0.00141853	1.93	0.2260
B: Volumen de llenado	0.0751134	1	0.0751134	101.94	<b>0.0001</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.00719249	2	0.00359624	4.88	0.0552
RESIDUO	0.0044209	6	0.000736817		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0895638	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.4.6.** Análisis de varianza para  $Y_{p/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0230442	2	0.0115221	6.94	<b>0.0275</b>
B: Volumen de llenado	0.100211	1	0.100211	60.36	<b>0.0002</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.00335447	2	0.00167724	1.01	0.4186
RESIDUO	0.00996116	6	0.00166019		
TOTAL (CORREGIDO)	0.136571	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.4.7.** Análisis de varianza para  $Y_{x/p}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.525201	2	0.2626	10.22	<b>0.0117</b>
B: Volumen de llenado	0.363625	1	0.363625	14.16	<b>0.0094</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.883893	2	0.441947	17.20	<b>0.0033</b>
RESIDUO	0.15413	6	0.0256884		
TOTAL (CORREGIDO)	1.92685	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.



# ANEXOS

## AE5.5. Schwanniomyces occidentalis ATCC26077

**Tabla AE5.5.1.** Análisis de varianza para  $X_{max}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	13.718	2	6.85901	92.66	<b>0.0000</b>
B: Volumen de llenado	16.8713	1	16.8713	227.92	<b>0.0000</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	5.29131	2	2.64565	35.74	<b>0.0005</b>
RESIDUO	0.44413	6	0.0740216		
TOTAL (CORREGIDO)	36.3248	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.5.2.** Análisis de varianza para  $\alpha$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0276935	2	0.0138468	21.39	<b>0.0019</b>
B: Volumen de llenado	0.0151372	1	0.0151372	23.38	<b>0.0029</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.00221618	2	0.00110809	1.71	0.2581
RESIDUO	0.00388388	6	0.000647313		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0489308	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.5.3.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}'$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.00375671	2	0.00187836	6.59	<b>0.0306</b>
B: Volumen de llenado	0.0470251	1	0.0470251	164.90	<b>0.0000</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.000759185	2	0.000379592	1.33	0.3323
RESIDUO	0.00171104	6	0.000285173		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0532521	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.5.4.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}''$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0127167	2	0.00635836	10.14	<b>0.0119</b>
B: Volumen de llenado	0.0888552	1	0.0888552	141.68	<b>0.0000</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.0138235	2	0.00691177	11.02	<b>0.0098</b>
RESIDUO	0.00376285	6	0.000627142		
TOTAL (CORREGIDO)	0.119158	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.5.5.** Análisis de varianza para productividad etanol - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0389146	2	0.0194573	109.19	<b>0.0000</b>
B: Volumen de llenado	0.0019228	1	0.0019228	10.79	<b>0.0167</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.00418388	2	0.00209194	11.74	<b>0.0084</b>
RESIDUO	0.00106923	6	0.000178204		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0460905	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.5.6.** Análisis de varianza para  $Y_{p/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0181354	2	0.0090677	21.37	<b>0.0019</b>
B: Volumen de llenado	0.00484008	1	0.00484008	11.41	<b>0.0149</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.000257632	2	0.000128816	0.30	0.7489
RESIDUO	0.00254609	6	0.000424348		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0257792	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.5.7.** Análisis de varianza para  $Y_{x/p}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gf	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	1.29979	2	0.649896	387.82	<b>0.0000</b>
B: Volumen de llenado	0.382026	1	0.382026	227.97	<b>0.0000</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.444645	2	0.222323	132.67	<b>0.0000</b>
RESIDUO	0.0100547	6	0.00167578		
TOTAL (CORREGIDO)	2.13652	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

# ANEXOS

## AE5.6. *Kluyveromyces marxianus* (CBS6556)

**Tabla AE5.6.1.** Análisis de varianza para  $X_{max}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	6.73795	2	3.36897	159.30	<b>0.0000</b>
B: Volumen de llenado	0.897627	1	0.897627	42.44	<b>0.0006</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	2.48278	2	1.24139	58.70	<b>0.0001</b>
RESIDUO	0.126892	6	0.0211486		
TOTAL (CORREGIDO)	10.2452	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.6.3.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	1.40791	2	0.703953	4.92	0.0544
B: Volumen de llenado	13.5265	1	13.5265	94.45	<b>0.0001</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	1.35736	2	0.67868	4.74	0.0583
RESIDUO	0.859302	6	0.143217		
TOTAL (CORREGIDO)	17.151	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.6.5.** Análisis de varianza para productividad etanol - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0265498	2	0.0132749	5.06	0.0516
B: Volumen de llenado	0.0049167	1	0.0049167	1.87	0.2201
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.350735	2	0.175367	66.82	<b>0.0001</b>
RESIDUO	0.015748	6	0.00262466		
TOTAL (CORREGIDO)	0.397949	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.6.7.** Análisis de varianza para  $Y_{x/p}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.073003	2	0.0365015	9.63	<b>0.0134</b>
B: Volumen de llenado	0.0160894	1	0.0160894	4.24	0.0851
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.0313656	2	0.0156828	4.14	0.0743
RESIDUO	0.0227541	6	0.00379236		
TOTAL (CORREGIDO)	0.143212	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.6.2.** Análisis de varianza para  $\alpha$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.199558	2	0.099779	15.97	<b>0.0040</b>
B: Volumen de llenado	0.150595	1	0.150595	24.10	<b>0.0027</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.661144	2	0.330572	52.90	<b>0.0002</b>
RESIDUO	0.0374964	6	0.0062494		
TOTAL (CORREGIDO)	1.04879	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.6.4.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0189024	2	0.00945121	70.43	<b>0.0001</b>
B: Volumen de llenado	0.00312987	1	0.00312987	23.32	<b>0.0029</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.00551035	2	0.00275517	20.53	<b>0.0021</b>
RESIDUO	0.00080517	6	0.000134195		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0283478	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.6.6.** Análisis de varianza para  $Y_{p/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0149511	2	0.00747554	17.54	<b>0.0031</b>
B: Volumen de llenado	0.010836	1	0.010836	25.42	<b>0.0024</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.0121752	2	0.00608762	14.28	<b>0.0052</b>
RESIDUO	0.00255774	6	0.00042629		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0405201	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

# ANEXOS

## AE5.7. *Scheffersomyces stipitis* ATCC58785 cultivada en xilosa como fuente de carbono

**Tabla AE5.7.1.** Análisis de varianza para  $X_{max}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	30.876	2	15.438	219.63	0.0000
B: Volumen de llenado	10.1774	1	10.1774	144.79	0.0000
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	3.27169	2	1.63584	23.27	0.0015
RESIDUO	0.421753	6	0.0702922		
TOTAL (CORREGIDO)	44.7469	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.7.2.** Análisis de varianza para  $\alpha$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0244728	2	0.0122364	14.51	0.0050
B: Volumen de llenado	0.0273417	1	0.0273417	32.43	0.0013
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.00485533	2	0.00242766	2.88	0.1329
RESIDUO	0.00505868	6	0.000843113		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0617285	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.7.3.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0198594	2	0.0099297	84.73	0.0000
B: Volumen de llenado	0.03523	1	0.03523	300.62	0.0000
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.00102929	2	0.000514643	4.39	0.0669
RESIDUO	0.00070315	6	0.000117192		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0568218	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.7.4.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}''$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0518229	2	0.0259115	118.29	0.0000
B: Volumen de llenado	0.0148685	1	0.0148685	67.88	0.0002
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.0203207	2	0.0101603	46.38	0.0002
RESIDUO	0.00131428	6	0.000219047		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0883263	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.7.5.** Análisis de varianza para productividad etanol - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0841876	2	0.0420938	140.08	0.0000
B: Volumen de llenado	0	1	0	0.00	1.0000
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0	2	0	0.00	1.0000
RESIDUO	0.00180302	6	0.000300503		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0859906	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.7.6.** Análisis de varianza para  $Y_{p/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.11273	2	0.0563652	213.68	0.0000
B: Volumen de llenado	0.0142141	1	0.0142141	53.89	0.0003
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.00851633	2	0.00425816	16.14	0.0038
RESIDUO	0.00158271	6	0.000263785		
TOTAL (CORREGIDO)	0.137044	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.7.7.** Análisis de varianza para  $Y_{x/p}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	46.5247	2	23.2624	203.30	0.0000
B: Volumen de llenado	8.89465	1	8.89465	77.74	0.0001
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	39.6124	2	19.8062	173.10	0.0000
RESIDUO	0.686527	6	0.114421		
TOTAL (CORREGIDO)	95.7184	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

# ANEXOS

## **AE5.8. *Scheffersomyces stipitis* (Y-17104) cultivada en xilosa como fuente de carbono**

**Tabla AE5.8.1.** Análisis de varianza para  $X_{max}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	25.9803	2	12.9902	50.75	<b>0.0002</b>
B: Volumen de llenado	5.61031	1	5.61031	21.92	<b>0.0034</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	3.13499	2	1.56749	6.12	<b>0.0356</b>
RESIDUO	1.53593	6	0.255989		
TOTAL (CORREGIDO)	36.2615	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.8.2.** Análisis de varianza para  $\alpha$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.076608	2	0.038304	10.93	<b>0.0100</b>
B: Volumen de llenado	0.0487433	1	0.0487433	13.91	<b>0.0097</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.0169177	2	0.00845883	2.41	0.1701
RESIDUO	0.0210199	6	0.00350331		
TOTAL (CORREGIDO)	0.163289	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.8.3.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}'$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0372287	2	0.0186143	11.67	<b>0.0086</b>
B: Volumen de llenado	0.0197073	1	0.0197073	12.35	<b>0.0126</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.0117321	2	0.00586607	3.68	0.0907
RESIDUO	0.00957134	6	0.00159522		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0782394	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.8.4.** Análisis de varianza para  $Y_{x/s}''$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0665345	2	0.0332672	49.92	<b>0.0002</b>
B: Volumen de llenado	0.00989576	1	0.00989576	14.85	<b>0.0084</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.0071795	2	0.00358975	5.39	<b>0.0458</b>
RESIDUO	0.00399829	6	0.000666382		
TOTAL (CORREGIDO)	0.087608	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.8.5.** Análisis de varianza para productividad etanol - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0352273	2	0.0176137	56.93	<b>0.0001</b>
B: Volumen de llenado	0	1	0	0.00	1.0000
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0	2	0	0.00	1.0000
RESIDUO	0.00185619	6	0.000309365		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0370835	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.8.6.** Análisis de varianza para  $Y_{p/s}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	0.0812057	2	0.0406029	44.92	<b>0.0002</b>
B: Volumen de llenado	0.0156963	1	0.0156963	17.37	<b>0.0059</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	0.0053376	2	0.0026688	2.95	0.1280
RESIDUO	0.00542331	6	0.000903885		
TOTAL (CORREGIDO)	0.107663	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

**Tabla AE5.8.7.** Análisis de varianza para  $Y_{x/p}$  - Suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Configuración de matraz	64.0566	2	32.0283	63.28	<b>0.0001</b>
B: Volumen de llenado	5.04715	1	5.04715	9.97	<b>0.0196</b>
<b>INTERACCIÓN</b>					
AB	61.0103	2	30.5052	60.27	<b>0.0001</b>
RESIDUO	3.03693	6	0.506155		
TOTAL (CORREGIDO)	133.151	11			

Todas las relaciones F se basan en el error cuadrado medio residual.

## ANEXOS

### 15.6. Anexo F. Diseño factorial central compuesto con puntos estrella, superficies de respuesta y contornos, coeficientes de regresión y *p*-valores, usados para evaluar el efecto de la presión (temperatura) y tiempo de residencia en el pretratamiento térmico sobre la mezcla estándar de los residuos utilizados con adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 y 2 % (p/p) sobre la mezcla estándar de los residuos utilizados.

**Tabla AF1.** Diseño factorial central compuesto con puntos estrella, usado para evaluar el efecto de la presión (temperatura) y tiempo de residencia en el pretratamiento térmico sobre la mezcla estándar de los residuos utilizados con adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 %.

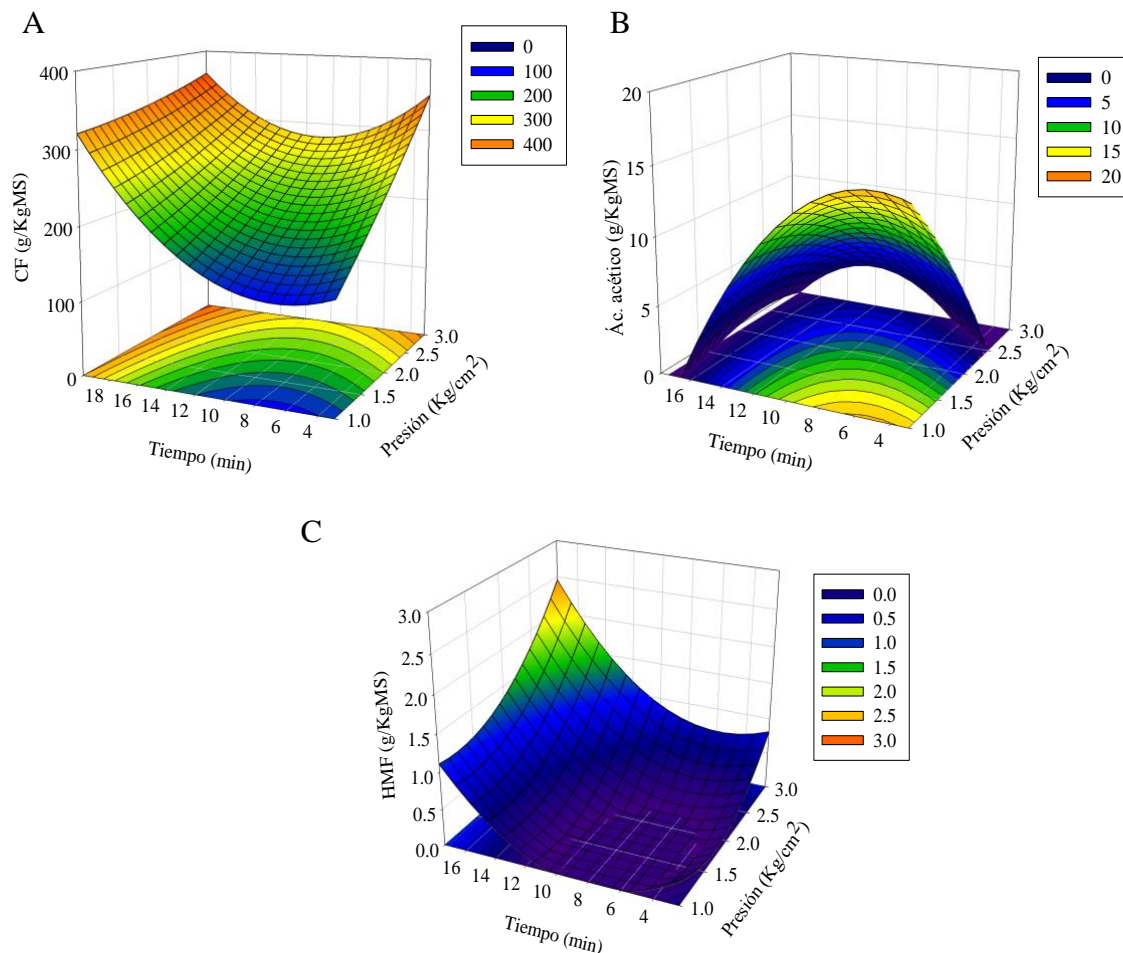
Tratamiento	Valores reales		Valores codificados		Variables de respuesta (g/kg MSI)							
	Presión <sup>a</sup> (kg/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (min)	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	FSC <sup>b</sup>	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Xilosa	CF <sup>c</sup>	Ácido acético	HMF
1	2.7 (140)	15	1	1	0.67	23.88 ± 0.01	129.73 ± 4.55	145.15 ± 4.97	5.56 ± 1.41	304.32 ± 6.88	2.55 ± 0.98	1.07 ± 0.17
2	2.7 (140)	5	1	-1	0.19	27.77 ± 0.03	129.81 ± 1.32	141.62 ± 0.95	6.88 ± 1.05	306.09 ± 1.93	2.83 ± 0.69	0.32 ± 0.19
3	1.3 (124)	15	-1	1	0.20	24.24 ± 2.30	99.19 ± 6.79	115.10 ± 0.95	2.70 ± 0.65	241.23 ± 7.26	2.28 ± 0.70	0.35 ± 0.10
4	1.3 (124)	5	-1	-1	-0.27	11.13 ± 1.87	59.10 ± 8.51	110.61 ± 7.32	0.56 ± 0.03	178.40 ± 11.38	13.73 ± 0.26	0.00 ± 0.00
5	2 (133)	10	0	0	-0.33	7.78 ± 0.70	79.17 ± 8.40	118.78 ± 11.18	0.87 ± 0.03	206.60 ± 14.00	11.14 ± 0.44	0.00 ± 0.00
6	2 (133)	10	0	0	-0.33	17.66 ± 0.40	88.51 ± 2.41	96.87 ± 4.17	1.09 ± 0.15	204.14 ± 4.84	1.75 ± 0.20	0.00 ± 0.00
7	2 (133)	17.05	0	1.41	0.52	23.22 ± 2.18	103.33 ± 2.44	115.32 ± 0.91	7.28 ± 2.50	249.14 ± 4.21	3.53 ± 0.41	1.52 ± 0.55
8	2 (133)	2.93	0	-1.41	-0.24	17.59 ± 1.20	96.46 ± 2.64	111.25 ± 2.77	0.00 ± 0.00	225.30 ± 4.02	4.15 ± 0.32	0.00 ± 0.00
9	3 (143)	10	1.41	0	0.59	25.10 ± 3.93	104.92 ± 10.90	120.69 ± 8.05	8.32 ± 2.23	259.04 ± 14.29	2.15 ± 0.47	1.08 ± 0.28
10	1 (120)	10	-1.41	0	-0.09	4.62 ± 0.17	39.42 ± 6.07	67.60 ± 10.21	8.68 ± 1.75	120.32 ± 12.01	13.85 ± 2.45	0.00 ± 0.00

<sup>a</sup>Valores en paréntesis corresponden a la temperatura (°C)

<sup>b</sup>Factor de severidad (FS) como se define en la ecuación 6.11

<sup>c</sup>Carbohidratos fermentables (FC) (Sac + Glu + Fru + Xil)

ETE: Esterilización térmica estándar



**Figura AF1.** Superficie de respuesta y contornos que muestran la interacción de la presión y el tiempo de resistencia en las variables de respuesta carbohidratos fermentables (Sac + Glu + Fru + Xil) (A), ácido acético (B) y HMF (C) después del pretratamiento térmico con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 % a diferentes condiciones.

**Tabla AF2.** Coeficientes de regresión y *p*-valores obtenidos del análisis estadístico del diseño factorial central compuesto con puntos estrella en el pretratamiento térmico sobre la mezcla estándar de los residuos utilizados con adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 %.

Términos del modelo <sup>a</sup>	CF <sup>b</sup> (g/kg MSI)		Ácido acético (g/kg MSI)		HMF (g/kg MSI)	
	Estimado	Valores <i>p</i> <sup>c</sup>	Estimado	Valores <i>p</i> <sup>c</sup>	Estimado	Valores <i>p</i> <sup>c</sup>
Constante	84.8345		34.6745		1.91336	
X <sub>1</sub>	89.3558	0.0000	-18.0274	0.0011	-1.59263	0.0009
X <sub>2</sub>	-9.95435	0.0027	-0.754797	0.0666	-0.237	0.0002
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	6.47227	0.4536	1.29934	0.5470	0.441378	0.0437
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-4.6144	0.0035	0.797403	0.0271	0.028667	0.3441
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	1.07765	0.0000	-0.05776	0.1863	0.01303	0.0056

<sup>a</sup>X<sub>1</sub>: Presión (kg/cm<sup>2</sup>) and X<sub>2</sub>: Tiempo de residencia (min).

<sup>b</sup>Carbohidratos fermentables (FC) (Sac + Glu + Fru + Xil).

<sup>c</sup>*p*<0.05 Indica un efecto significativo de la variable de respuesta.

## ANEXOS

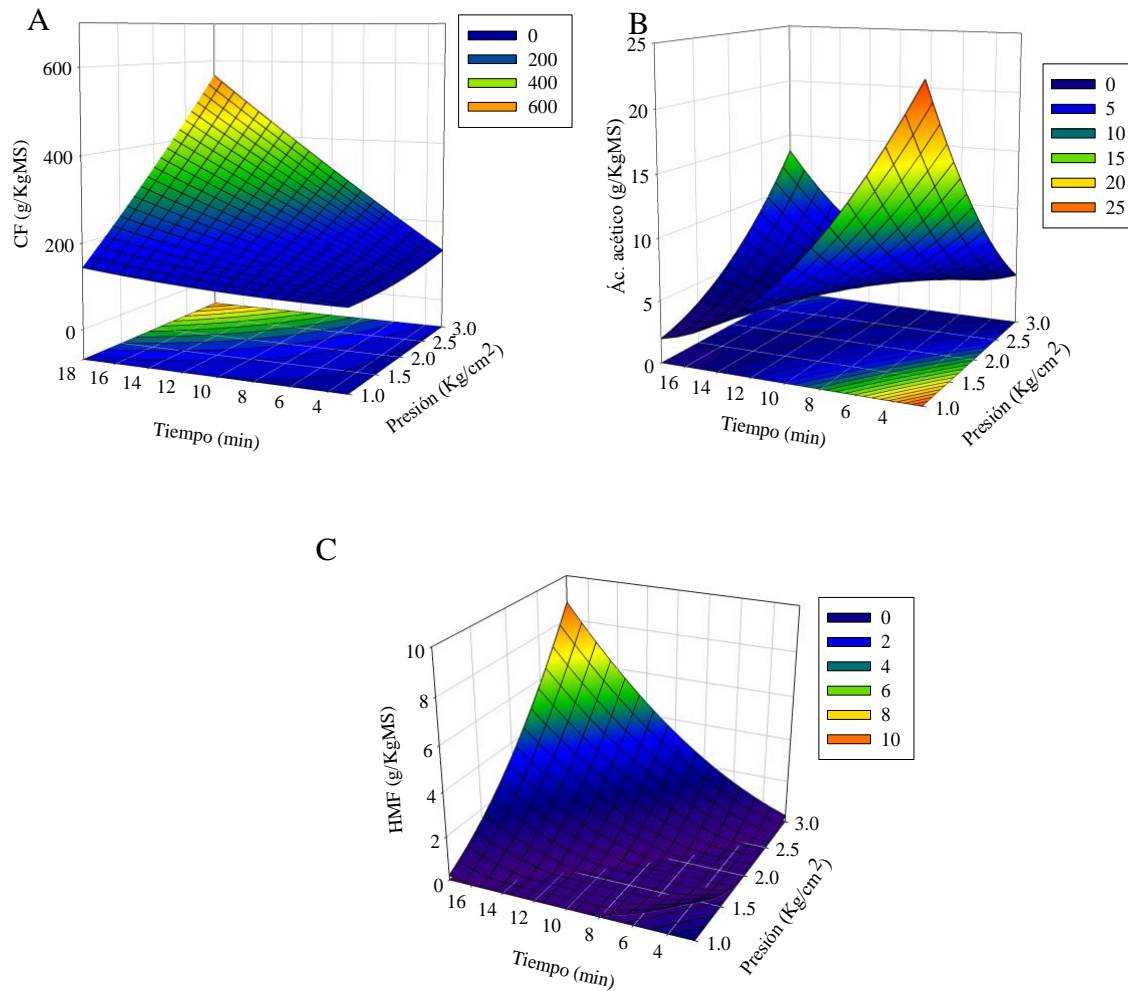
**Tabla AF3.** Diseño factorial central compuesto con puntos estrella, usado para evaluar el efecto de la presión (temperatura) y tiempo de residencia en el pretratamiento térmico sobre la mezcla estándar de los residuos utilizados con adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2 %.

Tratamiento	Valores reales		Valores codificados		Variables de respuesta (g/kg MSI)							
	Presión <sup>a</sup> (kg/cm <sup>2</sup> )	Tiempo (min)	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	FSC <sup>b</sup>	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Xilosa	CF <sup>c</sup>	Ácido acético	HMF
1	2.7 (140)	15	1	1	1.14	39.83 ± 0.70	197.64 ± 4.52	218.48 ± 4.71	31.00 ± 7.22	486.95 ± 9.75	9.92 ± 3.55	5.55 ± 0.52
2	2.7 (140)	5	1	-1	0.66	31.56 ± 13.47	79.21 ± 1.13	70.82 ± 6.35	7.22 ± 0.16	188.83 ± 14.94	2.59 ± 0.48	0.59 ± 0.05
3	1.3 (124)	15	-1	1	0.67	18.24 ± 0.35	95.31 ± 9.28	107.40 ± 10.91	8.82 ± 2.28	229.77 ± 14.51	2.76 ± 0.99	0.30 ± 0.04
4	1.3 (124)	5	-1	-1	0.20	7.75 ± 1.06	32.73 ± 2.08	78.77 ± 4.12	0.59 ± 0.09	119.84 ± 4.74	9.72 ± 2.07	0.00 ± 0.00
5	2 (133)	10	0	0	0.14	15.88 ± 0.98	62.22 ± 1.63	103.57 ± 4.77	1.57 ± 0.01	186.23 ± 5.14	5.17 ± 0.92	0.48 ± 0.06
6	2 (133)	10	0	0	0.14	21.83 ± 3.94	94.86 ± 5.74	107.28 ± 4.44	9.43 ± 0.02	233.40 ± 8.26	3.63 ± 1.82	0.44 ± 0.06
7	2 (133)	17.05	0	1.41	0.99	19.08 ± 0.54	106.94 ± 0.36	112.45 ± 1.09	13.04 ± 3.50	251.51 ± 3.72	3.52 ± 0.10	2.85 ± 0.37
8	2 (133)	2.93	0	-1.41	0.23	4.43 ± 0.06	32.34 ± 2.03	59.62 ± 5.42	10.62 ± 1.73	107.02 ± 6.04	15.11 ± 2.11	0.00 ± 0.00
9	3 (143)	10	1.41	0	1.06	19.73 ± 0.29	110.72 ± 4.62	119.83 ± 2.85	16.56 ± 1.65	266.84 ± 5.68	3.63 ± 0.50	2.95 ± 0.30
10	1 (120)	10	- 1.41	0	0.38	3.70 ± 1.90	23.21 ± 2.61	59.98 ± 2.04	11.01 ± 0.00	97.90 ± 3.82	11.15 ± 0.17	0.00 ± 0.00

<sup>a</sup>Valores en paréntesis corresponden a la temperatura (°C)

<sup>b</sup>Factor de severidad (FS) como se define en la ecuación 6.11

<sup>c</sup>Carbohidratos fermentables (FC) (Sac + Glu + Fru + Xil)



**Figura AF2.** Superficie de respuesta y contornos que muestran la interacción de la presión y el tiempo de resistencia en las variables de respuesta carbohidratos fermentables (Sac + Glu + Fru + Xil) (A), ácido acético (B) y HMF (C) después del pretratamiento térmico con la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2 % a diferentes condiciones.

**Tabla AF4.** Coeficientes de regresión y *p*-valores obtenidos del análisis estadístico del diseño factorial central compuesto con puntos estrella en el pretratamiento térmico sobre la mezcla estándar de los residuos utilizados con adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2 %.

Términos del modelo <sup>a</sup>	CF <sup>b</sup> (g/kg MSI)		Ácido acético (g/kg MSI)		HMF (g/kg MSI)	
	Estimado	Valores <i>p</i> <sup>c</sup>	Estimado	Valores <i>p</i> <sup>c</sup>	Estimado	Valores <i>p</i> <sup>c</sup>
Constante	180.27		48.2515		7.75969	
X <sub>1</sub>	-75.6217	0.0000	-20.0182	0.0391	-5.99389	0.0000
X <sub>2</sub>	-14.4577	0.0000	-3.98769	0.0046	-0.850485	0.0000
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	10.5272	0.4138	1.97897	0.2216	1.11421	0.0002
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	13.4423	0.0000	1.02103	0.0010	0.332342	0.0000
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	0.14414	0.5650	0.07724	0.0256	0.0209104	0.0003

<sup>a</sup>X<sub>1</sub>: Presión (kg/cm<sup>2</sup>) and X<sub>2</sub>: Tiempo de residencia (min).

<sup>b</sup>Carbohidratos fermentables (FC) (Sac + Glu + Fru + Xil).

<sup>c</sup>*p*<0.05 Indica un efecto significativo de la variable de respuesta.



### 15.7. Anexo G. Publicaciones y presentaciones en congresos

#### Presentaciones en congresos:

1. Raziel Estrada-Martínez, Juan Carlos García-Hernández, Gerardo Saucedo-Castañeda. Caracterización térmica de un biorreactor piloto intermitente para fermentación en medio sólido. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 21 al 26 de Junio de 2015. Guadalajara, Jalisco, México. Participación con cartel.
2. Estrada-Martínez R., García-Hernández J., Favela-Torres E., Soto-Cruz O., Saucedo-Castañeda G. Bioethanol production from the organic fraction of municipal solid wastes using *Saccharomyces cerevisiae* in a pilot plant batch bioreactor. BIO.IBEROAMÉRICA 2016. 5 al 8 de Junio de 2016. Salamanca, España. Participación oral.
3. Raziel Estrada-Martínez, Delfín Olivares-Rosales, Oscar Soto-Cruz, Ernesto Favela-Torres y Gerardo Saucedo-Castañeda. Efecto de la configuración de matraz en la producción de inóculos de *Saccharomyces cerevisiae* (ITD00196) para su uso en fermentación sólida. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 25 al 30 de Junio de 2017. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Participación con cartel.
4. Raziel Estrada-Martínez, Erandi Roa-Velázquez, Oscar Soto-Cruz, Ernesto Favela-Torres y Gerardo Saucedo-Castañeda. efecto del tratamiento ácido de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos sobre la producción de bioetanol. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 25 al 30 de Junio de 2017. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Participación con cartel.
5. Estrada-Martínez, R., Soto-Cruz, O., Favela-Torres, E. y Saucedo-Castañeda, G. Efecto de la configuración de matraz en la producción de inóculos de *Kluyveromyces marxianus* (CBS6556) para su uso en cultivos sólidos. IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx. 3 al 6 de Diciembre de 2017. Tlaxcala, México. Participación oral.
6. Estrada-Martínez, R., Favela-Torres, E., Soto-Cruz, O., Saucedo-Castañeda, G. Use of the organic fraction of food waste for bioethanol production in a batch bioreactor. 8<sup>th</sup> Food Science, Biotechnology and Safety Congress. Latin Food 2018. 14-16 de Noviembre de 2018. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Participación oral.

7. Estrada-Martínez, R. Fermentación en estado sólido: aspectos generales y casos de éxito. II Simposio de Biotecnología Industrial pasado, presente y futuro. 23 y 24 de Noviembre de 2018. Palmira (Valle), Cali, Colombia.

### **Patente en proceso de registro:**

1. Saucedo-Castañeda G., Favela-Torres E., Torres-Mancera M.T., Rosas-Ramírez T., Ruíz-Sánchez P., Estrada-Martínez R., Loera-Corral O., Viniegra González G., García-Hernández J.C., Figueroa- Montero A.A. y Martínez Valdez F.J. Biorreactor para la obtención de productos de alto valor agregado mediante cultivos en medio sólidos y sistema que lo comprende. Patente en trámite MX/E/2016/009654, del 25 julio 2016.

### **Artículo:**

1. Estrada-Martínez R., Favela-Torres E., Soto-Cruz N. O., Escalona-Buendía H. B., Saucedo-Castañeda G. (2019). A mild thermal pre-treatment of the organic fraction of municipal wastes allows high ethanol production by direct solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Aceptado.
2. Estrada-Martínez R., Favela-Torres E., Soto-Cruz N. O., Escalona-Buendía H. B., Saucedo-Castañeda G. (2019). Respirofementative metabolism in yeasts used in solid-state culture: ethanol production and the Crabtree effect. En redacción.



PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 7 del mes de junio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ERNESTO FAVELA TORRES
- DRA. LUZ MARIA ZENIT TOVAR CASTRO
- DR. QUENTIN CARBOUE
- DR. NICOLAS OSCAR SOTO CRUZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA  
DE: RAZIEL JESUS ESTRADA MARTINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



RAZIEL JESUS ESTRADA MARTINEZ  
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

VOCAL

DRA. LUZ MARIA ZENIT TOVAR CASTRO

VOCAL

DR. QUENTIN CARBOUE

SECRETARIO

DR. NICOLAS OSCAR SOTO CRUZ