



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

AMBIENTAL – RESIDUOS SÓLIDOS

EFFECTO DEL TIEMPO DE RETENCIÓN DE SÓLIDOS Y CARGA ORGÁNICA

SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS COMO PRECURSORES

DE FERMENTACIÓN ACETOBUTÍLICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA:

ADÁN TAPIA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. IDANIA VALDEZ VAZQUEZ

INSTITUTO DE INGENIERÍA UNIDAD ACADEMICA JURQUILLA

COMITÉ TUTORAL

DR. SIMÓN GONZÁLEZ MARTÍNEZ – INSTITUTO DE INGENIERÍA

DR. ARTURO SÁNCHEZ CARMONA – CINVESTAV GUADALAJARA

JURIQUILLA QUERÉTARO, NOVIEMBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Ricardo Morales Rodríguez

Secretario: Dr. Julián Carrillo Reyes

1er. Vocal: Dr. Arturo Sánchez Carmona

2do. Vocal: Dr. Simón González Martínez

3er. Vocal: Dra. Idania Valdez Vazquez

Lugar donde se realizó la tesis:

Instituto de Ingeniería, UNAM

Unidad Académica Juriquilla

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas

TUTOR DE TESIS



DRA. IDANIA VALDEZ VAZQUEZ

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Sostenibilidad Energética 2014-05 (CONACYT-SENER), Centro Mexicano de Innovación en Bioenergía, Clúster de Biocombustibles Gaseosos (No. 247006) y la DGAPA-UNAM proyecto PAPIIT (IA102018).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada 486515-291236 para realizar los estudios de maestría.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM y el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Agua, UNAM Campus Juriquilla, por las facilidades otorgadas para el uso de su equipo e instalaciones.

A la Dra. Idania Valdez Vázquez, infinitas gracias por la dirección de esta tesis, gracias por compartir su sabiduría, inteligencia, esfuerzo, paciencia y cariño para apoyarme en dar otro paso en mi vida profesional, su liderazgo es un gran ejemplo para mí y los que la rodean.

Al Dr. Simón González Martínez y Dr. Arturo Sánchez Carmona, por sus comentarios y apoyo para este trabajo en seminarios y tesis en general. A los doctores Julián Carrillo y Ricardo Morales por ser parte del jurado de esta tesis y sus comentarios.

A la M. en C. Marisol Pérez Rangel por su asesoría en laboratorio en general y para operación de biorreactores, parte fundamental de este trabajo, muchas gracias por su apoyo y aportes al grupo de bioalcoholes: Diana Tenorio, Lore Castillo, Caro Arellano, Ale Espinosa y Christian Hernández.

A los profesores del IINGEN de la Unidad Académica de Juriquilla, Dr. Germán, Dr. Julián, Dr. Guillermo, Dr. Iván, Dr. Alejandro y Dra. Karla por sus compartir sus conocimientos en clases y comentarios en seminarios y actividades de laboratorio.

Al personal técnico de LIPATA, M. en C Gloria Moreno por su apoyo en actividades de laboratorio, siempre con disposición a ayudar y trabajar arduamente, al M. en B. Jaime Pérez Trevilla por siempre apoyar y mantener trabajando equipos y laboratorios, gracias a su trabajo que también es parte de la presente tesis y muchas más. Al personal administrativo de LIPATA, Javier y Ángel y personal administrativo de IINGEN y Posgrado en CDMX, Ing. Cristina Araoz y Lucila Correa por su apoyo en trámites.

A mis compañeros de generación, Ale, Sharon, Yara, Daya, Alberto, Mau, Jonathan, Yeiner, Julián David y Julián Osvaldo por compartir esta aventura y salvar al planeta, podemos ser héroes, solo por un día. A las y los estudiantes de maestría y doctorado de otras generaciones previas y posteriores con los que tuve oportunidad de aprender y convivir.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, ¡goya!.

DEDICATORIAS

Gracias a mis padres Irene y Nicolás por su incondicional apoyo y amor que siempre me fortalece, durante esta etapa y toda la vida.

Gracias a mis hermanos y a mis sobrinos.

Amigos, por los buenos tiempos que pasamos, por los tiempos compartidos entre vinilos y tragos.

Marisol, nuevamente este logro es gracias a ti, en la parte académica y por ser parte de mi vida, gracias por tu amor, tu gran fortaleza e inteligencia y compartir tu tiempo conmigo.

Al universo, a la ciencia, a la magia, a la vida.

46&2, justo frente a mí.

Por mi raza hablará el espíritu

CONTENIDO

CONTENIDO.....	v
INDICE DE TABLAS.....	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 OBJETIVO GENERAL	3
1.3 OBJETIVOS PARTICULARES	3
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 COMBUSTIBLES FÓSILES Y EFECTOS EN EL MEDIO AMBIENTE.....	4
2.2 BIOENERGÍA Y BIOCOMBUSTIBLES	5
2.2.1 Clasificación de los biocombustibles	5
2.2.2 Biocombustibles líquidos	8
2.3 BIOMASA COMO MATERIA PRIMA DE BIOCOMBUSTIBLES 2G	11
2.3.1 Biomasa lignocelulósica.....	11
2.3.2 Paja de trigo.....	13
2.4 RUTAS TECNOLÓGICAS DE PRODUCCIÓN DE BIO-ALCOHOLES 2G.....	14
2.4.1 Plataforma bioquímica convencional	14
2.4.2 Sacarificación y Fermentación Simultánea	16

2.4.3 Bioproceso Consolidado.....	17
2.4.4 Plataforma de carboxilato.....	18
2.5.1 Factores de operación involucrados la fermentación ácido-mixta	20
2.5.2 Factores de operación involucrados la solventogénesis	23
3. METODOLOGÍA.....	26
3.1 FASE 1. FERMENTACIÓN ACIDO-MIXTA	27
3.1.1 Sustrato	27
3.1.2 Inóculo.....	27
3.1.3 Procedimiento y condiciones de operación	28
3.2 FASE 2: FERMENTACIÓN ACETOBUTÍLICA.....	32
3.2.1 Hidrolizado de paja de trigo	32
3.2.2 Efluentes acidogénicos	32
3.2.3 Cepa de trabajo	33
3.2.5 Procedimiento y condiciones de operación	33
3.2.6 Efecto del hidrolizado sobre la producción de butanol.	34
3.2.6 Efecto de los efluentes acidogénicos sobre la fermentación acetobutílica.....	35
3.3 METÓDOS ANALÍTICOS.....	37
3.3.1 Determinación de acetona, butanol, etanol y ácidos orgánicos.....	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38

4.1 FASE 1. FERMENTACIÓN ÁCIDO-MIXTA	38
4.1.1 Efecto de la carga orgánica sobre la fermentación ácido-mixta.....	46
4.1.2 Efecto del tiempo de retención de sólidos sobre la fermentación ácido-mixta	48
4.2 FASE 2. FERMENTACION ACETOBUTILICA	50
4.2.1 Efecto del hidrolizado sobre la producción de butanol	57
4.2.2 Efecto del ácido butírico sobre la fermentación acetobutílica.....	59
5. CONCLUSIONES.....	61
6. BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXO 1	74

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de operación para la fermentación ácido-mixta.....	30
Tabla 2. Diseño monofactorial con 5 niveles para evaluar el efecto del hidrolizado de paja de trigo sobre la fermentación acetobutílica.....	34
Tabla 3. Diseño monofactorial con 4 niveles para evaluar el efecto ácido butírico sobre la producción de butanol	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plataforma de carboxilato y fermentación acetobutílica para la producción de ácidos orgánicos y acetona, butanol y etanol.	20
Figura 2. Diagrama de la metodología desarrollada para la producción de ácidos orgánicos como precursores de acetona y butanol.	26
Figura 3. Operación de reactores en modo semi-continuo para la fermentación ácido-mixta.	29
Figura 4. Desempeño de los reactores de fermentación ácido-mixta operados a un tiempo de retención de sólidos de 5.0 días y cuatro cargas orgánicas.	39
Figura 5. Producción total de ácidos grasos volátiles en función de la carga orgánica, a tiempos de retención de sólidos de 2.5, 5.0 y 7.5 días. Letras diferentes significan diferencia entre tratamientos ($p < 0.05$).	41
Figura 6. Productividad de ácidos grasos volátiles en función de la carga orgánica, a tiempos de retención de sólidos de 2.5, 5.0 y 7.5 d. Letras diferentes significan diferencia entre tratamientos ($p < 0.05$).	43
Figura 7. Selectividad de ácido acético y ácido butírico función de la carga orgánica a tiempos de retención de sólidos de 2.5, 5.0 y 7.5 d. Letras diferentes significan diferencia entre tratamientos ($p < 0.05$).	45
Figura 8. Concentración y rendimiento de butanol en función del porcentaje de hidrolizado de paja de trigo.	51
Figura 9. Consumo de azúcares reductores en función del porcentaje de hidrolizado de paja de trigo.	52

Figura 10. Remoción de furfural y HMF en función de diferentes porcentajes de hidrolizado.....	53
Figura 11. Concentración y rendimiento de butanol en función de diferentes concentraciones de ácido butírico inicial.....	54
Figura 12. Concentración de ácido butírico al final de la incubación en función de diferentes concentraciones de ácido butírico inicial.....	55
Figura 13. Consumo de azúcares reductores en función de diferentes concentraciones de ácido butírico inicial.	56
Figura 14. Remoción de furfural y HMF en función de diferentes concentraciones de ácido butírico inicial.....	57

RESUMEN

Los ácidos grasos volátiles (AGV) son compuestos lineales de carboxilato de cadena corta de dos a seis átomos de carbono. Los AGV pueden ser utilizados como compuestos precursores de biocombustibles gaseosos como metano e hidrógeno y líquidos como butanol y biodiésel. Este estudio presenta la fermentación de un sustrato lignocelulósico donde se evaluaron los efectos individuales del tiempo de retención de sólidos (TRS) y la carga orgánica (CO) sobre la producción de AGV y la selectividad de ácido acético y butírico. En una primera fase, se operaron reactores semicontinuos independientes para evaluar las CO de 10, 40, 60 y 80 gST/kg-d y los TRS de 2.5, 5.0 y 7.5 d. Solo la CO presentó efecto significativo sobre la producción de AGV, donde la máxima producción de 18 ± 3 g_{DQOeq}/L se obtuvo a una CO de 60 gST/kg-d. Por otro lado, el TRS tuvo efecto significativo sobre la productividad, donde la máxima productividad de 4.5 ± 0.7 g_{DQOeq}/L se obtuvo al menor TRS de 2.5 d. Ni la CO ni el TRS tuvieron efecto sobre la selectividad de ácido butírico y ácido acético, representando 36% y 34%, respectivamente en casi todas las condiciones de operación. En la segunda fase, se estudió la producción de butanol utilizando diferentes porcentajes de un hidrolizado termoquímico (0%, 25%, 50%, 75% y 100%), donde la mayor producción y rendimiento de butanol fueron de 4.7 ± 0.3 g/L y 0.44 ± 0.02 g/g, respectivamente, en la condición de 100%. La presencia de HMF y furfural en bajas concentraciones (0.11 g/L y 0.03 g/L respectivamente) estimularon la producción de butanol. Finalmente, la adición de 4.3 g/L de ácido butírico al inicio de la fermentación acetobutílica con *Clostridium saccharobutylicum* BAA-117 incrementó 1.2 veces la producción de butanol.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población mundial tiene como consecuencia una mayor demanda de energía. Los combustibles de origen fósil han permitido el desarrollo de la sociedad actual. Sin embargo, en últimos años ha disminuido la disponibilidad de combustibles fósiles, mientras ha incrementado la dificultad de acceso a nuevos yacimientos petroleros. Aunado a lo anterior, existen diversos efectos adversos al ambiente debido a la extracción, procesamiento y uso de los combustibles fósiles, principalmente emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Por lo tanto, se ha incrementado el desarrollo de fuentes de energía renovables para cubrir la demanda energética actual (Li *et al.*, 2019). La biomasa se encuentra entre las opciones prometedoras de energías renovables. Entre los diferentes tipos de biomasa, los residuos lignocelulósicos, compuestos principalmente de celulosa, han generado un gran interés debido a su disponibilidad y potencial obtener biocombustibles de segunda generación, por ejemplo, biocombustibles gaseosos como el metano e hidrógeno y combustibles líquidos para el sector transporte como etanol y butanol (Sanchez *et al.*, 2017; De Bhowmick *et al.*, 2018; Valdez-Vazquez & Sanchez 2018). La producción de combustibles líquidos como etanol se lleva a cabo mediante fermentación alcohólica usando levaduras, mientras que la producción de butanol se lleva a cabo mediante fermentación acetobutílica con bacterias anaerobias del género *Clostridium* (Jones & Woods, 1986). Durante la fermentación acetobutílica, se producen además acetona y etanol, por lo que comúnmente se le denomina fermentación ABE (acetona-butanol-etanol) (Haigh *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). En la actualidad la investigación está enfocada en el desarrollo de tecnologías de producción de bio-alcoholes de segunda generación. El primer paso consiste en el pretratamiento del residuo

lignocelulósico para incrementar la accesibilidad a la celulosa, seguido de la hidrólisis en la que, por la actividad de enzimas específicas, se lleva a cabo el rompimiento de las cadenas de celulosa en monómeros de glucosa. En el siguiente paso, los azúcares son fermentados en bio-alcoholes (etanol o butanol), los cuales son finalmente recuperados en un proceso de destilación (Amiri & Karimi 2018). Una de las propuestas para la producción de biocombustibles de segunda generación está basado en plataformas bioquímicas, primero, el esquema conocido como la Plataforma de Carboxilato (Lynd *et al.*, 2005; Xin *et al.*, 2018), seguido de la fermentación ABE. En esta plataforma ocurre como primer paso un proceso de fermentación ácido-mixta realizada con consorcios microbianos que no requieren condiciones estériles ni utilización de enzimas para producir un efluente rico en ácidos orgánicos. En la segunda etapa, ocurre la fermentación ABE donde se utiliza un hidrolizado como fuente de carbono y la corriente de ácidos orgánicos anteriormente producida como precursor de acetona y butanol (Stein *et al.*, 2017).

En el presente trabajo, se propuso la evaluación del efecto de tiempo de retención de sólidos y carga orgánica sobre la producción y selectividad de ácidos orgánicos (acético y butírico) como precursores de acetona y butanol durante una fermentación acetobutílica. El sustrato utilizado consistió en paja de trigo, debido a su disponibilidad en el país.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Producir ácidos orgánicos (ácidos acético y butírico) como precursores de acetona y butanol en una fermentación acetobutílica a partir de paja de trigo.

1.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto del tiempo de retención de sólidos y la carga orgánica sobre la producción y selectividad de ácido acético y butírico a partir de paja de trigo utilizando consorcios microbianos.
- Determinar el efecto de efluentes acidogénicos sobre la producción de acetona-butanol-etanol a partir de hidrolizados de paja de trigo.

HIPÓTESIS

- El control de variables de operación como el tiempo de retención de sólidos y la carga orgánica permitirán incrementar la producción y modular la selectividad de ácido acético y butírico, los cuales servirán como precursores de acetona y butanol en una etapa de fermentación acetobutílica subsecuente.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 COMBUSTIBLES FÓSILES Y EFECTOS EN EL MEDIO AMBIENTE

A nivel mundial en 2017, la producción global de energía primaria fue de 13,800 millones de toneladas equivalentes de petróleo, con un aumento del 0.5% en comparación de 2016. Los países con mayor producción fueron China (17.2%), Estados Unidos (13.9%), Rusia (10%), Arabia Saudita (5%) e India (4%). México se situó en el doceavo puesto, escalando un lugar en comparación a 2016, con el 2.8% de la energía total producida en el mundo (Balance Nacional de Energía, 2017; IEA World Energy Balances, 2018).

Continuando con México, la Secretaría de Energía (SENER) a través del Balance Energético Nacional 2017, reporta una producción de energía de 7,027 PJ. De los cuales, las principales fuentes son los combustibles fósiles con un 89%, energía nuclear 1.61% y energías renovables solo 9.47% (conformada por hidroeléctrica 1.63%, geotérmica 1.81%, solar 0.22%, viento 0.54%, biomasa 5.23% biogás 0.04%).

En 2018, se emitieron a nivel mundial debido al uso de combustibles fósiles un total de 33,143 millones de toneladas de dióxido de carbono, de las cuales el sector transporte contribuye con el 20.50% de las emisiones de GEI, mientras que la generación de energía contribuye con el 28.40% (IEA, 2018). Para México, siguiendo la metodología establecida por el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), en 2015, el sector transporte aportó el 26.20% de las emisiones de GEI (Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero 2015).

Además de los efectos negativos del uso de combustibles fósiles en el clima global, existe una alta variabilidad en el comportamiento de los precios, una notable disminución de las reservas petroleras aunado a un creciente aumento de la demanda global de energía,

haciendo necesario desarrollar tecnologías de producción de energías renovables (Ruiz *et al.*, 2016).

2.2 BIOENERGÍA Y BIOCMBUSTIBLES

La Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos publicada en México en 2008, define a los biocombustibles como los combustibles obtenidos a partir de biomasa, provenientes de materia orgánica de las actividades agrícola, pecuaria, silvícola, acuicultura, algacultura, residuos de la pesca, domésticos, comerciales, industriales, de microorganismos y de enzimas, así como sus derivados.

2.2.1 Clasificación de los biocombustibles

Los biocombustibles se clasifican en generaciones según la materia prima empleada para su producción y su etapa de desarrollo (Christoforou & Fokaidis, 2018). Los biocombustibles de primera generación (1G) se producen con cultivos alimenticios específicos mediante tecnologías convencionales, como el bioetanol producido de caña de azúcar y maíz, el biodiésel a partir de semillas de cártamo o girasol (Eckert *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018;). Los biocombustibles de segunda generación (2G) se producen con materias primas ricas en azúcares, pero que no afecten directamente los productos de la canasta básica de alimentación humana (Hirani *et al.*, 2018), por ejemplo, los residuos de cultivos alimenticios del sector agroindustrial, como los rastrojos de cereales que están compuestos por material lignocelulósico. Los biocombustibles de tercera generación (3G) son producidos a partir de la materia prima modificada genéticamente de modo que facilita los procesos subsecuentes. En los biocombustibles 3G, los agentes de

conversión (microorganismos, principalmente algas) también son modificados genéticamente para que el proceso sea más eficiente (Chisti, 2018).

Otra clasificación de los biocombustibles es por su estado físico: sólidos, gaseosos y líquidos (Bhatt *et al.*, 2018). Dentro de los biocombustibles sólidos son aquellos materiales que son usados para combustión directa para generar calor o electricidad. Encontramos como biocombustibles sólidos a las materias lignocelulósicas procedentes del sector agrícola o forestal como pajas, restos de poda, y maderas (Tauro *et al.*, 2018). Los biocombustibles gaseosos incluyen al hidrógeno y metano, los cuales pueden ser producidos a través de la digestión anaerobia y fermentación oscura de materia orgánica (Xu *et al.*, 2018). Los biocombustibles gaseosos pueden ser usados en combustión directa o para la cogeneración de energía eléctrica. Finalmente, como biocombustibles líquidos se encuentra el biodiésel, producido por la esterificación de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales (Bhatt *et al.*, 2018), y el bioetanol y biobutanol producidos de la fermentación de azúcares presentes en cultivos y residuos de origen agrícola (Bhatt *et al.*, 2018). Los biocombustibles líquidos 1G se producen a partir de cultivos energéticos, dichos cultivos están enfocados en obtener biomasa transformable en biocombustibles líquidos, en lugar de producir alimentos (Nanda *et al.*, 2018). Por ejemplo, en Brasil se produce etanol a partir de caña de azúcar, mientras que en Estados Unidos se produce etanol a partir de los almidones de maíz (Appiah-Nkansah *et al.*, 2018). Sobre los biocombustibles 1G, su valorización en la actualidad se debe a tres factores principales: aumento de la seguridad energética nacional, reducción de emisiones de GEI y apoyo a comunidades e industrias del sector rural (Gomiero, 2018).

Los biocombustibles 2G se presentan como una alternativa de mayor responsabilidad social, considerando que no compiten por recursos para la producción de alimentos, respetando así elementos de soberanía alimentaria en países desarrollados y en desarrollo (Gonzalez *et al.*, 2018). Estas tecnologías están actualmente en una fase pre-comercial y se encuentra en evaluación su factibilidad y rentabilidad, pero la velocidad a la que se desarrollan sus tecnologías es muy alta, por lo que existe la posibilidad de que en el mediano plazo den resultados satisfactorios que permitan su implementación (Ghosh *et al.*, 2017). Además de la ventaja respecto a la valorización de un residuo sin afectar productos alimenticios, para biocombustibles 2G se estiman reducciones del 80% en las emisiones de GEI, en comparación con los combustibles fósiles, sin la necesidad de modificar los procesos agroindustriales desarrollados actualmente (Nguyen *et al.*, 2019). Sin embargo, algunos residuos lignocelulósicos son utilizados en la alimentación animal y, por lo tanto, están vinculados indirectamente a la cadena alimentaria. Además, los impactos sobre la biodiversidad y utilización de agua son también una preocupación: los cultivos alimentarios de alto rendimiento requieren una mayor cantidad de agua que si se mantienen dichas tierras de cultivo en su uso tradicional o de aprovechamiento básico (Campbell *et al.*, 2018). Actualmente se evalúa el impacto a la sustentabilidad que ocasiona su producción y uso, desde la perspectiva de análisis de ciclo de vida (Aguilar-Sánchez *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018; Roy & Dutta *et al.*, 2019).

Las tecnologías tradicionales en desarrollo para la producción de biocombustibles 2G se basan en la utilización de cultivos puros como inóculo y la fermentación de hidrolizados de materiales lignocelulósicos, aumentando los costos de producción (Valdez-Vazquez y Sanchez, 2017). Una reciente propuesta para la producción de biocombustibles

2G es la aplicación de consorcios microbianos que sean capaces de degradar y fermentar los residuos lignocelulósicos y su integración en sistemas de producción eficientes y robustos (de Souza Moraes *et al.*, 2018; Shanmugam *et al.*, 2019).

2.2.2 Biocombustibles líquidos

El etanol y butanol son biocombustibles líquidos con factibilidad de aplicación como sustitutos parciales o totales de la gasolina en vehículos automotores. Estos alcoholes presentan una mayor capacidad oxigenante comparados con los combustibles fósiles por su valor de octanaje (Li *et al.*, 2018). Estos alcoholes tienen entre 110 y 120 de octanaje comparado con la gasolina Premium comercializada a nivel nacional, con un valor de 93 (Castillo-Hernández *et al.*, 2012).

2.2.2.1 Etanol

El etanol es un líquido incoloro, volátil, de olor característico y produce vapores que son más pesados que el aire (Basile *et al.*, 2018). Es de interés como materia prima para la industria química, farmacéutica, agroalimentaria, entre otras, y es esencial en la producción de carburantes para vehículos automotores (Basile *et al.*, 2018). Su estado líquido le otorga compatibilidad con la infraestructura de almacenamiento y transporte de gasolina actual (Li *et al.*, 2018). Como carburante, el etanol actúa como agente oxigenante, aumentando el índice de octano, reduciendo el consumo de gasolina y las emisiones de CO₂ entre un 10 al 15% (Li *et al.*, 2018).

De manera tradicional, la industria petroquímica produce etanol a partir de la hidratación de etileno en mezcla con ácido sulfúrico concentrado. Por otra parte, el etanol

se produce mediante fermentación alcohólica de materias primas ricas en carbohidratos por la acción de levaduras (Ray & Ramachandran, 2018)

La aplicación más importante del etanol para el sector transporte es como aditivo para oxigenación de gasolina tradicional, reemplazando al metil ter-butil éter (MTBE, por sus siglas en inglés) (González *et al.*, 2018). El MTBE es un producto que mezclado con gasolina, reduce las emisiones de CO₂. Sin embargo, el MTEB es un compuesto contaminante de aguas subterráneas y clasificado por el sector salud como cancerígeno (Liadi *et al.*, 2018).

Las mezclas etanol-gasolina más utilizadas actualmente son E25, E15, E10 y E5, es decir gasolina al 75%, 85%, 90% y 95% aforadas con etanol (Man *et al.*, 2018). Si las mezclas de etanol-gasolina en motores de explosión se da en bajas proporciones, 5%, 10% y 15% (E5, E10 y E15, respectivamente), no es necesario realizar modificaciones en los motores y demás sistemas. Pero, si se utilizan mezclas superiores al 85% de etanol (>E85) motores y aditivos de los vehículos requieren modificaciones (González *et al.*, 2018).

2.2.2.2 Butanol

El butanol es un alcohol de cuatro carbonos (C₄H₁₀O), por lo que contiene más hidrógeno y carbono que el etanol, lo que facilita su mezclado con gasolina, diésel y otros hidrocarburos del sector transporte (Minteer, 2016). El butanol ha generado atención como combustible alternativo, de forma similar al etanol, por sus características fisicoquímicas y potencial energético (Jiang *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2018; Wen *et al.*, 2019).

En petroquímica, el butanol se produce principalmente por hidroformilación de propileno y gas de síntesis sobre un catalizador para producir n-butiraldehído e

isobutiraldehído, posteriormente la mezcla se hidrogena nuevamente y se destila para obtener los correspondientes alcoholes (Green *et al.*, 2011).

El butanol presenta beneficios adicionales en comparación con el etanol: contiene 110,000 BTU¹ por galón, cercano a los 115,000 del etanol, se puede mezclar con la gasolina convencional hasta en un 20% (B20), sin tener que hacer adaptaciones en los motores y es menos corrosivo que el etanol, por lo que se puede mezclar directamente con la gasolina en la refinería y transportarlo por las mismas infraestructuras petroleras de los combustibles tradicionales (Elfasakhany *et al.*, 2016).

¹ BTU, British thermal unit, unidad británica de calor, equivalente a 1,055.05 joules.

2.3 BIOMASA COMO MATERIA PRIMA DE BIOCOMBUSTIBLES 2G

La biomasa está representada por cualquier material biológico derivado de organismos vivos, como son maderas vírgenes, cultivos energéticos, lodos de aguas residuales y residuos agrícolas o agroindustriales (Popa & Volf, 2018). La biomasa se proyecta como una de las materias primas con mayor futuro para la producción de biocombustibles en México, considerando que las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) son menores comparando con el uso de combustibles fósiles y biocombustibles 1G (Saynes *et al.*, 2016). Su amplia disponibilidad en diferentes regiones del país, presenta escenarios de desarrollo económico y sostenibilidad (Ruiz *et al.*, 2016).

Los residuos agrícolas y agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido, generados por el consumo directo de productos primarios o su industrialización, dichos residuos ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que presentan capacidad de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico de interés comercial, específicamente, la producción de biocombustibles (Liguori y Faraco, 2016). Actualmente estos residuos representan un problema ambiental por su inadecuado manejo, falta de capacidad tecnológica y recursos económicos para su correcta disposición final, así como una legislación específica para promover la gestión de este tipo de residuos, que asegure un manejo adecuado (Sarris *et al.*, 2018).

2.3.1 Biomasa lignocelulósica

Los materiales lignocelulósicos son clasificados, en seis grupos principales: a) *residuos agrícolas*, por ejemplo bagazo de caña de azúcar, agave y rastrojos de cereales; b) *maderas duras*, como álamo; c) *maderas blandas*, como pino; d) *residuos lignocelulósicos*, como los residuos agrícolas, paja de trigo, paja de maíz bagazo de caña; e) *biomasa*

herbácea, como alfalfa y zacate y f) *fracción orgánica de residuos sólidos urbanos* (Mussatto, 2016).

La composición química de los materiales lignocelulósicos consiste principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, cada uno en porcentajes alrededor del 44%, 30% y 24%, respectivamente (Mussatto, 2016).

La celulosa es un homopolímero lineal estructurado por moléculas de glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). Su estructura se caracteriza por dividirse en regiones altamente cristalinas y regiones amorfas (Ballesteros *et al.*, 2018). En las regiones cristalinas, las microfibrillas tienen una estructura altamente ordenada mientras que las regiones amorfas presentan una estructura desordenada. Cuanto más ordenada y cristalina es la celulosa es menos soluble y más difícil de degradar, esto es de importancia para etapa de hidrólisis para bioprocesos para la obtención de biocombustibles (Ghasemi *et al.*, 2018).

La hemicelulosa está presente en la pared celular de los materiales lignocelulósicos, es un heteropolímero constituido por azúcares como D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, D xilulosa y por ácidos urónicos (Ballesteros *et al.*, 2018). Generalmente está constituida por una cadena principal de un azúcar único (p. ej. solamente xilanos) (Naidu *et al.*, 2018)

La lignina es un polímero tridimensional amorfo compuesto de monómeros, llamados alcoholes cinamílicos, estos son: alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Ballesteros *et al.*, 2018). La lignina confiere rigidez estructural al endurecer y sostener las fibras de polisacáridos además de participar en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos, es más recalcitrante a la degradación enzimática

que la celulosa y hemicelulosa y está unida a ambas formando una barrera impermeable que dificulta el ataque enzimático (Qiao *et al.*, 2019).

2.3.2 Paja de trigo

El trigo pertenece a la familia de las gramíneas (*Poaceae*), siendo las variedades más cultivadas *Triticum durum* y *T. compactum*. El trigo ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre, siendo el cereal más cultivado a nivel mundial, es considerado un alimento para consumo humano, aunque gran parte se destina a la alimentación animal, así como a subproductos de la transformación industrial destinado para piensos (CEPAL, 2017). Los cinco principales estados productores de trigo en el país son Sonora, con 1.65 millones de toneladas; Baja California, 447 mil toneladas; Guanajuato, 343 mil toneladas, Sinaloa, 292 mil toneladas; y Michoacán, 257 mil toneladas (SIAP, 2018).

Posterior a la cosecha, se realiza la separación en la que el grano es utilizado para su procesamiento y consumo, y como subproducto se tiene a la paja de trigo. La paja de trigo es un material lignocelulósico rico en azúcares, su utilización en alimentación animal está limitada por su bajo valor nutritivo (Velásquez *et al.*, 2015). La composición de la paja depende de la proporción de hojas/tallos, el diámetro del tallo y la altura de la planta, de modo que se presentan variaciones ligadas a la especie y el clima del lugar (Wiselogel *et al.*, 2018). Su composición generalmente es celulosa, hemicelulosa y lignina en un 40, 20 y 10%, respectivamente. Además de otros compuestos como fenoles, resinas, gomas, entre otros que constituyen un 5% (Sanchez *et al.*, 2017).

La paja de trigo residual presenta factibilidad para su revalorización para la producción de bio-alcoholes mediante procesos biológicos, mediante diferentes rutas

tecnológicas (Sanchez *et al.*, 2017; Amiri *et al.*, 2018; Qureshi *et al.*, 2018; Valdez-Vazquez & Sanchez, 2018).

2.4 RUTAS TECNOLÓGICAS DE PRODUCCIÓN DE BIO-ALCOHOLES 2G

2.4.1 Plataforma bioquímica convencional

La plataforma bioquímica convencional consiste en un proceso secuencial de varias etapas, en donde el pre-tratamiento, la producción de enzimas, la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de la glucosa se efectúan en reactores diferentes (Amiri *et al.*, 2018). La principal ventaja de este esquema convencional es que cada etapa se lleva a cabo bajo condiciones óptimas de pH y temperatura. En una primera etapa la fracción rica en celulosa es hidrolizada a glucosa. Posterior a la hidrólisis y separación de la lignina, la glucosa resultante es fermentada y convertida en bio-alcoholes. Consiste en general en los siguientes pasos (Qureshi *et al.*, 2013; Amiri *et al.*, 2018; Sarangi & Nanda 2018).

1. **Pretratamiento:** Es el rompimiento de la estructura de la matriz lignocelulósica para liberar la lignina y la hemicelulosa. Las diferentes tecnologías de pretratamiento de materiales lignocelulósicos pueden ser clasificadas según su naturaleza en pretratamiento físicos, químicos, físico-químicos y biológicos (Jiang *et al.*, 2018). Los métodos aplicados suelen combinar diferentes principios mecánicos en conjunto con efectos térmicos y químicos con la finalidad de lograr una eficiente liberación de azúcares. Las líneas de investigación se enfocan procesos eficientes con la reducción de la producción de inhibidores y un bajo consumo de energía (Tian *et al.*, 2018).

2. **Producción de enzimas.** Para la etapa de hidrólisis de celulosa, se requiere la acción de tres grupos de enzimas, llamadas endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasa (Simas-Dias *et al.*, 2018). Para la degradación de la hemicelulosa se requiere la aplicación de una menor cantidad de enzimas debido a que tiene menor complejidad que la celulosa (Gandla *et al.*, 2018). Estas enzimas son adquiridas y adicionadas, o pueden ser producidas en otro proceso independiente. Estas enzimas pueden ser producidas por hongos como *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* y algunas especies de bacterias como *Bacillus*, *Clostridium* y *Streptomyces* (Conesa *et al.*, 2018; Pang *et al.*, 2018).
3. **Hidrólisis enzimática (Sacarificación):** Consiste en la despolimerización de celulosa con la aplicación de enzimas específicas que sean capaces de liberar las azúcares simples contenidas en los materiales lignocelulósicos, con el fin de romper las cadenas de celulosa en monómeros de glucosa, para su posterior fermentación (Guo *et al.*, 2018). Se emplean diversas enzimas, la degradación de celulosa es llevada a cabo por celulasas y para la degradación de hemicelulosa se emplea hemicelulasa (Li *et al.*, 2018). El proceso en general consiste en lo siguiente, el hidrolizado es agitado (100 rpm), a 45 °C con pH de 5.0 y se añade la dosis de enzimas por unidad de volumen de hidrolizado (Saha *et al.*, 2005).
4. **Fermentación:** Para la fermentación acetobutílica del hidrolizado producido, se requieren microorganismos con la capacidad de metabolizar dos tipos de azúcares: las hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y pentosas (xilosa y arabinosa) (Rech *et al.*, 2019). Además, estos microorganismos deben soportar la presencia de inhibidores, como ácidos débiles, furaldehídos y compuestos fenólicos generados en la etapa del pretratamiento (Ladeira-Ázar *et al.*, 2018). En procesos industriales,

Saccharomyces cerevisiae es capaz de fermentar todo tipo de hexosas con rendimientos cercanos al teórico (0.51 g etanol/g glucosa), además de mostrar tolerancia a los inhibidores producidos en etapas previas (Rech *et al.*, 2019). No obstante, para la fermentación de materiales lignocelulósicos con *S. cerevisiae*, no es posible lograr la conversión de las pentosas como la xilosa, por lo que actualmente es de interés la aplicación de microorganismos capaces de fermentar ambos grupos de azúcares en bio-alcoholes y que sean tolerantes a los compuestos inhibidores generados durante el proceso (Silva *et al.*, 2018; Tabañag *et al.*, 2018).

5. **Destilación:** Consiste en la recuperación de producto, las bajas concentraciones en el caldo de fermentación (en general alrededor del 10%), requieren sistemas de separación eficientes que permitan su extracción de forma continua. De manera tradicional, se utilizan sistemas de membrana usando solventes comerciales (éter de petróleo, hexano y tolueno) como agente extractor (Rdzanek *et al.*, 2018).

2.4.2 Sacarificación y Fermentación Simultánea

El proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF, *por sus siglas en inglés*) consiste en una modificación del proceso convencional, en el que después del pretratamiento, se lleva a cabo la sacarificación y la fermentación en una sola operación unitaria (Haigh *et al.*, 2018).

Varios estudios reportan rendimientos de bio-alcoholes mayores mediante SSF comparado con el proceso convencional (Haigh *et al.*, 2018; Li, & He, 2016; Saha *et al.*, 2015). Este proceso permite menor tiempo de incubación, evitando un efecto de inhibición a las enzimas hidrolíticas (de Araujo Guilherme *et al.*, 2019). Además, desde el punto de

vista operativo se reducen costos por la disminución del número de reactores y por ende de equipos y aplicación de energía (Saha *et al.*, 2015).

Sin embargo, presenta algunas desventajas; las condiciones de operación para las etapas de sacarificación y fermentación son diferentes, por lo que en SSF deben realizarse a una temperatura y pH intermedio para ambos casos (37-40°C y pH entre a 4-5) (Shaw *et al.*, 2018). Por lo que es necesario un control más estricto de operación, estas alteraciones implican la disminución del rendimiento de alguna de las dos etapas. (Mithra *et al.*, 2018).

2.4.3 Bioproceso Consolidado

El esquema de bioproceso consolidado (CBP, *por sus siglas en inglés*), consiste en que la producción de enzimas, sacarificación y fermentación ocurren en un solo reactor (Lynd *et al.*, 2005). El principal requerimiento del CBP consiste en la aplicación de un microorganismo o un conjunto de microorganismos con capacidad de lograr las etapas de hidrólisis, sacarificación y fermentación de la biomasa lignocelulósica sin la adición de enzimas exógenas (Jiang *et al.*, 2018; Xin *et al.*, 2018).

El CBP puede reducir de forma notable los costos de inversión y operación en comparación a los procesos tradicionales de producción de bio-alcoholes (Valdez-Vazquez & Sanchez, 2018; Carrillo-Nieves *et al.*, 2019). Esto resulta al reducir los costos por el pretratamiento de la materia prima, se evitan condiciones de esterilidad, se evita la aplicación de enzimas y ahorro en cantidad equipos e instrumentación (den Haan *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018).

2.4.4 Plataforma de carboxilato

Como se mencionó previamente, para la obtención de azúcares fermentables a partir de biomasa lignocelulósica son necesarios procesos de pretratamiento e hidrólisis enzimática, desafortunadamente la aplicación de enzimas incrementa los gastos de producción (Valdez-Vazquez & Sanchez, 2018).

La tecnología denominada Plataforma de carboxilato (Holtzaple y Granda, 2009) ha sido usado para describir proceso biológico con la aplicación de un consorcio microbiano indefinido, para producir una mezcla de carboxilatos como productos químicos de plataforma intermedia hacia la generación de combustibles más complejos. Los carboxilatos son ácidos orgánicos disociados que se caracterizan por la presencia de al menos un grupo carboxilo, producidos por fermentación ácido-mixta (Strazzera *et al.*, 2018). Los carboxilatos de cadena corta (acetato, propionato, lactato y n-butirato) son los principales productos de reacciones de fermentación primaria, estos por si mismos son productos valiosos cuando se logra su separación del caldo de cultivo (Liu *et al.*, 2019). Estos ácidos orgánicos pueden ser utilizados como precursores de acetona y butanol en un proceso subsecuente de fermentación acetobutílica (Li *et al.*, 2018). Por lo que, una ventaja del proceso de plataforma de carboxilato son que, permite evitar o reducir los costos de la hidrólisis enzimática, ya que al emplear consorcios microbianos no hay necesidad de condiciones estériles a diferencia de los cultivos puros (Chang *et al.*, 2010).

Las especies clostridiales que desarrollan la fermentación acetobutílica, se caracterizan por la separación de su metabolismo en dos fases específicas: acidogénesis y solventogénesis. La acidogénesis, se desarrolla durante el crecimiento celular exponencial y el acetyl-coA producido por la ruta Embden-Mayhof es asimilado, principalmente para la

obtención de ácido acético y ácido butírico además de la producción de ATP vía acetato kinasa (*Ack*) y butirato kinasa (*Buk*). La acumulación de estos ácidos orgánicos causa una disminución en el pH en el proceso, en valores de 4.5-5.0 para la mayoría de las cepas. Esta disminución de pH desencadena la segunda fase de solventogénesis, el crecimiento celular alcanza la fase estacionaria y los ácidos orgánicos de la etapa anterior son asimilados y se producen acetona, butanol y etanol con un aumento del pH en el medio (Sarangi & Nanda, 2018).

Con este antecedente, actualmente se propone aprovechar biomasa lignocelulósica para la producción de ácido acético y butírico como precursores de acetona y butanol, primero, los ácidos orgánicos en un bioproceso de fermentación ácido-mixta para posteriormente integrarlos a un proceso de fermentación acetobutílica. Biomasa lignocelulósica como paja de arroz y paja de trigo, xilano e hidrolizados ha sido utilizados como materia prima para estos bioprocesos, como inóculo se han probado consorcios microbianos de diferentes fuentes, como lodos de PTAR, estiércoles y ensilados (Li *et al.*, 2018; Chi *et al.*, 2019; Shanmugam., *et al.*, 2019). La biomasa lignocelulósica es sometida a pretratamiento, dónde se obtiene un hidrolizado enriquecido en azúcares (30-40 g/L de azúcares reductores) enviado a fermentación acetobutílica, los sólidos de pretratamiento, enriquecidos en celulosa son alimentados a fermentación ácido-mixta para la obtención de ácido acético y butírico (4-6 g/L de ácido butírico) (Li *et al.*, 2018). Los ácidos orgánicos obtenidos son enviados también a la fermentación acetobutílica para la producción de acetona y butanol, alcanzando concentraciones de 12-14 g/L de butanol (Lazuka *et al.*, 2017; Li., *et al.*, 2018; Chi *et al.*, 2019; Shanmugam., *et al.*, 2019). En la figura 1, se muestra un diagrama de este bioproceso.

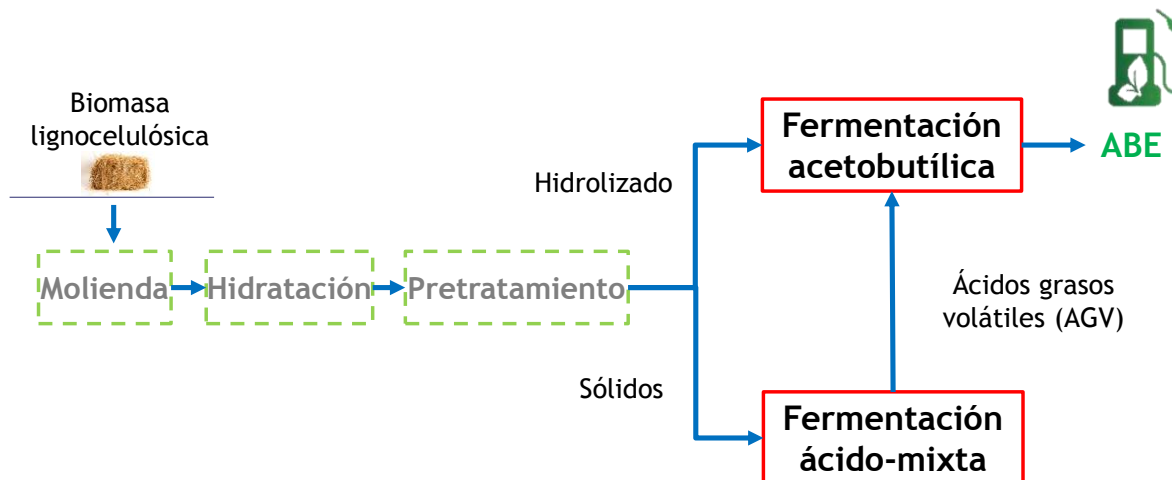


Figura 1. Plataforma de carboxilato y fermentación acetobutílica para la producción de ácidos orgánicos y acetona, butanol y etanol.

2.5.1 Factores de operación involucrados la fermentación ácido-mixta

Algunos factores que determinan la producción y selectividad de ácidos orgánicos son el sustrato, inóculo, pH, temperatura, tiempo de retención, carga orgánica y espacio de cabeza (Lee *et al.*, 2014).

2.5.1.1 Características y concentración de sustrato

Las características del sustrato son un factor involucrado en la producción y composición de ácidos orgánicos, principalmente por el efecto de la relación carbono/nitrógeno (C/N) que favorezca una comunidad microbiana ideal y actividad enzimática funcional, por ejemplo, una relación de C/N baja (C/N=7) de un sustrato rico en proteínas, favorece la producción de ácido propiónico y el desarrollo de especies como *Clostridia*, *b-Proteobacteria*, y *Bacteroidetes* (Feng *et al.*, 2009).

La concentración de sustrato es un factor que puede afectar el proceso de fermentación ABE, por lo que, el contenido de sólidos en el medio define dos tipos de procesos: fermentación húmeda para un contenido de sólidos <15% y fermentación seca para un contenido de sólidos >15 a 20%. Estudios previos indican que, utilizando paja de trigo como sustrato operando con un alto contenido de sólidos, favorece un aumento en la producción ácidos acético y butírico en una relación butírico/acético de 2.5, desafortunadamente, la producción total de ácidos orgánicos disminuye alrededor de un 30% (Motte *et al.*, 2013).

2.5.1.2 Tipo de inóculo

Estudios muestran la producción de ácidos orgánicos con la utilización de cultivos mixtos, gracias a la acción conjunta de microorganismos hidrolíticos y fermentativos. El tratamiento térmico a 100 °C al inóculo elimina microorganismos metanogénicos no formadores de esporas favoreciendo la producción de ácidos orgánicos en la fase líquida e hidrógeno en la fase gaseosa (Yan *et al.*, 2014).

2.5.1.3 pH y temperatura

El pH es un factor crítico, por lo que el valor de pH debe ser óptimo para la etapa de hidrólisis y fermentación ácido-mixta, que favorezca el desarrollo adecuado de microorganismos funcionales. En previos estudios se evalúan rangos de pH entre 5.0 y 7.0 y diferentes soluciones buffer, encontrando como valores de pH óptimos entre 6.0 y 6.5 que favorecen una mayor concentración de ácido butírico (Ai *et al.*, 2014).

La temperatura es un factor en el crecimiento de los microorganismos, la actividad enzimática y la hidrólisis de materia orgánica particulada en metabolitos solubles. En

condiciones mesofílicas (37 °C) es considerado eficiente y económicamente redituable comparado con el rendimiento obtenido a mayor temperatura. Sin embargo, la operación en condiciones termofílicas favorece la selectividad de ácidos orgánicos producidos, estudios previos demuestran que en fermentaciones a 55 °C, el ácido butírico es el de mayor producción con 81% del total de ácidos orgánicos producidos, seguido de ácido acético y propiónico (Zhou *et al.*, 2018).

2.5.1.5 Tiempo de retención

El tiempo de retención para la producción de ácidos orgánicos es variable en función del tipo de sustrato, un tiempo de retención mayor permitirá un mayor consumo de sustrato, sin embargo, tiempos de retención cortos permiten una mayor producción de ácidos orgánicos ya que se evita el desarrollo de metanógenos (Calero *et al.*, 2018). El tiempo de retención también influye en el desarrollo y selección de cierta comunidad microbiana, ya que, en tiempos de retención cortos, microorganismos de crecimiento lento son lavados del reactor (Zhou *et al.*, 2018).

2.5.1.6 Carga orgánica

La producción de ácidos orgánicos aumenta con cargas orgánicas altas gracias a la alta disponibilidad de sustrato, aunque, altas cargas alteran las características físicas de la mezcla que se alimenta al reactor lo que causa una operación inestable (Owamaha & Izinyon 2016). Respecto al perfil de ácidos orgánicos producidos, investigaciones señalan que cargas orgánicas bajas, favorecen el dominio de propiónico y butírico, en contra parte, acetato y valerato son producidos en mayor porcentaje en cargas orgánicas altas, para la co-fermentación de residuos de maíz y estiércol (Patinvoh *et al.*, 2017).

2.5.1.7 Presión de espacio de cabeza en reactor

El hidrógeno (H_2) es también producto de la fermentación acetobutílica en la fase acidogénica. La presión ocasionada por la acumulación de H_2 en el espacio de cabeza de los reactores influye en el metabolismo de los microorganismos presentes en el proceso por lo que está relacionada a la selectividad de ciertos metabolitos, como lactato, etanol y propionato, aunados a una menor producción de H_2 (Valdez-Vazquez *et al.*, 2006).

2.5.2 Factores de operación involucrados la solventogénesis

Diversos factores están involucrados en la transición de acidogénesis a solventogénesis de la fermentación acetobutílica, se mencionan a continuación y los efectos reportados.

2.5.2.1 Características y concentración de sustrato

Como se mencionó previamente la concentración de sustrato es un factor a considerar también para la etapa de solventogénesis, desde características físicas como viscosidad y la relación de concentración de azúcares del hidrolizado. Altas concentraciones de glucosa y xilosa pueden causar inhibición prolongando la fase lag y por ende menor producción (Shinto *et al.*, 2008).

En relación al sustrato, como se mencionó previamente, una relación carbono nitrógeno baja ($C/N=7$), favorece la producción de ácidos orgánicos, por lo que para la etapa de solventogénesis la relación C/N debe aumentarse a valores entre $C/N=12-14$ para producciones óptimas de butanol.

2.5.2.2 Inhibición por producto

También relacionado, la concentración máxima de sustrato reportado es alrededor de 50-60 g/L, esto por el hecho de que una producción mayor a 10 g/L de butanol inhibe el proceso. Actualmente se desarrollan técnicas de extracción de productos que permitan procesos semi-continuos y continuos estables (Bankar *et al.*, 2014).

2.5.2.3 pH y temperatura

El pH juega un rol importante en la operación que permita el desarrollo adecuado de especies clostridiales, diversos estudios mencionan que la producción de solventes inicia solo cuando los valores de pH disminuyen en un rango de 4.5 y 5.0 (Wu *et al.*, 2017).

Respecto a la temperatura, por cuestión de costos la mayoría de los estudios son realizados en condiciones mesofílicas (37 °C) (Wang *et al.*, 2015), aunque estudios muestran una mejor capacidad hidrolítica de microorganismos termofílicos para sustratos lignocelulósicos (Fu *et al.*, 2014).

2.5.2.4 Presión de espacio de cabeza en reactor

La presión parcial de CO₂ y H₂ en el espacio de cabeza del reactor y la adición de portadores de electrones, tiene efecto en el flujo de electrones. CO₂ y H₂ son inhibidores de la hidrogenasa que produce electrones en exceso, las presiones más altas de CO₂ y H₂ en el espacio de cabeza aumentan el rendimiento de butanol y disminuyen los rendimientos de acetona o ácidos orgánicos con *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824T, como inóculo (Sarkar *et al.*, 2017).

2.5.2.5 Presencia de inhibidores en hidrolizados lignocelulósicos

La hidrólisis química de residuos lignocelulósicos produce compuestos inhibidores del crecimiento bacteriano. Estos compuestos son derivados de la descomposición de la celulosa, hemicelulosa y lignina. Entre los más estudiados están el furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), sus principales efectos son: reducción de la tasa específica de crecimiento, daños en la membrana plasmática celular, inhibición de enzimas y por ende disminución de la producción de metabolitos (Maiti *et al.*, 2016). Sin embargo, estudios muestran que mezclas de HMF y furfural en bajas concentraciones pueden estimular ciertas especies de *Clostridium*, favoreciendo la producción de butanol y H₂. (Ezeji *et al.*, 2007; Qureshi *et al.*, 2012; Muñoz-Paéz *et al.*, 2019).

3. METODOLOGÍA

Se planteó un esquema de producción basado en dos bioprocesos: fermentación ácido-mixta (plataforma de carboxilato) (fase 1) y fermentación acetobutílica (fase 2). Para la fase 1, se establecieron reactores semi-continuos para la fermentación ácido-mixta alimentados con paja de trigo para la producción de ácidos acético y butírico. Las variables evaluadas en la fase 1 fueron el efecto del tiempo de retención de sólidos y la carga orgánica sobre la producción y selectividad de ácidos orgánicos. Para la segunda fase, se establecieron reactores en lote para la producción de acetona, butanol y etanol a partir de hidrolizados de paja de trigo para evaluar el efecto de la adición de los efluentes acidogénicos producidos en la fase 1.

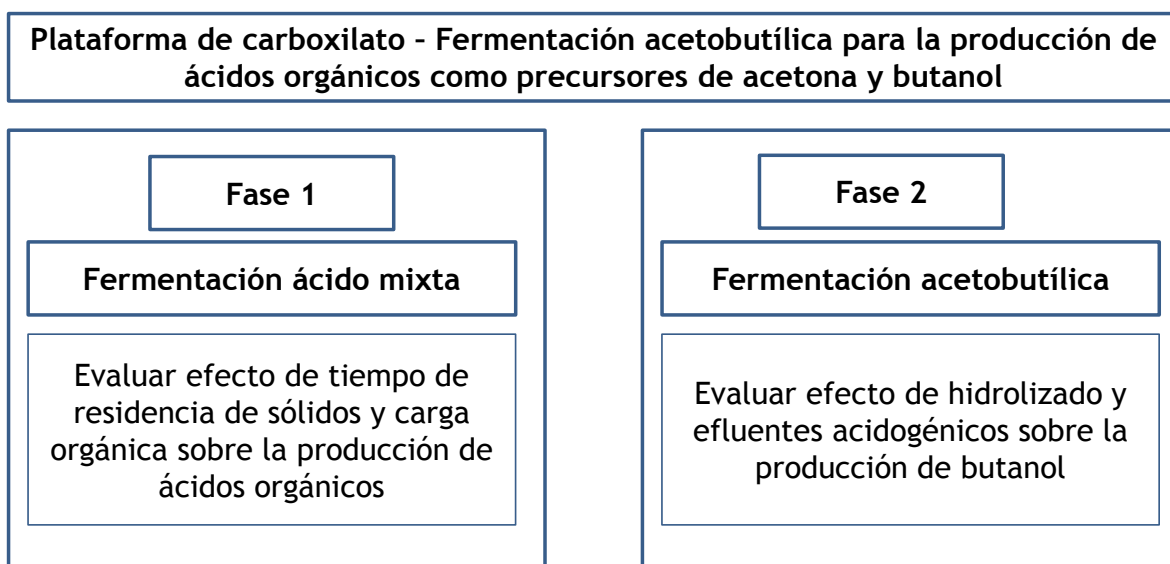


Figura 2. Diagrama de la metodología desarrollada para la producción de ácidos orgánicos como precursores de acetona y butanol.

3.1 FASE 1. FERMENTACIÓN ACIDO-MIXTA

3.1.1 Sustrato

El sustrato consistió de paja de trigo (*Triticum aestivum* L.) variedad Bárcenas S2002, colectada en 2017 del periodo otoño invierno, en Guanajuato, México (N 20° 23', W 101° 25', 1720 m.s.n.m). La paja de trigo fue molida en una licuadora industrial (International, Medway, EUA) posteriormente, la paja de trigo molida fue cribada en un tamiz de malla 2.0 mm (Endecotts, London, UK) y las partículas retenidas fueron almacenadas en bolsas plásticas a temperatura ambiente (temperatura promedio de 25 °C y humedad relativa de 23%).

La composición de la paja de trigo por kilogramo de masa seca se determinó utilizando un equipo analizador de fibras (Ankom A2000, New York, EUA) de acuerdo a métodos previamente publicados (APHA 2005; van Soest *et al.*, 1963; Sluiter *et al.*, 2012): sólidos totales 972 g, sólidos volátiles 843 g, celulosa 380 g, hemicelulosa 240 g, lignina 31 g, extractivos 34 g, y cenizas 128 g.

3.1.2 Inóculo

La comunidad microbiana nativa (CMN) presente en la superficie paja de trigo fue utilizada como inóculo. Esta CMN posee microorganismos con capacidad hidrolítica y fermentativa (Pérez-Rangel *et al.*, 2015; Valdez-Vazquez *et al.*, 2017). La paja de trigo fue utilizada sin esterilización, recibiendo como único pretratamiento su hidratación en agua destilada durante 24 h a 25 °C para aumento de la biodegradabilidad (Lara-Vazquez *et al.*, 2014; Lara-Vazquez *et al.*, 2014).

3.1.3 Medio de cultivo

Para esta fase se utilizó un medio mineral con la siguiente composición (en g/L): 0.1 KH_2PO_4 , 0.1 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 CaCl_2 0.01 $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 NaCl , 2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El medio mineral fue utilizado sin esterilizar y ajustado a pH de 6.5.

3.1.3 Procedimiento y condiciones de operación

Botellas de vidrio de 1.0 L (Bellco Glass, Vineland, EUA) fueron utilizadas como bioreactor, con una masa de trabajo de 0.3 kg. La operación se realizó en condiciones mesofílicas (37 °C), el pH fue ajustado en cada alimentación a 6.5.

Los bioreactores fueron operados en modo semi-continuo, por lo que, a intervalos de tiempo específicos (definido por el tiempo de retención de sólidos), se purgó una masa conocida y se cargó la alimentación fresca (definida con la ec. 1) (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005). Después de cada alimentación, los reactores fueron sellados herméticamente con aire en la fase gaseosa. En la figura 3 se muestra un esquema del proceso de operación.

$$Q_{sustrato} = \frac{M_{reactor}}{TRS} \quad \text{ec. (1)}$$

Donde,

$Q_{sustrato}$	flujo de alimentación, kg/d
$M_{reactor}$	masa del reactor, kg
TRS	tiempo de retención de sólidos, d

La carga orgánica puede ser modificada mediante el flujo de la alimentación, o bien, mediante la cantidad de sólidos totales presentes en la alimentación. Para este trabajo, la carga orgánica fue ajustada mediante el contenido de sólidos totales en la alimentación (ec. 2).

$$CO = \frac{C_{sustrato} \cdot Q_{sustrato}}{M_{reactor}} \quad \text{eq. (2)}$$

Donde,

- CO carga orgánica, gST/L_{reactor}-d,
 $C_{sustrato}$ concentración de sólidos totales, gST/kg
 $Q_{sustrato}$ flujo de alimentación, kg/d
 $M_{reactor}$ masa del reactor, kg

En la figura 3 se muestra un diagrama del proceso de operación de los bioreactores semicontinuos.

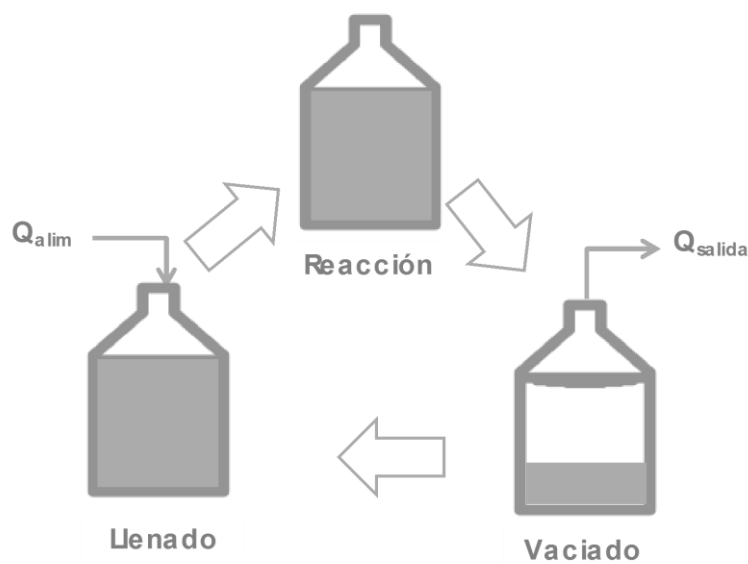


Figura 3. Operación de reactores en modo semi-continuo para la fermentación ácido-mixta.

Se utilizó un diseño factorial general dos factores a diferentes niveles para estudiar el efecto del tiempo de retención de sólidos (2.5 d, 5 d, y 7.5 d) y la carga orgánica (10, 40, 60 y 80 g ST/L_{reactor-d}) sobre la producción de ácido acético y ácido butírico. Las corridas realizadas se muestran en la Tabla 1. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y de forma independiente. El tiempo total de operación de los reactores fue al menos cinco veces el tiempo de retención de sólidos establecido (Hassam *et al.*, 2015).

Tabla 1. Condiciones de operación para la fermentación ácido-mixta.

Corrida	Carga orgánica (g ST/kg-d)	Tiempo de retención de sólidos (d)	Frecuencia de alimentación
I, II, III	10	7.5	Cada 96 h
		5.0	Cada 48 h
		2.5	Cada 24 h
IV,V	40	5.0	Cada 48 h
		2.5	Cada 24 h
VI, VII	60	5.0	Cada 48 h
		2.5	Cada 24 h
VIII, IX, X	80	7.5	Cada 72 h
		5.0	Cada 48 h
		2.5	Cada 24 h

La selectividad para cada metabolito, es definida por la concentración de metabolito (DQO_{eq}/L) dividida entre el total de ácidos orgánicos producidos (DQO_{eq}/L) (Weissermel & Arpe), (ec. 3).

$$\text{Selectividad} = \frac{C_{\text{metabolito}}}{C_{\text{AGV totales}}} \times 100 \quad \text{eq. (3)}$$

Selectividad %

$C_{\text{metabolito}}$ concentración de metabolito, gDQO_{eq} /L

$C_{\text{AGVtotales}}$ concentración total de AGV, gDQO_{eq}/L

3.2 FASE 2: FERMENTACIÓN ACETOBUTÍLICA

3.2.1 Hidrolizado de paja de trigo

La fuente de carbono fue provista por un hidrolizado de paja de trigo proveniente de un reactor tubular de pretratamiento térmico. Este reactor operó a 185 °C, 10 bar, durante 30 min (Molina-Guerrero *et al.*, 2018). El hidrolizado fue centrifugado ($5,000 \times g$, 10 min) y filtrado (filtro de fibra de vidrio Whatman ® GF/A). Se tomó 1 L de hidrolizado, y fue almacenado en un recipiente de plástico a - 4.0 °C hasta su uso. La composición química del hidrolizado fue determinada por métodos previamente reportados (Dubois *et al.*, 1956; Miller, 1959; Muñoz-Paéz *et al.*, 2019): 38.5 g/L de carbohidratos totales, 10 g/L de glucosa, 8 g/L de xilosa, 3.3 g/L de ácido acético, 0.03 g/L de ácido butírico, 130 mg/L de 5-hidroximetilfurfural, y 300 mg/L de furfural.

3.2.2 Efluentes acidogénicos

Se planteó utilizar los efluentes acidogénicos de la fase 1, por su contenido de ácidos grasos volátiles (ácido butírico), como precursores de acetona y butanol. Estos efluentes acidogénicos, fueron centrifugados ($1,166 \times g$, 10 min) y filtrados (filtro de fibra de vidrio Whatman ® GF/A). Después, se almacenaron 600 mL de los efluentes en un recipiente de plástico a - 4.0 °C hasta su uso. La composición química del efluente acidogénico fue determinada por métodos previamente reportados (Dubois *et al.*, 1956; APHA, 2005; Muñoz-Paéz *et al.*, 2019): 5.20 g/L de carbohidratos totales, 1 g/L de glucosa, 1 g/L de xilosa, 5.3 g/L de ácido acético, 1.8 g/L de ácido butírico, 1.7 g/L de ácido propiónico, 36.6 mg/L de 5-hidroximetilfurfural, y 52.9 mg/L de furfural.

3.2.3 Cepa de trabajo

Se utilizó *Clostridium saccharobutylicum* Keis *et al.* 2001 (NCIMB 13764 = DSM 13864 = ATCC BAA-117) para llevar a cabo la fermentación acetobutílica. La cepa fue incubada en condiciones anaerobias botellas serológicas de 120 mL (Corning, New York, EUA) con un volumen de trabajo de 80 mL de medio anaerobio enriquecido para *Clostridium* con la siguiente composición (en g/L): peptona 10, extracto de carne 10, glucosa 10, almidón 1, NaCl 5, C₂H₃NaO₂ 3, cisteína 0.5, resazurina 0.01 (modificado de Rajagopalan *et al.*, 2014). Las botellas fueron incubadas en una atmósfera de N₂ para asegurar condiciones anaerobias, el pH inicial fue de 6.5, con una temperatura de incubación de 37 °C, durante 3 días sin agitación y una densidad celular a 600 nm de 0.9. Al final de la incubación, la concentración de glucosa fue de 0 g/L.

3.2.4 Medio de cultivo

Para esta fase se utilizó un medio de cultivo con la siguiente composición (en g/L): 1.0 Ca₂CO₃, 2.1 NaH₂PO₄, 1.0 triptona, 0.2 NiSO₄, 0.1 CaCl₂, 0.3 KH₂PO₄·7H₂O, 1.0 NaCl, 0.2 FeCl₃·4H₂O, 0.1 MnCl₂·4H₂O, 0.17 CaCl₂·6H₂O, 0.1 ZnCl₂, 0.02 CuCl₂, 0.01 H₃BO₃, 0.01 NaMoO₄, 0.02 Na₂SCO₂, cisteína 0.5, resazurina 0.01. El medio fue calentado a 100 °C y agitado 700 r.p.m. durante 1 h y gaseado con N₂ para asegurar condiciones anaerobias.

3.2.5 Procedimiento y condiciones de operación

Los ensayos de las posteriores secciones 3.2.6 y 3.2.7, fueron realizados en botellas serológicas de vidrio (Corning, New York, EUA), con un volumen total de 120 mL y un volumen de trabajo de 80 mL. Las botellas fueron incubadas a 37 °C, con un pH inicial de 7.5 durante un tiempo de incubación 3 días.

3.2.6 Efecto del hidrolizado sobre la producción de butanol.

En un primer ensayo se evaluó si el hidrolizado tenía un efecto de inhibición sobre la producción de butanol con la cepa *Clostridium saccharobutylicum*. El volumen de inóculo y medio se mantuvo constante para todas las condiciones siendo de 16 mL y 8 mL, respectivamente. Se varió el porcentaje de hidrolizado, 25%, 50%, 75% y 100%, con la intención de mantener constante para todos los tratamientos la concentración de azúcares reductores disponibles, se mantuvo una concentración de 18 g/L con una solución de glucosa-xilosa (grado reactivo, pureza de >99.5), con una relación en masa (1.0:0.8). Por lo tanto, en los tratamientos solo varió la concentración de 5-HMF y furfural como posibles inhibidores y de carbohidratos totales (tabla 2). Cada corrida fue realizada por duplicado, como controles se utilizaron tres corridas con 18 g/L de azúcares reductores (mezcla de glucosa y xilosa, glucosa, y xilosa) sin presencia de HMF y furfural.

Tabla 2. Diseño monofactorial con 5 niveles para evaluar el efecto del hidrolizado de paja de trigo sobre la fermentación acetobutílica.

Corrida	Hidrolizado (%)	Carbohidratos totales (g/L)	Azúcares reductores (g/L)	5-HMF (mg/L)	Furfural (mg/L)
I	100	38.50	18.00	113.65	37.64
II	75	33.38	18.00	69.70	24.18
III	50	30.50	18.00	17.20	16.99
IV	25	25.94	18.00	0.00	12.27
V	0	18.00	18.00	0.00	0.00
VI			18.00 ⁺	0.00	0.00
VII			18.00*	0.00	0.00

Notas: +, glucosa; *, xilosa.

3.2.6 Efecto de los efluentes acidogénicos sobre la fermentación acetobutílica

Posteriormente, se evaluó el efecto de la adición de ácido butírico sobre la producción de butanol, para este caso se mantuvo una relación volumétrica de hidrolizado-efluentes acidogénicos de 75%-25%. La concentración de ácido acético se mantuvo constante para todas las corridas en un valor de 3.0 g/L (aporte del hidrolizado y efluente acidogénico). Debido a la baja concentración de ácido butírico presente en los efluentes acidogénicos utilizados, los tratamientos se enriquecieron con ácido butírico en concentraciones de 0.36, 3.36, 4.36 y 5.36 g/L.

El volumen de inóculo y medio se mantuvo constante para todas las condiciones siendo de 16 mL y 8 mL respectivamente. En la tabla 3, se muestra el diseño de un solo factor para evaluar el efecto del ácido butírico sobre la fermentación acetobutílica. Cada corrida fue realizada por duplicado, como controles se utilizaron corridas con 100% hidrolizado y 100% efluentes acidogénicos.

Tabla 3. Diseño monofactorial con 4 niveles para evaluar el efecto ácido butírico sobre la producción de butanol

Corrida	Hidrolizado (%)	Efluente acidogénico (%)	Ác. acético (g/L)	Ác. butírico (g/L)
I	75	25	3.0	0.36
II	75	25	3.0	3.36
III	75	25	3.0	4.36
IV	75	25	3.0	5.36
Control	100	0	2.6	0

Control	0	100	4.2	1.44
---------	---	-----	-----	------

3.3 METÓDOS ANALÍTICOS

3.3.1 Determinación de acetona, butanol, etanol y ácidos orgánicos.

Durante la operación de los reactores se tomaron muestras para determinar la concentración de acetona, butanol, etanol y ácidos orgánicos (acético, propiónico, butírico, valérico, iso-butírico, isovalérico), los cuales se analizaron por cromatografía de gases de acuerdo a la anteriormente descrito en Cardeña *et al.*, (2017).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 FASE 1. FERMENTACIÓN ÁCIDO-MIXTA

En la fase 1, se operaron reactores de fermentación ácido-mixta para estudiar el efecto del tiempo de retención de sólidos (2.5, 5.0 y 7.5 d) y carga orgánica (10, 40, 60 y 80 g ST/kg-d) sobre la producción de ácidos grasos volátiles, así como la selectividad de ácido acético y butírico. La Figura 4 es un ejemplo del desempeño medido como concentración total de ácidos grasos volátiles y selectividad para los reactores operados a un tiempo retención de sólidos de 5 días y las cuatro cargas orgánicas estudiadas. Para la menor carga orgánica, la producción total de ácidos grasos volátiles fue estable a partir del día 7 de operación con un coeficiente de variación (CV) del 11%. Para las demás cargas orgánicas, la producción total de ácidos grasos volátiles se estabilizó hasta el día 21 de operación con CV entre 6-12%. Respecto a la selectividad, la menor carga orgánica presentó una selectividad más estable en comparación con las demás cargas orgánicas (CV de 5% vs. CV de 6-14%).

La experimentación se inició con la operación de los reactores con tiempos de retención de sólidos de 2.5, 5.0 y 7.5 días y cargas orgánicas de 10 y 80 g ST/kg-d. Se observó que la producción total de ácidos grasos volátiles presentó diferencia solo entre las diferentes cargas orgánicas, pero no respecto al tiempo de retención de sólidos (Figura 5). Por tanto, un mayor tiempo de retención de sólidos resultó en la menor productividad (Figura 6). Debido a esto, se decidió continuar con la experimentación solo con los dos menores tiempos de retención de sólidos de 2.5 y 5.0 días. El desempeño de los reactores operados con el resto de condiciones se muestra en el anexo 1 (Figuras A1 y A2).

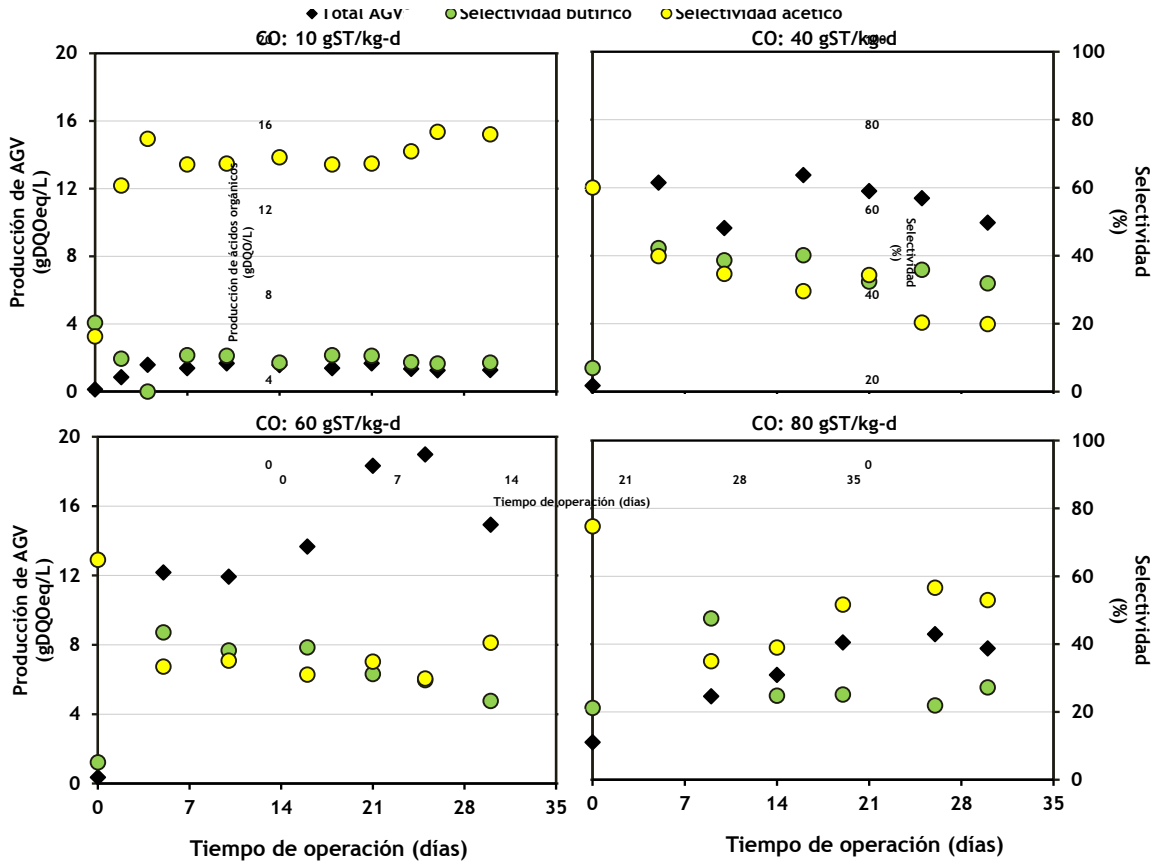


Figura 4. Desempeño de los reactores de fermentación ácido-mixta operados a un tiempo de retención de sólidos de 5.0 días y cuatro cargas orgánicas.

Una vez observado el estado estacionario donde la producción de los ácidos grasos volátiles no cambia ($CV < 15\%$), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de la carga orgánica y tiempo de retención de sólidos sobre la producción total y productividad de ácidos grasos volátiles, así como la selectividad. Los resultados observados durante el periodo en estado estacionario se presentan como diagramas de cajas y bigotes. De esta forma, la Figura 5 muestra la producción total de ácidos grasos volátiles en función de la carga orgánica para cada tiempo de retención de sólidos. Los metabolitos producidos fueron ácido acético, butírico, propiónico, caproico, valérico y etanol, ácido láctico no fue obtenido.

Mediante ANOVA, se determinó que solo la carga orgánica tuvo un efecto significativo sobre la producción total de ácidos grasos volátiles ($p < 0.05$). En contraste, la producción total de ácidos no presentó diferencia significativa a los tiempos de retención de sólidos estudiados ($p > 0.05$).

Al evaluar el comportamiento de la producción de ácidos en función de la carga orgánica, se observó que ésta aumentó en proporción al aumento de la carga orgánica hasta lograr su máximo valor de 18 ± 3 g_{DQOeq}/L a las cargas orgánicas entre 40 y 60 g ST/kg-d. Mientras que, la producción de ácidos grasos volátiles disminuyó a la mayor carga orgánica de 80 g ST/kg-d, por lo que se puede inferir un posible efecto de inhibición por sustrato/producto.

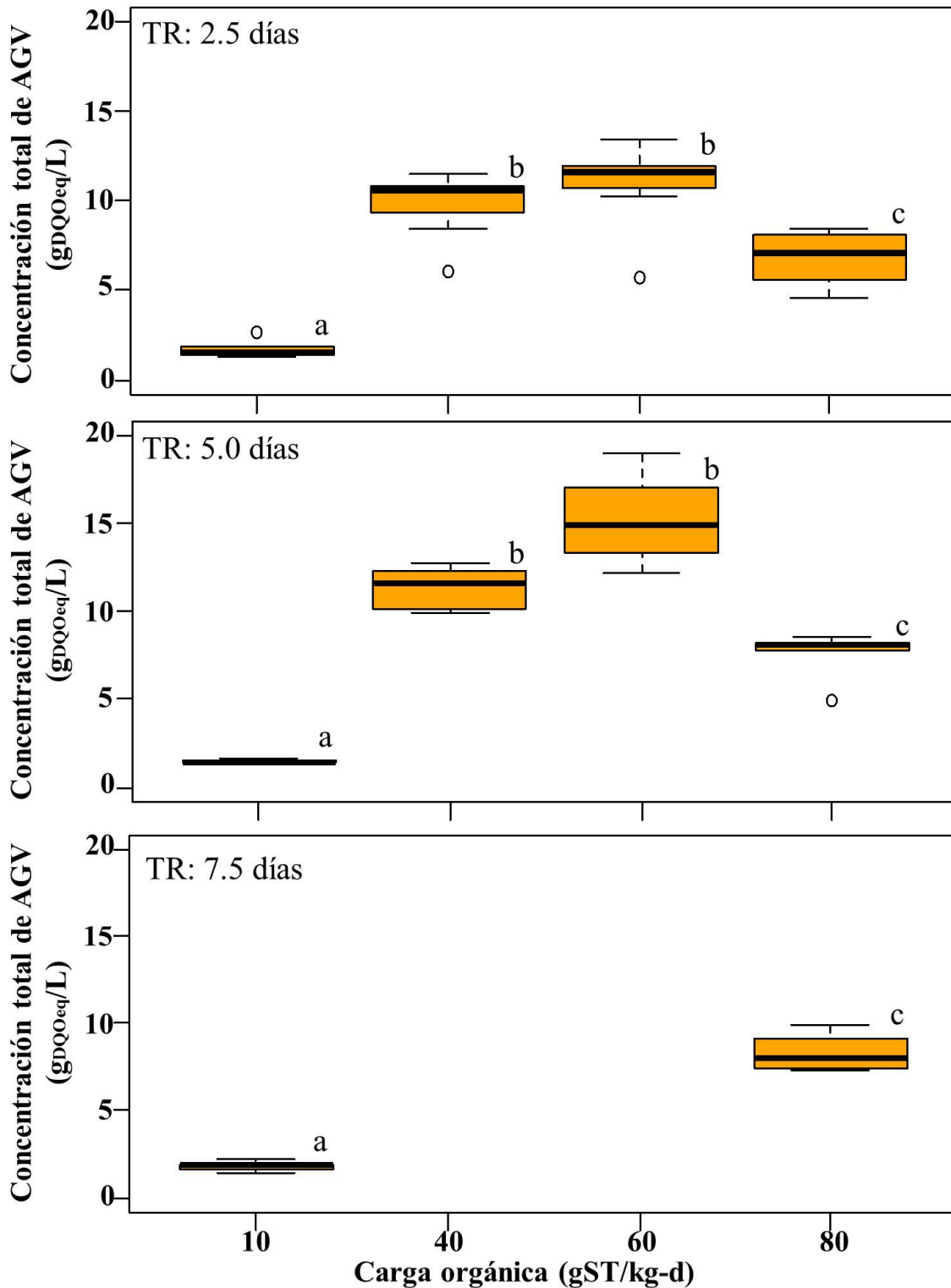


Figura 5. Producción total de ácidos grasos volátiles en función de la carga orgánica, a tiempos de retención de sólidos de 2.5, 5.0 y 7.5 días. Letras diferentes significan diferencia entre tratamientos ($p < 0.05$).

La Figura 6 muestra la productividad en función de la carga orgánica para cada tiempo de retención de sólidos. Mediante ANOVA, se determinó que carga orgánica y el tiempo de retención de sólidos tuvieron efecto significativo sobre la productividad de ácidos grasos volátiles ($p < 0.05$). Ésta variable de respuesta tuvo el mismo el comportamiento en función de la carga orgánica que aquel observado para la producción, donde los valores máximos de productividad fueron a las cargas orgánicas de 40 y 60 g ST/kg-d, y el mismo efecto de inhibición a la mayor carga orgánica.

Respecto al tiempo de retención de sólidos, el obtener concentraciones de ácidos grasos volátiles similares a los tres tiempos de retención de sólidos, resultó en que la mayor productividad de $4.5 \pm 0.7 \text{ g}_{\text{DQOeq}}/\text{L-d}$ fuera al menor tiempo de retención de sólidos de 2.5 d. Esta productividad fue 1.3 y 5 veces mayor comparada a la productividad alcanzada a los tiempos de retención de sólidos de 5.0 y 7.5 d, respectivamente.

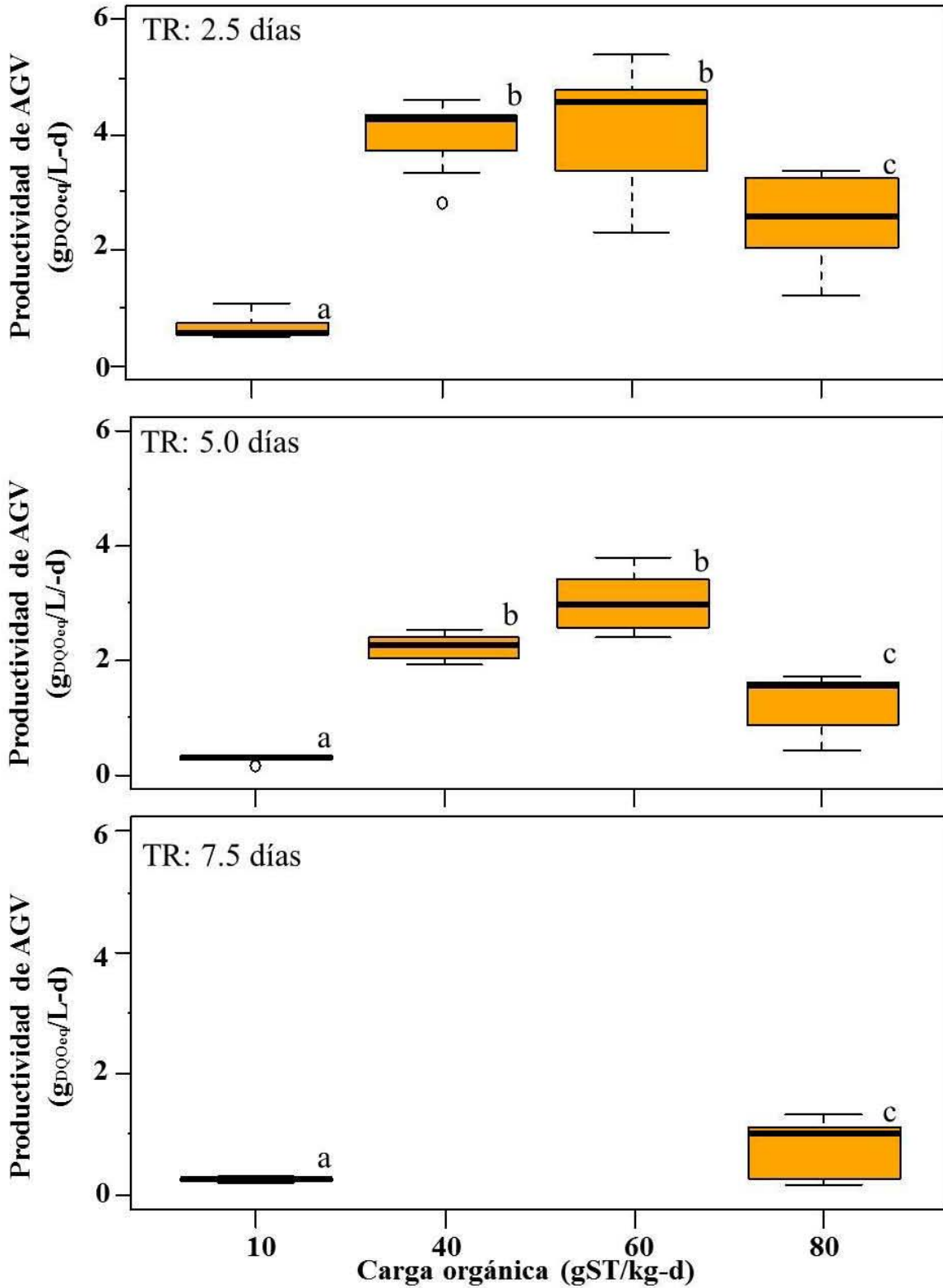


Figura 6. Productividad de ácidos grasos volátiles en función de la carga orgánica, a tiempos de retención de sólidos de 2.5, 5.0 y 7.5 d. Letras diferentes significan diferencia entre tratamientos ($p < 0.05$).

La Figura 7 muestra la selectividad de ácido acético y ácido butírico en función de la carga orgánica para cada tiempo de retención de sólidos. Mediante ANOVA, se determinó que solo la carga orgánica presentó un efecto significativo sobre la selectividad de ambos metabolitos ($p < 0.05$), por otra parte, la selectividad no se vio afectada por los tiempos de retención de sólidos estudiados ($p > 0.05$).

La mayor selectividad de ácido acético del $66 \pm 2\%$ se logró a la menor carga orgánica de 10 g ST/kg-d. A las cargas de 40 y 60 g ST/kg-d, la selectividad de ácido acético y ácido butírico fueron similares entre sí, $36 \pm 1\%$ y $34 \pm 3\%$, respectivamente. A la mayor carga orgánica de 80 g ST/kg-d se logró la mayor selectividad de ácido butírico con valores máximos de $54 \pm 3\%$. Desafortunadamente, a las cargas orgánicas en las que se obtuvo la mayor producción de ácidos grasos volátiles (de 40 y 60 g ST/kg-d), no se logró la mayor selectividad para ácido butírico, que es el metabolito de interés como precursor de butanol durante la fermentación solventogénica.

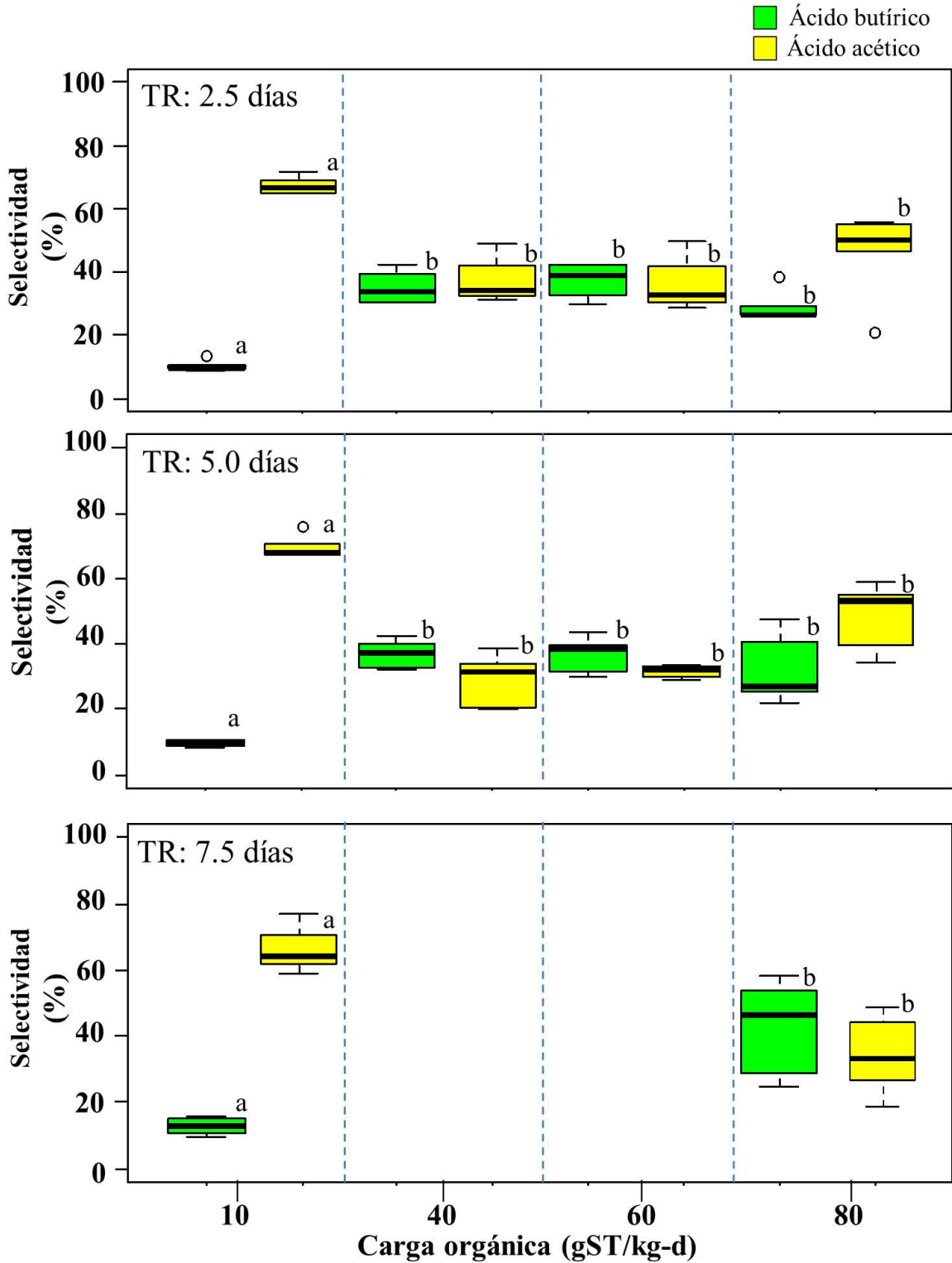


Figura 7. Selectividad de ácido acético y ácido butírico función de la carga orgánica a tiempos de retención de sólidos de 2.5, 5.0 y 7.5 d. Letras diferentes significan diferencia entre tratamientos ($p < 0.05$).

4.1.1 Efecto de la carga orgánica sobre la fermentación ácido-mixta

La carga orgánica es un parámetro de operación que afecta la producción de ácidos orgánicos volátiles así como la selectividad. La gran mayoría de autores que han estudiado el efecto de este parámetro utilizando sustratos insolubles como residuos alimenticios, excretas y sustratos lignocelulósicos, se han enfocado en la digestión anaerobia. Las cargas orgánicas evaluadas en sistemas de digestión anaerobia típicamente oscilan entre 4 a 13 g SV/L-d (Pohl *et al.*, 2013; Agyeman y Tao, 2014; Aboudi *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015a,b; Owamaha y Izinyon, 2015; Xiao *et al.* 2017), y solo algunos autores han explorado mayores carga orgánicas de hasta 34 g_{DQO}/L-d (Qiao *et al.*, 2013). Las cargas orgánicas identificadas como óptimas en la digestión anaerobia de sustratos insolubles oscilan entre 2-8 g SV/L-d, por lo que, bajo estas condiciones no existe acumulación de ácidos orgánicos observando concentraciones < 1 g/L (Pohl *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2017). Cuando la carga orgánica aumenta por arriba de 12 g SV/L-d, las concentraciones de ácidos orgánicos oscilan entre de 4-12 g_{DQOeq}/L (Qiao *et al.*, 2013; Aboudi, *et al.*, 2015; Li, *et al.*, 2015a,b). La acumulación de ácidos orgánicos inhibe la actividad metanogénica resultado en la inestabilidad de la digestión anaerobia (Agyeman y Tao, 2014).

Con estos trabajos como antecedente se puede inferir que, para lograr mayores concentraciones de ácidos orgánicos mediante fermentación ácido-mixta, es necesario explorar cargas orgánicas > 12 g/L-d. Los sustratos insolubles más estudiados para producción de ácidos orgánicos son residuos alimenticios y lodos anaerobios (Strazzeri *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2019; Fang *et al.*, 2020), mientras que el uso de sustratos lignocelulósicos ha estado limitado a la utilización de sus hidrolizados (Kandylyis *et al.* 2016). Las máximas concentraciones de ácidos orgánicos han sido de 21 g_{DQOeq}/L a una

carga orgánica de 125 g/L-d a partir de residuos alimenticios (Lee *et al.*, 2014), 8 g_{DQOeq}/L a una carga orgánica de 11 g_{DQOeq}/L-d partir de lodos de purga (Liu *et al.*, 2019), y 8 g_{DQOeq}/L a una carga orgánica de 53 g_{DQOeq}/L-d para hidrolizados lignocelulósicos (Contreras-Dávila *et al.*, 2016). En este estudio, la máxima concentración de ácidos orgánicos fue de 18 ± 3 g_{DQOeq}/L obtenida a una carga orgánica de 60 g ST/L-d. Esta concentración de ácidos es solo 20% menor a la máxima concentración lograda con sustratos fácilmente biodegradables como residuos alimenticios (21 g_{DQOeq}/L a carga orgánica de 125 g/L-d, Lee *et al.*, 2014).

La productividad de ácidos orgánicos se define como la concentración de ácidos orgánicos obtenidos por día y unidad de volumen de trabajo por lo que está relacionada con la carga orgánica (Naik *et al.*, 2014). Los valores de mayor productividad de ácidos orgánicos depende de la biodegradabilidad del sustrato (Cavinato *et al.*, 2017), observando las mayores productividades de 50 g_{DQOeq}/L-d a cargas orgánicas entre 50-125 g_{DQO}/L-d de residuos alimenticios e hidrolizados lignocelulósicos (Lee *et al.*, 2014; Contreras-Dávila *et al.*, 2016), una productividad media de 9 g_{DQOeq}/L-d a una carga orgánica de 17 g_{DQO}/L-d de lodos de purga (Liu *et al.*, 2019), y una productividad baja de 2 g_{DQOeq}/L-d a una carga orgánica de 30 g_{DQO}/L-d para tallos de maíz (Zhao *et al.*, 2017). En el presente estudio, la máxima productividad fue de 4.5 ± 0.7 g_{DQOeq}/L-d a una carga orgánica de 60 g ST/L-d de paja de trigo, la cual es mayor que la productividad lograda con tallos de maíz y 50% menor a la productividad lograda con lodos de purga.

Respecto a la selectividad de ácidos orgánicos en función de la carga orgánica, estudios previos donde se han fermentado sustratos fácilmente biodegradables como melazas almidón, lodos anaerobios y residuos alimenticios, muestran que el aumento de la

carga orgánica incrementa la selectividad de ácido acético (20-60%), seguida de ácido butírico (15-30%), ácido propiónico (10-20%) y ácido láctico (10-20%) (Traverso *et al.*, 2000; Yu, 2001; Zhang *et al.*, 2008; Wijekoon *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019). Además, el aumento de la carga orgánica permite la acumulación de ácidos orgánicos de cadena media como los ácido valérico y ácido caproico (Lim *et al.*, 2008). Con hidrolizados lignocelulósicos la selectividad para ácido acético y butírico es similar, con valores de 30-50% para ambos metabolitos, seguido de ácido propiónico en un 10-30%. (Arriaga *et al.*, 2011; Contreras-Dávila *et al.*, 2016). En este trabajo, la fermentación de paja de trigo a mayores cargas orgánicas no tuvo un efecto sobre la selectividad de ácido acético ni ácido butírico.

4.1.2 Efecto del tiempo de retención de sólidos sobre la fermentación ácido-mixta

El tiempo de retención de sólidos se define como flujo de alimentación dividido entre el volumen del reactor, por lo que indica el tiempo que una unidad de alimentación permanece dentro del reactor (Henze *et al.* 2008). Los tiempos de retención de sólidos estudiados en la fermentación ácido-mixta de sustratos como residuos alimenticios, lodos anaerobios e hidrolizados lignocelulósicos oscilan en un rango de 2 a 12 d, a diferencia, los sistemas de digestión anaerobia requieren tiempos de retención de sólidos >15 d (Pohl *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Micolucci *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2017). La mayor acumulación de ácidos orgánicos de 13-203 $\text{g}_{\text{DQO}_{\text{eq}}}/\text{L}$ se logra a diferentes tiempos de retención de sólidos dependiendo del sustrato: los residuos alimenticios requieren los mayores tiempos de retención de 8 d (Lim *et al.*, 2018), seguido de los lodos de purga con 2 d (Morgan-Sagatsune *et al.*, 2011), y los hidrolizados requieren el menor tiempo de retención de 0.5 d (Zhao *et al.*, 2017). En este estudio, la máxima concentración de ácidos

orgánicos de $18 \pm 3 \text{ g}_{\text{DQO}_{\text{eq}}}/\text{L}$ se obtuvo a un tiempo de retención de sólidos de 5 d. Este tiempo de retención de sólidos es similar al reportado para residuos alimenticios. Esto puede deberse a que los microorganismos que fermentaron la paja de trigo, solo logran degradar las capas externas del sustrato, que corresponden al almidón, pectinas y parte de la hemicelulosa (Valdez-Vazquez *et al.*, 2017). De esta forma, para lograr un mayor consumo del sustrato, deberá aumentarse el tiempo de retención de sólidos a > 5 d.

Una vez que se ha logrado la máxima concentración de ácidos, la forma de incrementar la productividad es reduciendo el tiempo de retención de sólidos. Por ejemplo, Kim *et al.*, (2012) lograron la mayor productividad de $13 \text{ g}_{\text{DQO}_{\text{eq}}}/\text{L-d}$ con un tiempo de retención de 1 d al fermentar residuos alimenticios (Kim *et al.*, 2012). Este corto tiempo de retención de sólidos fue posible debido a que sustrato recibió un pretratamiento químico logrando incrementar su biodegradabilidad. Sin embargo, las mayores productividades de hasta $13 \text{ g}_{\text{DQO}_{\text{eq}}}/\text{L-d}$ se logran a tiempos de retención de 2 a 12 d en la fermentación de residuos alimenticios y lodos de purga (Min *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2008; Morgan-Sagatsune *et al.*, 2011; Micolucci *et al.*, 2014). En el presente estudio se verificó que en el menor tiempo de retención de sólidos logró la máxima productividad de $4.5 \pm 0.7 \text{ g}_{\text{DQO}_{\text{eq}}}/\text{L-d}$, que fue tres veces menor a la productividad obtenida con residuos alimenticios que son un sustrato más fácilmente digerible ($13 \text{ g}_{\text{DQO}_{\text{eq}}}/\text{L-d}$, Kim *et al.*, 2012).

Respecto a selectividad de ácidos orgánicos, el tiempo de retención de sólidos no modifica el perfil de los metabolitos obtenidos (Arslan *et al.*, 2016; Cavinato *et al.*, 2017). Esto se verificó en este estudio, ya que los diferentes tiempos de retención de sólidos no modificaron la selectividad.

4.2 FASE 2. FERMENTACION ACETOBUTILICA

En la fase 2, se montaron reactores en lote para evaluar los efectos de un hidrolizado de paja de trigo y la adición de efluentes acidogénicos sobre la producción de butanol con *Clostridium saccharobutylicum* BAA-117.

Primero, se evaluó si diferentes porcentajes del hidrolizado de paja de trigo presentaba inhibición de la fermentación acetobutílica, la Figura 8 muestra la producción y rendimiento de butanol al final del tiempo de incubación. La concentración de butanol aumenta en función del aumento de porcentaje de hidrolizado, se obtuvo una mayor producción para todas las condiciones en comparación con los controles. Las concentraciones más altas obtenidas fue en las condiciones de mayor porcentaje de hidrolizado (75% y 100%) y por lo tanto, con mayor concentración de furfural y HMF. En comparación con los controles se puede inferir que estos compuestos estimularon la producción de butanol.

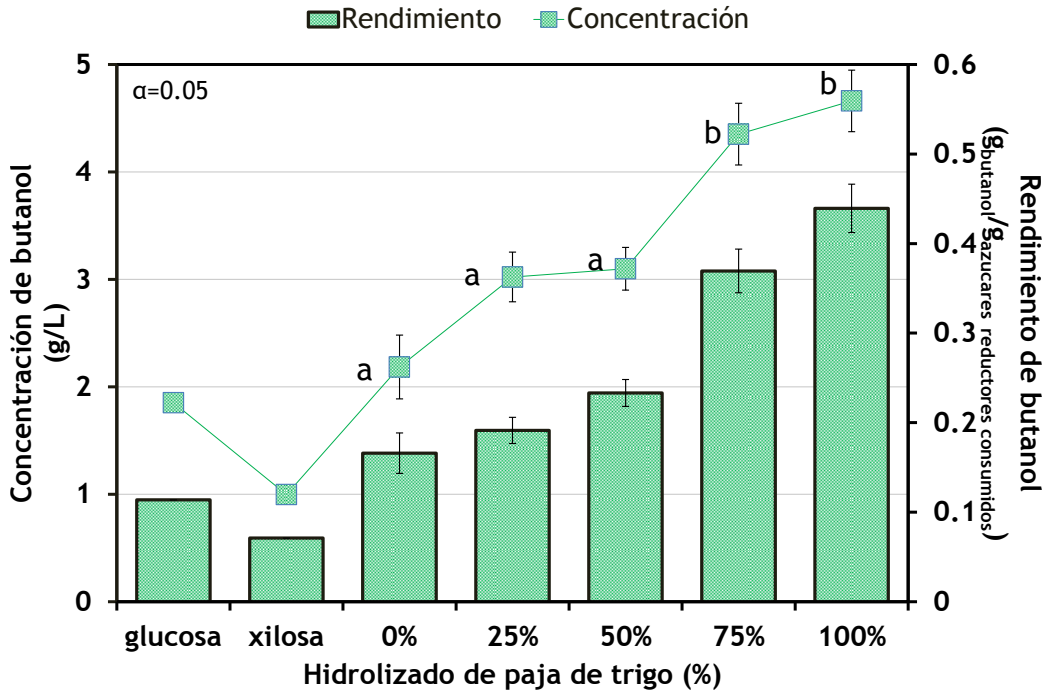


Figura 8. Concentración y rendimiento de butanol en función del porcentaje de hidrolizado de paja de trigo.

La Figura 9 muestra el consumo de azúcares reductores en función de diferentes porcentajes de hidrolizado. Para los controles, se mostró un mayor consumo de glucosa que de xilosa, este comportamiento coincide con lo obtenido por Ezeji et al. (2007) donde se demostró la preferencia por glucosa sobre xilosa, arabinosa y manosa. El consumo de azúcares disminuye para las condiciones con mayor concentración de hidrolizado.

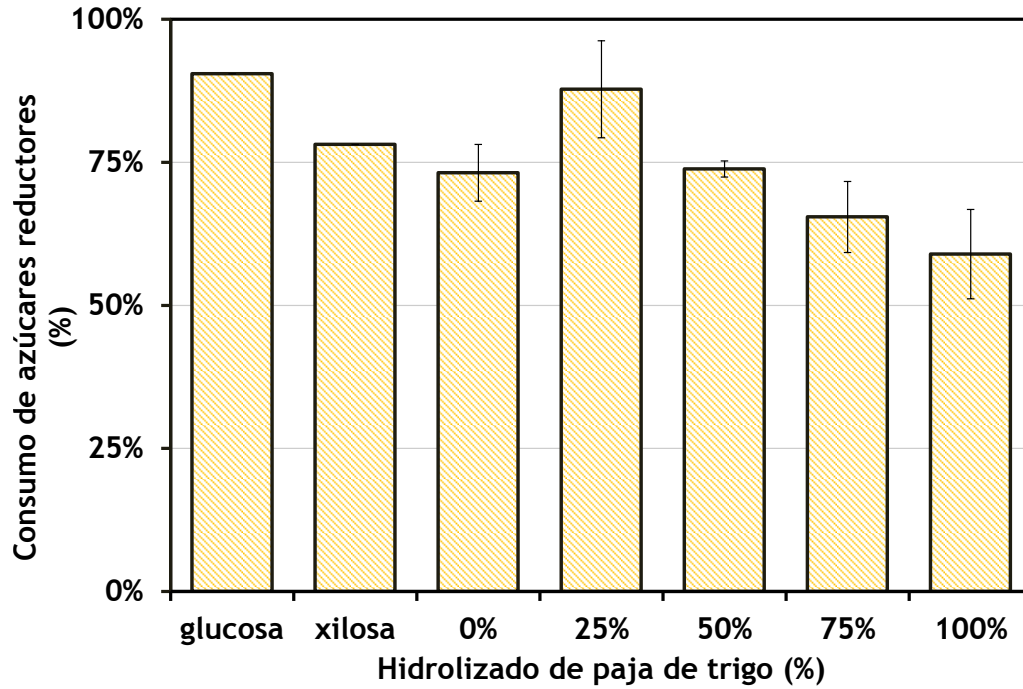


Figura 9. Consumo de azúcares reductores en función del porcentaje de hidrolizado de paja de trigo.

Respecto a la concentración de furfural y HMF, en la Figura 10, se muestra la remoción de estos compuestos. Para la condición de 25% y 50% de hidrolizado se remueven ambos compuestos, en función del aumento de la concentración disminuye la remoción de HMF y furfural.

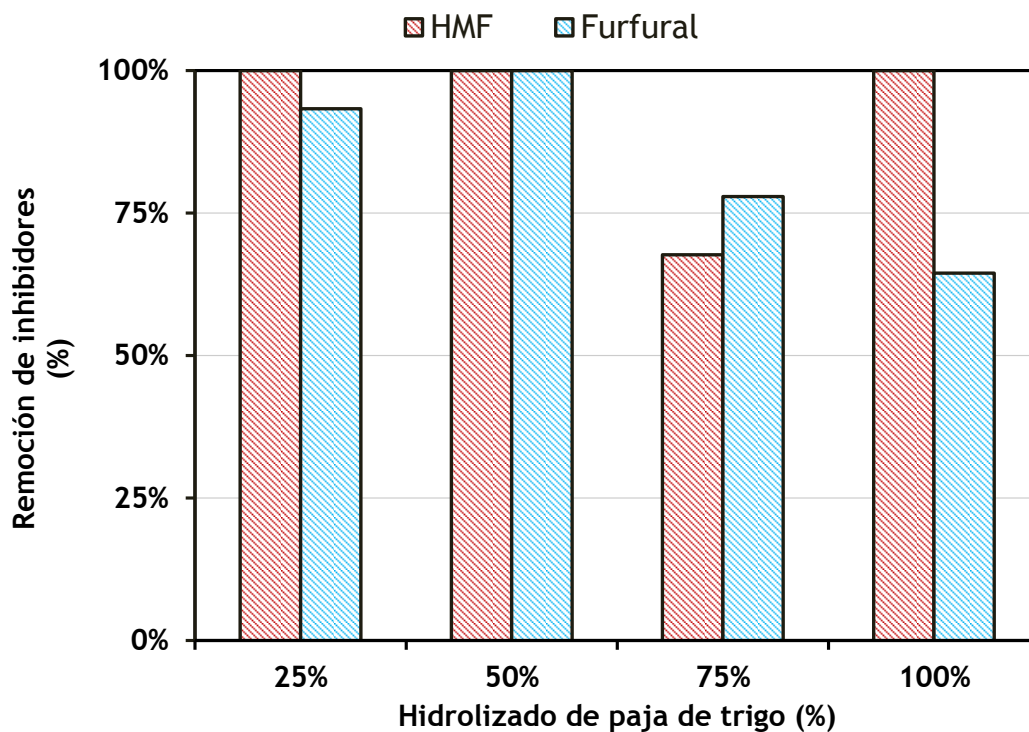


Figura 10. Remoción de furfural y HMF en función de diferentes porcentajes de hidrolizado.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de ácido butírico sobre la fermentación acetobutílica, manteniendo fijas la relación volumétrica de hidrolizado-efluente acidogénico de 75%-25% y la concentración de ácido acético.

En la Figura 11, se muestra la producción y rendimiento de butanol al final del tiempo de incubación, en función de las diferentes concentraciones de ácido butírico. La mayor concentración de butanol de 1.58 ± 0.07 g_{butanol}/L se obtuvo a una concentración de ácido butírico de 4.36 g/L, sin embargo, el mayor rendimiento de 0.12 ± 0.01 g/g se obtuvo en la condición de 3.36 g/L de ácido butírico.

En la Figura 12, se muestra la producción de ácido butírico al final del tiempo de incubación para cada condición de concentración de ácido butírico inicial. Mediante ANOVA, se determinó que la adición de ácido butírico tuvo efecto significativo sobre la producción de butanol ($p < 0.05$). Las condiciones de concentración de ácido butírico inicial de 4.36 y 5.36 muestran una mayor producción de ácido butírico al final, por lo que se puede incidir que estas condiciones presentaron inhibición o el tiempo de incubación no fue suficiente para que la cepa de trabajo metabolizara el ácido butírico a butanol.

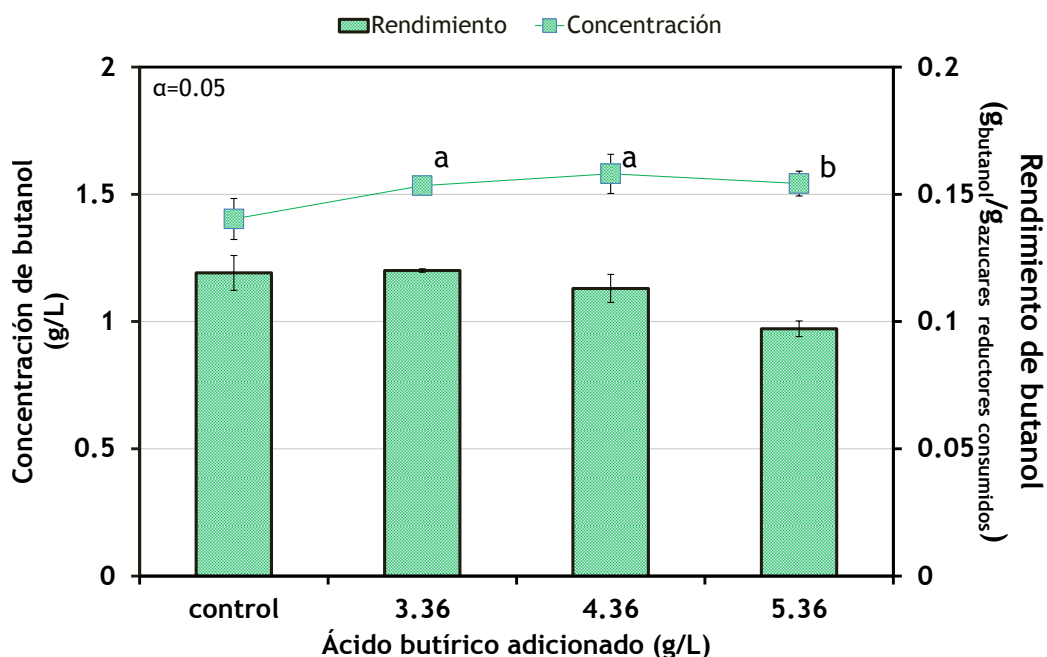


Figura 11. Concentración y rendimiento de butanol en función de diferentes concentraciones de ácido butírico inicial.

La figura 12, muestra la producción de ácido butírico al final del tiempo de incubación para cada condición de concentración de ácido butírico adicionado. Todas las condiciones de ácido butírico adicionado muestran producción de ácido butírico, por lo que se puede incidir que estas condiciones presentaron inhibición o el tiempo de incubación no fue suficiente para que la cepa de trabajo metabolizara el ácido butírico a butanol.

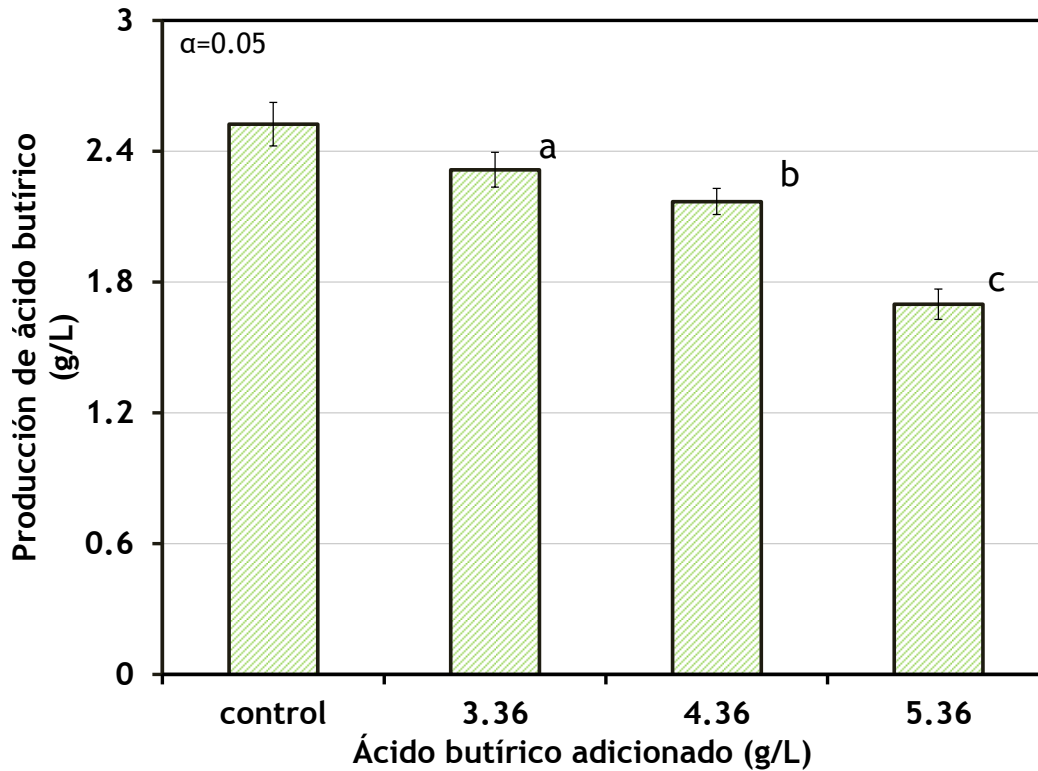


Figura 12. Concentración de ácido butírico al final de la incubación en función de diferentes concentraciones de ácido butírico inicial.

La figura 13, muestra el consumo de azúcares obtenido para cada condición, los valores de consumo de azúcares son bajos, este bajo consumo pudo deberse a que el tiempo de incubación no fue suficiente o la presencia de metabolitos no detectados en los efluentes acidogénicos utilizados. Estudios previos reportan el consumo del 70% de los días de incubación en la fermentación de hidrolizado y efluentes acidogénicos obtenidos de paja de arroz (Li *et al.*, 2018)

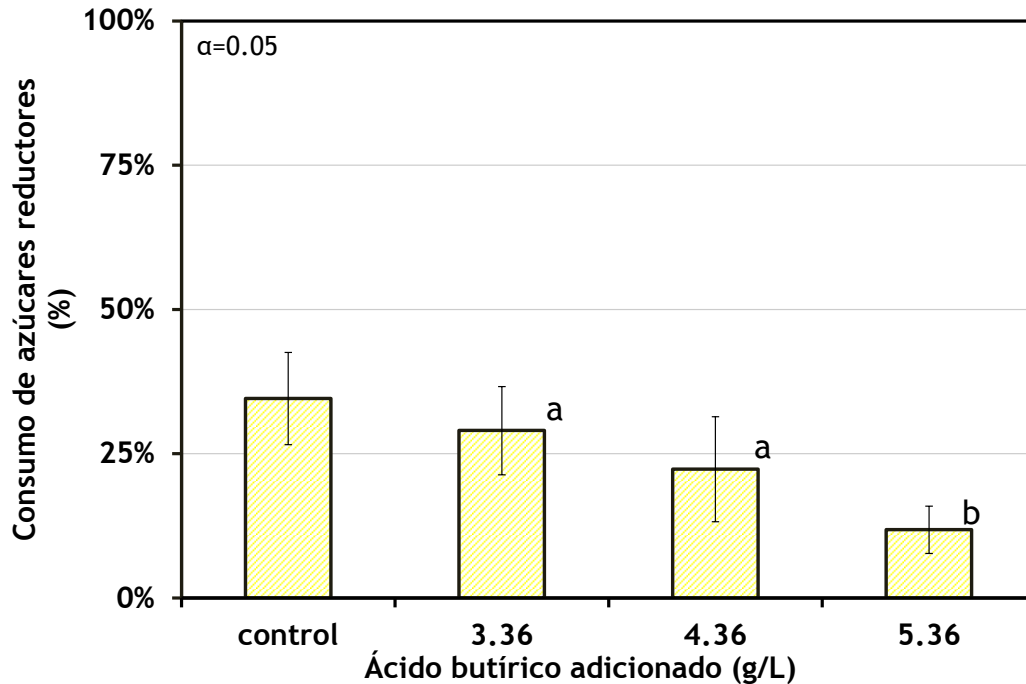


Figura 13. Consumo de azúcares reductores en función de diferentes concentraciones de ácido butírico inicial.

La figura 14, muestra la remoción de furfural y HMF la remoción es mayor para el control y va disminuyendo en función del aumento de la concentración de ácido butírico inicial, por lo que se puede incidir un efecto inhibitorio del ácido butírico. Para todos los casos es mayor la remoción para furfural en comparación con la remoción de HMF, esto coincide con el estudio de. Zhang *et al.*, 2012 donde se logró una remoción total del furfural y HMF a las 12 y 24 h, respectivamente, en fermentaciones con *C. acetobutylicum* ATCC 824.

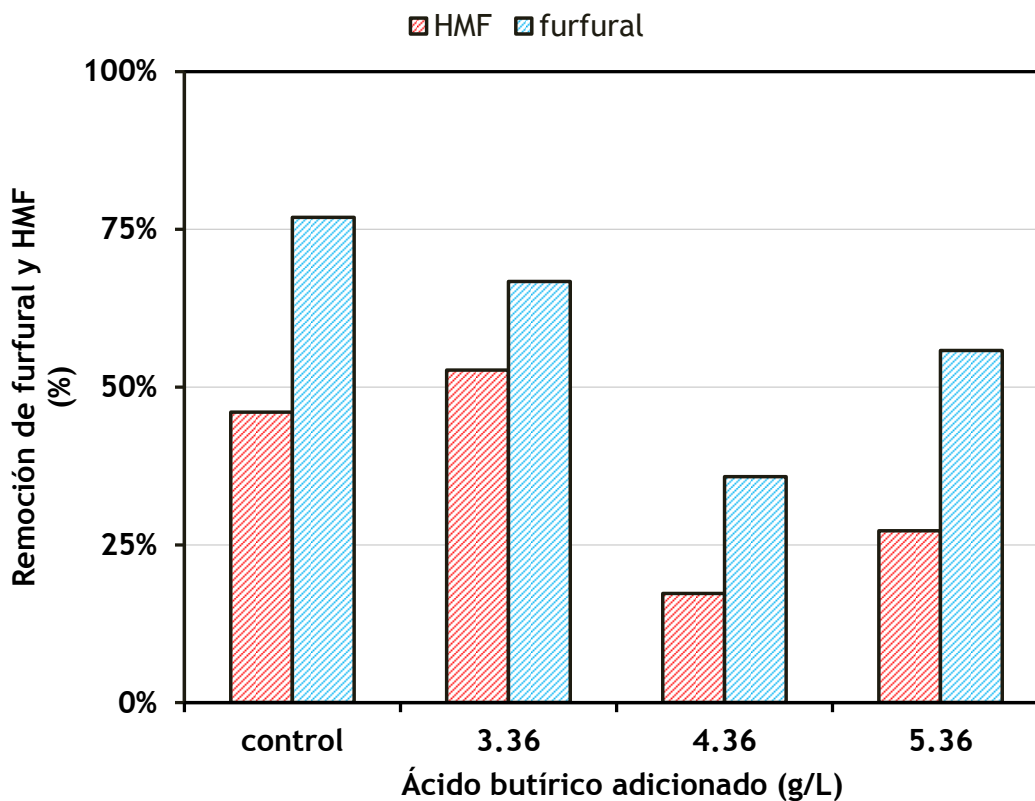


Figura 14. Remoción de furfural y HMF en función de diferentes concentraciones de ácido butírico inicial.

4.2.1 Efecto del hidrolizado sobre la producción de butanol

Una tendencia en la producción de butanol es utilizar hidrolizados de diferentes biomásas lignocelulósicas (Ezeji *et al.*, 2007; Qureshi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2016). Estos hidrolizados son obtenidos mediante diferentes procesos de pretratamiento (Qureshi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2016; Rodriguez *et al.*, 2019). La máxima concentración y rendimiento reportados fue de 25 g/L de butanol y rendimiento de 0.42 g/g a 72 h a partir de hidrolizado ácido de paja de trigo con *Clostridium beijerinckii* P260 (Qureshi *et al.*, 2007).

Por los diferentes pretratamientos de biomasa lignocelulósica, se producen metabolitos derivados de la degradación de las azúcares como ácidos débiles y furanos, entre estos furfural y HMF, estos compuestos en concentraciones menores a 2 g/L no logran inhibir el crecimiento de cepas productoras de butanol como *Clostridium beijerinckii* BA101 (Ezeji *et al.*, 2007). Otros estudios muestran que la presencia de furfural y HMF en bajas concentraciones (0.5 g/l de furfural y 0.6 g/L de HMF), estimulan la producción de butanol con hidrolizado de paja trigo, con una concentración de 24.3 g/L de butanol, 13% más concentración en comparación con el control que no contenía estos metabolitos (Qureshi *et al.*, 2012). De manera similar con concentraciones de hasta 1.5 g/L de furfural y 1.5 g/L de HMF, se obtiene una concentración de 13.7 g/L de butanol, 8% más en comparación con el control (Ezeji *et al.*, 2007). En otros estudios se ha logrado la remoción total de hasta 2-3 g/L de furfural y HMF en tiempos de incubación de 2 d, a alcoholes de menos toxicidad en fermentaciones ABE con cepas como *Clostridium beijerinckii* BA101 y *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (Ezeji *et al.*, 2007; Zhang *et a.*, 2012).

En el presente estudio la concentración máxima lograda fue de 4.7 ± 0.3 g/L y rendimiento de 0.44 ± 0.02 g/g, a partir de hidrolizado de paja trigo obtenido por pretratamiento hidrotérmico con *Clostridium saccharobutylicum*. Esta concentración y rendimiento mayores fueron obtenidos en la condición con mayor concentración de furfural y HMF (0.11 g/L y 0.03 g/L respectivamente), dos veces mayor concentración de butanol en comparación con el control que no contenía estos metabolitos. El contenido inicial de azúcares reductores fue de 18 g/L, tres veces menor que otros estudios con valores de 56-60 g/L (Ezeji *et al.*, 2007; Qureshi *et al.*, 2007), por lo se puede aumentar la producción de butanol.

4.2.2 Efecto del ácido butírico sobre la fermentación acetobutílica

Una de las propuestas tecnológicas actuales para la producción de butanol es su obtención en dos etapas: combinando el proceso de la plataforma de carboxilato y fermentación ABE. En la primer etapa, material lignocelulósico es convertido en ácidos grasos volátiles, sin la adición de enzimas con la acción de cultivos mixtos, para posteriormente usar el ácido butírico como precursor para la producción de butanol con cepas de *Clostridium* (Ai *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018; Chi *et al.*, 2019). Por otra parte, diversos estudios muestran el efecto de la adición de ácido butírico sobre la producción de butanol, la adición de 40 mM de butirato de sodio en el medio de fermentación *Clostridium beijerinckii*, permite la producción de 10 g/L de butanol, un 30% más en comparación con el control sin ácido butírico, además esta concentración se logra en cerca de la mitad de tiempo en comparación con el control (50 h vs 90 h) (Wang *et al.*, 2013). Otro estudio, evalúa la producción de butanol con glucosa (30 g/L) con la adición de 5 g/L de butirato de sodio, la concentración alcanzada fue de 12 g/L de butanol en 72 h con *Clostridium beijerinckii*, esto fue 50% mayor concentración que el control con solamente 30 g/L de glucosa (Li *et al.*, 2018). Los ejemplos anteriores es con la adición de ácido butírico de forma artificial, a continuación se muestran trabajos en los que la adición de ácido butírico es como producto de fermentación ácido-mixta. La máxima concentración reportada es de 16 g/L de butanol y rendimiento de 0.2 g/g, en la fermentación ABE de hidrolizado de paja de trigo con *Clostridium beijerinckii*, el hidrolizado contenía 35 g/L de azúcares reductores y 6 g/L de ácido butírico, sin embargo la etapa de producción de ácido butírico fue a partir también de hidrolizado de paja de trigo con *Clostridium thermocellum* (Chi *et al.*, 2019). El único estudio que reporta la producción de ácidos orgánicos con un cultivo mixto a partir

de paja de arroz en estado sólido, en la primer etapa de fermentación ácido mixta, se obtuvieron 10 g/L de ácidos orgánicos, de los cuales 6 g/L fueron ácido butírico, para posteriormente en la etapa 2, ser mezclados 40% de hidrolizado de paja de arroz (38 g/L de azúcares reductores) y 60% efluentes acidogénicos (4.1 g/L de ácido butírico) para fermentación ABE con *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 con un tiempo de incubación de 96 horas (Li *et al.*, 2018).

En el presente estudio, se obtuvieron ácidos orgánicos en una primera fase a partir de paja de trigo con un cultivo mixto, la máxima concentración alcanzada de ácido butírico fue de 5.0 g/L. Posteriormente se mezcla hidrolizado de paja de trigo con una concentración de 18 g/L de azúcares reductores y efluentes acidogénicos con una concentración de 4.36 g/L de ácido butírico, la adición de ácido butírico presentó efecto significativo sobre la producción de butanol. La máxima concentración de butanol obtenida fue de 1.6 g/L de butanol y rendimiento de 0.11 g/g, la baja concentración de butanol, rendimiento y el aumento de la concentración de ácido butírico al final del tiempo de incubación, permite incidir que el tiempo de incubación no fue suficiente, por la baja concentración de azúcares reductores iniciales, además de la presencia de inhibidores en los efluentes acidogénicos no detectados por los métodos analíticos empleados.

5. CONCLUSIONES

Respecto al efecto de la carga orgánica y el tiempo de retención de sólidos sobre la producción de ácidos grasos volátiles:

- ✓ El aumento de la carga orgánica incrementó la producción de ácidos grasos volátiles hasta lograr un valor máximo de 18 ± 3 g_{DQOeq}/L a una carga orgánica de 60 g ST/L-d. La carga orgánica de 80 g ST/L-d resultó en una menor producción de ácidos grasos volátiles.
- ✓ El tiempo de retención de sólidos solo tuvo efecto significativo sobre la productividad de ácidos grasos volátiles, en el menor tiempo de retención estudiado se obtuvo la mayor productividad de 4.5 ± 0.7 g_{DQOeq}/L-d.
- ✓ La carga orgánica y tiempo de retención de sólidos no tuvieron efecto sobre la selectividad de ácidos orgánicos. Los porcentajes de ácido acético y butírico fueron de 36% y 34%, respectivamente, para cargas orgánicas entre 40 a 80 g ST/L-d y TRS de 2.5 a 7.5 d.
- ✓ La cepa *Clostridium saccharobutylicum* BAA-117 fue capaz de crecer en hidrolizados de paja de trigo concentrados con una producción de butanol de 4.7 g/L.
- ✓ La adición de 4.3 g/L de ácido butírico a hidrolizados de paja de trigo aumentó 1.2 veces la producción de butanol con *Clostridium saccharobutylicum* BAA-117 .

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aboudi, K., Álvarez-Gallego, C. J., & Romero-García, L. I. (2015). Semi-continuous anaerobic co-digestion of sugar beet byproduct and pig manure: effect of the organic loading rate (OLR) on process performance. *Bioresource technology*, *194*, 283-290.
- Aguilar-Sánchez, P., Navarro-Pineda, F. S., Sacramento-Rivero, J. C., & Barahona-Pérez, L. F. (2018). Life-cycle assessment of bioethanol production from sweet sorghum stalks cultivated in the state of Yucatan, Mexico. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *20*(7), 1685-1696.
- Agyeman, F. O., & Tao, W. (2014). Anaerobic co-digestion of food waste and dairy manure: Effects of food waste particle size and organic loading rate. *Journal of environmental management*, *133*, 268-274.
- Ai, B., Li, J., Chi, X., Meng, J., Jha, A. K., Liu, C., & Shi, E. (2014). Effect of pH and buffer on butyric acid production and microbial community characteristics in bioconversion of rice straw with undefined mixed culture. *Biotechnology and bioprocess engineering*, *19*(4), 676-686.
- Amiri, H., & Karimi, K. (2018). Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: challenges and perspectives. *Bioresource technology*.
- Angelo Basile, Adolfo Iulianelli, Francesco Dalena, T. Nejat Veziroglu. (2018). *Ethanol: Science and Engineering*. Elsevier
- Apha (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Water Works Association/American Public Works Association/Water Environment Federation
- Appiah-Nkansah, N. B., Zhang, K., Rooney, W., & Wang, D. (2018). Ethanol production from mixtures of sweet sorghum juice and sorghum starch using very high gravity fermentation with urea supplementation. *Industrial Crops and Products*, *111*, 247-253.
- Arriaga, S., Rosas, I., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2011). Continuous production of hydrogen from oat straw hydrolysate in a biotrickling filter. *International Journal of Hydrogen Energy*, *36*(5), 3442-3449.
- Bala, A., & Singh, B. (2018). Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. *Renewable Energy*.
- Ballesteros, L. F., Michelin, M., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., & Cerqueira, M. Â. (2018). Lignocellulosic Materials: Sources and Processing Technologies. In *Lignocellulosic Materials and Their Use in Bio-based Packaging* (pp. 13-33). Springer, Cham.
- Bankar, S. B., Survase, S. A., Ojamo, H., & Granström, T. (2013). The two stage immobilized column reactor with an integrated solvent recovery module for enhanced ABE production. *Bioresource technology*, *140*, 269-276.
- Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., & Welander, T. (2008). Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochemical Engineering Journal*, *40*(3), 492-499.
- Bhatt, A. K., Bhatia, R. K., Thakur, S., Rana, N., Sharma, V., & Rathour, R. K. (2018). Fuel from Waste: A Review on Scientific Solution for Waste Management and Environment

Conservation. In *Prospects of Alternative Transportation Fuels* (pp. 205-233). Springer, Singapore.

- Bolzonella, D., Pavan, P., Zanette, M., & Cecchi, F. (2007). Two-phase anaerobic digestion of waste activated sludge: effect of an extreme thermophilic prefermentation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *46*(21), 6650-6655.
- Calero, R. R., Lagoa - Costa, B., Fernandez - Feal, M. M. D. C., Kennes, C., & Veiga, M. C. (2018). Volatile fatty acids production from cheese whey: influence of pH, solid retention time and organic loading rate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *93*(6), 1742-1747.
- Campbell, H., Rude, J., Luckert, M., & Taheripour, F. (2018). Prospects for Second-Generation Ethanol in Canada: An Analysis of Economy-Wide Impacts. *Canadian Public Policy*, *44*(3), 259-271.
- Carrillo-Nieves, D., Alanís, M. J. R., de la Cruz Quiroz, R., Ruiz, H. A., Iqbal, H. M., & Parra-Saldívar, R. (2019). Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *102*, 63-74.
- Castillo-Hernández, P., Mendoza-Domínguez, A., & Caballero-Mata, P. (2012). Análisis de las propiedades fisicoquímicas de gasolina y diesel mexicanos reformulados con Etanol. *Ingeniería, investigación y tecnología*, *13*(3), 293-306.
- CEPAL, N. (2017). Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe 2017-2018.
- Chandel, A. K., Garlapati, V. K., Singh, A. K., Antunes, F. A. F., & da Silva, S. S. (2018). The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource technology*.
- Chang, H. N., Kim, N. J., Kang, J., & Jeong, C. M. (2010). Biomass-derived volatile fatty acid platform for fuels and chemicals. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *15*(1), 1-10.
- Cheng, C. L., Che, P. Y., Chen, B. Y., Lee, W. J., Chien, L. J., & Chang, J. S. (2012). High yield bio-butanol production by solvent-producing bacterial microflora. *Bioresource Technology*, *113*, 58-64.
- Chisti, Y. (2019). Introduction to algal fuels. In *Biofuels from Algae* (pp. 1-31). Elsevier.
- Christoforou, E., & Fokaides, P. A. (2019). Biomass Raw Material. In *Advances in Solid Biofuels* (pp. 5-24). Springer, Cham
- Conesa, C., Seguí, L., & Fito, P. (2018). Hydrolytic Performance of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* Cellulases on Lignocellulosic Industrial Pineapple Waste Intended for Bioethanol Production. *Waste and biomass valorization*, *9*(8), 1359-1368.
- Contreras-Dávila, C. A., Méndez-Acosta, H. O., Arellano-García, L., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2017). Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequilana bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chemical Engineering Journal*, *313*, 671-679.
- de Araujo Guilherme, A., Dantas, P. V. F., de Araújo Padilha, C. E., dos Santos, E. S., & de Macedo, G. R. (2019). Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different

fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. *Journal of environmental management*, 234, 44-51.

- De Bhowmick, G., Sarmah, A. K., & Sen, R. (2018). Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource technology*, 247, 1144-1154.
- de Souza Moraes, B., dos Santos, G. M., Delforno, T. P., Fuess, L. T., & da Silva, A. J. (2018). Enriched microbial consortia for dark fermentation of sugarcane vinasse towards value-added short-chain organic acids and alcohol production. *Journal of bioscience and bioengineering*.
- den Haan, R. (2018). Adapting the yeast consolidated bioprocessing paradigm for biorefineries. *Biofuel Research Journal*, 5(3), 827-828.
- Ding, J. C., Xu, G. C., Han, R. Z., & Ni, Y. (2016). Biobutanol production from corn stover hydrolysate pretreated with recycled ionic liquid by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864. *Bioresource technology*, 199, 228-234.
- Dinsdale, R. M., Premier, G. C., Hawkes, F. R., & Hawkes, D. L. (2000). Two-stage anaerobic co-digestion of waste activated sludge and fruit/vegetable waste using inclined tubular digesters. *Bioresource technology*, 72(2), 159-168.
- Dong L.; Chenxi J.; Wei; H. Comparison of micro-aerobic and anaerobic fermentative hydrogen production from corn straw . *International journal of hydrogen energy*, 41, (12), 5456-5464
- Dong, J. J., Ding, J. C., Zhang, Y., Ma, L., Xu, G. C., Han, R. Z., & Ni, Y. (2016). Simultaneous saccharification and fermentation of dilute alkaline-pretreated corn stover for enhanced butanol production by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864. *FEMS microbiology letters*, 363(4).
- Dong, J. J., Han, R. Z., Xu, G. C., Gong, L., Xing, W. R., & Ni, Y. (2018). Detoxification of furfural residues hydrolysate for butanol fermentation by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864. *Bioresource technology*, 259, 40-45.
- Eckert, C. T., Frigo, E. P., Albrecht, L. P., Albrecht, A. J. P., Christ, D., Santos, W. G., ... & Egewarth, V. A. (2018). Maize ethanol production in Brazil: characteristics and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 3907-3912..
- Elfasakhany, A., & Mahrous, A. F. (2016). Performance and emissions assessment of n-butanol–methanol–gasoline blends as a fuel in spark-ignition engines. *Alexandria Engineering Journal*, 55(3), 3015-3024.
- Fang, W., Zhang, X., Zhang, P., Wan, J., Guo, H., Ghasimi, D. S., ... & Zhang, T. (2019). Overview of key operation factors and strategies for improving fermentative volatile fatty acid production and product regulation from sewage sludge. *Journal of Environmental Sciences*.
- Freudenberger, R. (2009). *Alcohol fuel: A guide to making and using ethanol as a renewable fuel*. New society publishers.

- Fu, S. F., Wang, F., Yuan, X. Z., Yang, Z. M., Luo, S. J., Wang, C. S., & Guo, R. B. (2015). The thermophilic (55 °C) microaerobic pretreatment of corn straw for anaerobic digestion. *Bioresource technology*, *175*, 203-208.
- Gandla, M., Martín, C., & Jönsson, L. (2018). Analytical enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass for conversion to biofuels and bio-based chemicals. *Energies*, *11*(11), 2936.
- Ghasemi, M., Alexandridis, P., & Tsianou, M. (2018). Dissolution of cellulosic fibers: Impact of crystallinity and fiber diameter. *Biomacromolecules*, *19*(2), 640-651.
- Gomiero, T. (2018). Large-scale biofuels production: a possible threat to soil conservation and environmental services. *Applied Soil Ecology*, *123*, 729-736.
- Gonzalez, C. G. (2018). An Environmental Justice Critique of Biofuels. *Energy Justice: US and International Perspectives* (Raya Salter, Carmen G. Gonzalez, and Elizabeth Ann Kronk Warner, eds.) Edward Elgar Publishing.
- González, U., Schifter, I., Díaz, L., González-Macías, C., Mejía-Centeno, I., & Sánchez-Reyna, G. (2018). Assessment of the use of ethanol instead of MTBE as an oxygenated compound in Mexican regular gasoline: combustion behavior and emissions. *Environmental monitoring and assessment*, *190*(12), 700.
- Green, E. M. (2011). Fermentative production of butanol—the industrial perspective. *Current opinion in biotechnology*, *22*(3), 337-343.
- Guo, H., Chang, Y., & Lee, D. J. (2018). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: research focuses. *Bioresource technology*, *252*, 198-215.
- Haigh, K. F., Petersen, A. M., Gottumukkala, L., Mandegari, M., Naleli, K., & Görgens, J. F. (2018). Simulation and comparison of processes for biobutanol production from lignocellulose via ABE fermentation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *12*(6), 1023-1036.
- Hassam, S., Ficara, E., Leva, A., & Harmand, J. (2015). A generic and systematic procedure to derive a simplified model from the anaerobic digestion model No. 1 (ADM1). *Biochemical engineering journal*, *99*, 193-203.
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D. (Eds.). (2008). *Biological wastewater treatment*. IWA publishing.
- Hirani, A. H., Javed, N., Asif, M., Basu, S. K., & Kumar, A. (2018). A Review on First-and Second-Generation Biofuel Productions. In *Biofuels: Greenhouse Gas Mitigation and Global Warming* (pp. 141-154). Springer, New Delhi.
- International Energy Agency (IEA): World Energy Statistics and Balances (2017 edition), IEA, Paris, 2017. Revisado el 30 de marzo de 2018.
- Jiang, J. G., Yuan, T. Q., Wang, S. F., Liu, S. J., Shi, X. D., Zheng, L., & Sun, R. C. (2018). Upgrading traditional pulp mill into biorefinery platform: wheat straw as a feedstock. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *6*(11), 15284-15291.
- Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C., & Li, M. (2013). Volatile fatty acids production from food waste: effects of pH, temperature, and organic loading rate. *Bioresource technology*, *143*, 525-530.

- Jiang, Y., Zhang, T., Lu, J., Dürre, P., Zhang, W., Dong, W & Xin, F. (2018). Microbial co-culturing systems: butanol production from organic wastes through consolidated bioprocessing. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(13), 5419-5425.
- Kandyliis, P., Bekatorou, A., Pissaridi, K., Lappa, K., Dima, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Acidogenesis of cellulosic hydrolysates for new generation biofuels. *Biomass and Bioenergy*, 91, 210-216.
- Kim, J. K., Oh, B. R., Chun, Y. N., & Kim, S. W. (2006). Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. *Journal of Bioscience and bioengineering*, 102(4), 328-332.
- Kim, T. H., Lee, Y., Chang, K. H., and Hwang, S. J. (2012b). Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresource Technology*, 103, 136–141.
- Kirli, B., & Karapinar, I. (2018). The effect of HRT on biohydrogen production from acid hydrolyzed waste wheat in a continuously operated packed bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(23), 10678-10685.
- Kolesinska, B., Fraczyk, J., Binczarski, M., Modelska, M., Berlowska, J., Dziugan, P., ... & Kregiel, D. (2019). Butanol Synthesis Routes for Biofuel Production: Trends and Perspectives. *Materials*, 12(3), 350.
- Kothari, N., Holwerda, E. K., Cai, C. M., Kumar, R., & Wyman, C. E. (2018). Biomass augmentation through thermochemical pretreatments greatly enhances digestion of switchgrass by *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 219.
- Kumar, G. B. S., Rajesh, K., Sharma, A. H. K., & Balachandran, S. (2018). Extraction of Biodiesel from Sunflower Oil and Evaluating its Performance and Emission Characteristics in DI Diesel Engine. *Extraction*, 2(3).
- Kumar, G., Sivagurunathan, P., Sen, B., Kim, S. H., & Lin, C. Y. (2017). Mesophilic continuous fermentative hydrogen production from acid pretreated de-oiled jatropha waste hydrolysate using immobilized microorganisms. *Bioresource technology*, 240, 137-143.
- Kuruti, K., Nakkasunchi, S., Begum, S., Juntupally, S., Arelli, V., & Anupoju, G. R. (2017). Rapid generation of volatile fatty acids (VFA) through anaerobic acidification of livestock organic waste at low hydraulic residence time (HRT). *Bioresource technology*, 238, 188-193.
- Ladeira-Ázar, R. I., Morgan, T., Maitan-Alfenas, G. P., & Guimarães, V. M. (2018). Inhibitors Compounds on Sugarcane Bagasse Saccharification: Effects of Pretreatment Methods and Alternatives to Decrease Inhibition. *Applied biochemistry and biotechnology*, 1-14.
- Lazuka, A., Roland, C., Barakat, A., Guillon, F., O'Donohue, M., & Hernandez-Raquet, G. (2017). Ecofriendly lignocellulose pretreatment to enhance the carboxylate production of a rumen-derived microbial consortium. *Bioresource technology*, 236, 225-233.
- Lee, I. S., Parameswaran, P., & Rittmann, B. E. (2011). Effects of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion of thickened mixed sludge. *Bioresource technology*, 102(22), 10266-10272.

- Lee, W. S., Chua, A. S. M., Yeoh, H. K., & Ngoh, G. C. (2014). A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, 235, 83-99.
- Li, D., Liu, S., Mi, L., Li, Z., Yuan, Y., Yan, Z., & Liu, X. (2015). Effects of feedstock ratio and organic loading rate on the anaerobic mesophilic co-digestion of rice straw and cow manure. *Bioresource technology*, 189, 319-326.
- Li, J., Chi, X., Zhang, Y., & Wang, X. (2018). Enhanced coproduction of hydrogen and butanol from rice straw by a novel two-stage fermentation process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 127, 62-68.
- Li, T., & He, J. (2016). Simultaneous saccharification and fermentation of hemicellulose to butanol by a non-sporulating *Clostridium* species. *Bioresource technology*, 219, 430-438.
- Li, X., Chang, S. H., & Liu, R. (2018). Industrial Applications of Cellulases and Hemicellulases. In *Fungal Cellulolytic Enzymes*(pp. 267-282). Springer, Singapore.
- Li, Y., Chen, Y., Wu, G., Chia-fon, F. L., & Liu, J. (2018). Experimental comparison of acetone-n-butanol-ethanol (ABE) and isopropanol-n-butanol-ethanol (IBE) as fuel candidate in spark-ignition engine. *Applied Thermal Engineering*, 133, 179-187.
- Li, Y., Ning, Z., Chia-fon, F. L., Yan, J., & Lee, T. H. (2019). Effect of acetone-butanol-ethanol (ABE)-gasoline blends on regulated and unregulated emissions in spark-ignition engine. *Energy*, 168, 1157-1167.
- Li, Y., Tang, W., Chen, Y., Liu, J., & Chia-fon, F. L. (2019). Potential of acetone-butanol-ethanol (ABE) as a biofuel. *Fuel*, 242, 673-686.
- Liadi, M. A., Tawabini, B., Shawabkeh, R., Jarrah, N., Oyehan, T. A., Shaibani, A., & Makkawi, M. (2018). Treating MTBE-contaminated water using sewage sludge-derived activated carbon. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29), 29397-29407.
- Liguori, R., & Faraco, V. (2016). Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. *Bioresource technology*, 215, 13-20.
- Lim, S. J., Kim, B. J., Jeong, C. M., Ahn, Y. H., & Chang, H. N. (2008). Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. *Bioresource Technology*, 99(16), 7866-7874.
- Liu, H., Wang, L., Zhang, X., Fu, B., Liu, H., Li, Y., & Lu, X. (2019). A viable approach for commercial VFAs production from sludge: Liquid fermentation in anaerobic dynamic membrane reactor. *Journal of hazardous materials*, 365, 912-920
- Longo, S., Katsou, E., Malamis, S., Frison, N., Renzi, D., & Fatone, F. (2015). Recovery of volatile fatty acids from fermentation of sewage sludge in municipal wastewater treatment plants. *Bioresource technology*, 175, 436-444.
- Luo, W., Zhao, Z., Pan, H., Zhao, L., Xu, C., & Yu, X. (2018). Feasibility of butanol production from wheat starch wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Energy*, 154, 240-248.
- Lynd, L. R., Van Zyl, W. H., McBride, J. E., & Laser, M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current opinion in biotechnology*, 16(5), 577-583.

- Maiti, S., Gallastegui, G., Sarma, S. J., Brar, S. K., Le Bihan, Y., Drogui, P., ... & Verma, M. (2016). A re-look at the biochemical strategies to enhance butanol production. *Biomass and bioenergy*, *94*, 187-200.
- Man, H., Liu, H., Xiao, Q., Deng, F., Yu, Q., Wang, K., ... & Hao, J. (2018). How ethanol and gasoline formula changes evaporative emissions of the vehicles. *Applied energy*, *222*, 584-594.
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *45*, 540–555.
- Micolucci, F., Gottardo, M., Bolzonella, D., & Pavan, P. (2014). Automatic process control for stable bio-hythane production in two-phase thermophilic anaerobic digestion of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, *39*(31), 17563-17572.
- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, *31*(3), 426-428.
- Min, K. S., Khan, A. R., Kwon, M. K., Jung, Y. J., Yun, Z., and Kiso, Y. (2005). Acidogenic fermentation of blended food-waste in combination with primary sludge for the production of volatile fatty acids. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *80*(8), 909–915.
- Minteer, S. (2016). *Alcoholic fuels*. CRC Press.
- Mithra, M. G., Jeeva, M. L., Sajeev, M. S., & Padmaja, G. (2018). Comparison of ethanol yield from pretreated lignocellulo-starch biomass under fed-batch SHF or SSF modes. *Heliyon*, *4*(10), e00885.
- Molina-Guerrero, C. E., de la Rosa, G., Castillo-Michel, H., Sánchez, A., García-Castañeda, C., Hernández-Rayas, A., ... & Suarez-Vázquez, S. (2018). Physicochemical Characterization of Wheat Straw during a Continuous Pretreatment Process. *Chemical Engineering & Technology*, *41*(7), 1350-1350.
- Morgan-Sagastume, F., Pratt, S., Karlsson, A., Cirne, D., Lant, P., and Werker, A. (2011). Production of volatile fatty acids by fermentation of waste activated sludge pre-treated in fullscale thermal hydrolysis plants. *Bioresource Technology*, *102*, 3089–3097.
- Motte, J. C., Trably, E., Escudié, R., Hamelin, J., Steyer, J. P., Bernet, N., ... & Dumas, C. (2013). Total solids content: a key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion. *Biotechnology for biofuels*, *6*(1), 164.
- Mussatto, S. I. (Ed.). (2016). *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*. Elsevier.
- Naidu, D. S., Hlangothi, S. P., & John, M. J. (2018). Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydrate polymers*, *179*, 28-41.
- Naik, L., Gebreegziabher, Z., Tumwesige, V., Balana, B. B., Mwirigi, J., & Austin, G. (2014). Factors determining the stability and productivity of small scale anaerobic digesters. *Biomass and bioenergy*, *70*, 51-57.
- Nanda, S., Rana, R., Sarangi, P. K., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2018). A Broad Introduction to First-, Second-, and Third-Generation Biofuels. In *Recent Advancements in Biofuels and Bioenergy Utilization* (pp. 1-25). Springer, Singapore.

- Nguyen, T. H., Granger, J., Pandya, D., & Paustian, K. (2019). High-resolution multi-objective optimization of feedstock landscape design for hybrid first and second generation biorefineries. *Applied Energy*, 238, 1484-1496.
- Owamah, H. I., & Izinyon, O. C. (2015). The effect of organic loading rates (OLRs) on the performances of food wastes and maize husks anaerobic co-digestion in continuous mode. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 11, 71-76.
- Pang, J., Hao, M., Li, Y., Liu, J., Lan, H., Zhang, Y., ... & Liu, Z. (2018). Consolidated Bioprocessing Using *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* Co-culture for Enhancing Ethanol Production from Corn Straw. *BioResources*, 13(4), 8209-8221.
- Patinvoh, R. J., Mehrjerdi, A. K., Horváth, I. S., & Taherzadeh, M. J. (2017). Dry fermentation of manure with straw in continuous plug flow reactor: Reactor development and process stability at different loading rates. *Bioresource technology*, 224, 197-205.
- Pohl, M., Mumme, J., Heeg, K., & Nettmann, E. (2012). Thermo- and mesophilic anaerobic digestion of wheat straw by the upflow anaerobic solid-state (UASS) process. *Bioresource technology*, 124, 321-327.
- Popa, V. I., & Volf, I. (Eds.). (2018). *Biomass as renewable raw material to obtain bioproducts of high-tech value*. Elsevier.
- Qi, G., Xiong, L., Li, H., Huang, Q., Luo, M., Tian, L., ... & Chen, X. (2019). Hydro-tropic pretreatment on wheat straw for efficient biobutanol production. *Biomass and Bioenergy*, 122, 76-83.
- Qiao, W., Liu, H., Zhang, Y., Miao, J., Tang, T., & Yang, Q. (2019). Structural Characterization of the Biogas Fermentation Residue from Wheat Straw. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 13(2), 188-194.
- Qiao, W., Takayanagi, K., Niu, Q., Shofie, M., & Li, Y. Y. (2013). Long-term stability of thermophilic co-digestion submerged anaerobic membrane reactor encountering high organic loading rate, persistent propionate and detectable hydrogen in biogas. *Bioresource technology*, 149, 92-102.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Cotta, M. A., & Singh, V. (2013). An economic evaluation of biological conversion of wheat straw to butanol: a biofuel. *Energy Conversion and Management*, 65, 456-462.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Dien, B., Hector, R. E., & Cotta, M. A. (2010). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I—Use of barley straw hydrolysate. *Biomass and bioenergy*, 34(4), 559-565.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Klasson, K. T., & Liu, S. (2018). Butanol production from sweet sorghum bagasse with high solids content: Part I—comparison of liquid hot water pretreatment with dilute sulfuric acid. *Biotechnology progress*, 34(4), 960-966.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Klasson, K. T., & Liu, S. (2018). High solid fed - batch butanol fermentation with simultaneous product recovery: Part II—process integration. *Biotechnology progress*, 34(4), 967-972.

- Rajagopalan, G., He, J., & Yang, K. L. (2014). Direct fermentation of xylan by *Clostridium* strain BOH3 for the production of butanol and hydrogen using optimized culture medium. *Bioresource technology*, *154*, 38-43.
- Ray, R. C., & Ramachandran, S. (Eds.). (2018). *Bioethanol Production from Food Crops: Sustainable Sources, Interventions, and Challenges*. Academic Press.
- Rdzanek, P., Marszałek, J., & Kamiński, W. (2018). Biobutanol concentration by pervaporation using supported ionic liquid membranes. *Separation and Purification Technology*, *196*, 124-131.
- Rech, F. R., Fontana, R. C., Rosa, C. A., Camassola, M., Ayub, M. A. Z., & Dillon, A. J. (2019). Fermentation of hexoses and pentoses from sugarcane bagasse hydrolysates into ethanol by *Spathaspora hagerdaliae*. *Bioprocess and biosystems engineering*, *42*(1), 83-92.
- Rodríguez, F., Sanchez, A., & Amaya-Delgado, L. (2019). Xylooligosaccharides production from lignocellulosic biomass using a pilot-scale pretreatment continuous tubular reactor. Modelling and experimental validation. *Industrial Crops and Products*, *134*, 62-70.
- Roy, P., & Dutta, A. (2019). Life Cycle Assessment (LCA) of Bioethanol Produced From Different Food Crops: Economic and Environmental Impacts. In *Bioethanol Production from Food Crops* (pp. 385-399). Academic Press.
- Ruiz, H. A., Martínez, A., & Vermerris, W. (2016). Bioenergy potential, energy crops, and biofuel production in Mexico. *BioEnergy Research*, *9*(4), 981-984.
- Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., & Wu, Y. V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, *40*(12), 3693-3700.
- Saha, B. C., Nichols, N. N., Qureshi, N., Kennedy, G. J., Iten, L. B., & Cotta, M. A. (2015). Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource technology*, *175*, 17-22.
- Sanchez, A., Valdez-Vazquez, I., Soto, A., Sánchez, S., & Tavaréz, D. (2017). Lignocellulosic n-butanol co-production in an advanced biorefinery using mixed cultures. *Biomass and Bioenergy*, *102*, 1-12.
- Sarangi, P. K., & Nanda, S. (2018). Recent Developments and Challenges of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation. In *Recent Advancements in Biofuels and Bioenergy Utilization* (pp. 111-123). Springer, Singapore.
- Sarkar, O., Butti, S. K., & Mohan, S. V. (2017). Acidogenesis driven by hydrogen partial pressure towards bioethanol production through fatty acids reduction. *Energy*, *118*, 425-434.
- Sarris, D., Economou, C. N., & Papanikolaou, S. (2018). Food Waste Management: The Role of Biotechnology. *Progress in Food Biotechnology*, *4*, 383-430.
- Saynes Santillán, V., Etchevers Barra, J. D., Paz Pellat, F., & Alvarado Cárdenas, L. O. (2016). Emisiones de gases de efecto invernadero en sistemas agrícolas de México. *Terra Latinoamericana*, *34*(1), 83-96.
- SENER, S. (2017). Balance Nacional de Energía 2017. Consultado 26-09-2019 en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/414843/Balance_Nacional_de_Energ_a_2017.pdf

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2018). Consultado 26-09-2019 en <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/agricultura/intension/Intenci%C3%B3n%20de%20siembraOI%202018porcultivo.pdf>
- Shanmugam, S., Sun, C., Chen, Z., & Wu, Y. R. (2019). Enhanced bioconversion of hemicellulosic biomass by microbial consortium for biobutanol production with bioaugmentation strategy. *Bioresource technology*.
- Shaw IV, A. J., Desai, S. G., Lynd, L. R., Podkaminer, K., Bardsley, J., & Hogsett, D. A. (2018). *U.S. Patent Application No. 10/066,217*.
- Shinto, H., Tashiro, Y., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., ... & Sonomoto, K. (2008). Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone–butanol–ethanol fermentation. *Process Biochemistry*, 43(12), 1452-1461.
- Silva, V., Ratti, R. P., Sakamoto, I. K., Andrade, M. V. F., & Varesche, M. B. A. (2018). Biotechnological products in batch reactors obtained from cellulose, glucose and xylose using thermophilic anaerobic consortium. *Renewable energy*, 125, 537-545.
- Simas-Dias, D., Acevedo-Jaramillo, L. Y., Vasconcelos, U., & Pereira, N. (2018). Characterization of β -glucosidases produced by *Aspergillus niger* ATCC 1004 in submerged fermentation from sugarcane bagasse. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 365-377.
- Singh, N., Mathur, A. S., Gupta, R. P., Barrow, C. J., Tuli, D., & Puri, M. (2018). Enhanced cellulosic ethanol production via consolidated bioprocessing by *Clostridium thermocellum* ATCC 31924. *Bioresource technology*, 250, 860-867.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2012). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL Laboratory Analytical Procedures 2012.
- Souza, A., Watanabe, M. D. B., Cavalett, O., Ugaya, C. M. L., & Bonomi, A. (2018). Social life cycle assessment of first and second-generation ethanol production technologies in Brazil. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 23(3), 617-628.
- Souza, S. P., Nogueira, L. A. H., Martinez, J., & Cortez, L. A. B. (2018). Sugarcane can afford a cleaner energy profile in Latin America & Caribbean. *Renewable Energy*, 121, 164-172.
- Stein, U. H., Wimmer, B., Ortner, M., Fuchs, W., & Bochmann, G. (2017). Maximizing the production of butyric acid from food waste as a precursor for ABE-fermentation. *Science of the Total Environment*, 598, 993-1000.
- Strazzera, G., Battista, F., Garcia, N. H., Frison, N., & Bolzonella, D. (2018). Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of environmental management*, 226, 278-288.
- Tabañag, I. D. F., Chu, I. M., Wei, Y. H., & Tsai, S. L. (2018). Ethanol production from hemicellulose by a consortium of different genetically-modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 89, 15-25.
- Takaki, M., Tan, L., Murakami, T., Tang, Y. Q., Sun, Z. Y., Morimura, S., & Kida, K. (2015). Production of biofuels from sweet sorghum juice via ethanol–methane two-stage fermentation. *Industrial Crops and Products*, 63, 329-336.

- Tauro, R., Serrano-Medrano, M., & Masera, O. (2018). Solid biofuels in Mexico: a sustainable alternative to satisfy the increasing demand for heat and power. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 1-13.
- Tian, S. Q., Zhao, R. Y., & Chen, Z. C. (2018). Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass from wheat straw materials. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 483-489.
- Traverso, P., Pavan, P., Bolzonella, D., Innocenti, L., Cecchi, F., & Mata-Alvarez, J. (2000). Acidogenic fermentation of source separated mixtures of vegetables and fruits wasted from supermarkets. *Biodegradation*, 11(6), 407-414.
- Valdez - Vazquez, I., & Sanchez, A. (2018). Proposal for biorefineries based on mixed cultures for lignocellulosic biofuel production: a techno - economic analysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(1), 56-67.
- Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Carmona-Martínez, A., Muñoz-Páez, K. M., & Poggi-Varaldo, H. M. (2006). Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environmental science & technology*, 40(10), 3409-3415.
- Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparza-Garcia, F., Cecchi, F., & Poggi-Varaldo, H. M. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(13-14), 1383-1391.
- Van Soest, P. J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 46, 829-835.
- Velásquez, Alejandro, Marnet, Pierre-Guy, & Arias, Rodrigo. (2015). Improvement in nutritional quality of fibrous food via in vitro digestion by *Aspergillus niger*. *Ciencia e investigación agraria*, 42(1), 45-55
- Wang, J., Chen, X., Chio, C., Yang, C., Su, E., Jin, Y., ... & Qin, W. (2019). Delignification overmatches hemicellulose removal for improving hydrolysis of wheat straw using the enzyme cocktail from *Aspergillus niger*. *Bioresource technology*, 274, 459-467.
- Wang, Z., Cao, G., Jiang, C., Song, J., Zheng, J., & Yang, Q. (2013). Butanol production from wheat straw by combining crude enzymatic hydrolysis and anaerobic fermentation using *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *Energy & Fuels*, 27(10), 5900-5906.
- Weissermel, K., & Arpe, H. J. (1981). *Química orgánica industrial*. Reverté.
- Wen, Z., Ledesma-Amaro, R., Lin, J., Jiang, Y., & Yang, S. (2019). Improved n-butanol production from *Clostridium cellulovorans* by integrated metabolic and evolutionary engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM-02560.
- Wiselogle, A., Tyson, S., & Johnson, D. (2018). Biomass feedstock resources and composition. In *Handbook on Bioethanol* (pp. 105-118). Routledge.
- Wu, H., Wang, C., Chen, P., He, A. Y., Xing, F. X., Kong, X. P., & Jiang, M. (2017). Effects of pH and ferrous iron on the coproduction of butanol and hydrogen by *Clostridium beijerinckii* IB4. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(10), 6547-6555.

- Xiao, X., Shi, W., Huang, Z., Ruan, W., Miao, H., Ren, H., & Zhao, M. (2017). Process stability and microbial response of anaerobic membrane bioreactor treating high-strength kitchen waste slurry under different organic loading rates. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *121*, 35-43.
- Xin, F., Dong, W., Zhang, W., Ma, J., & Jiang, M. (2018). Biobutanol Production from Crystalline Cellulose through Consolidated Bioprocessing. *Trends in biotechnology*.
- Xu, F., Li, Y., Ge, X., Yang, L., & Li, Y. (2018). Anaerobic digestion of food waste—Challenges and opportunities. *Bioresource technology*, *247*, 1047-1058.
- Yan, B. H., Selvam, A., & Wong, J. W. (2014). Application of rumen microbes to enhance food waste hydrolysis in acidogenic leach-bed reactors. *Bioresource technology*, *168*, 64-71.
- Yuan, Y., Hu, X., Chen, H., Zhou, Y., Zhou, Y., & Wang, D. (2019). Advances in enhanced volatile fatty acid production from anaerobic fermentation of waste activated sludge. *Science of The Total Environment*, 133741.
- Zhang, G., Zhang, P., Yang, J., & Liu, H. (2008). Energy-efficient sludge sonication: Power and sludge characteristics. *Bioresource Technology*, *99*(18), 9029-9031.
- Zhao, L., Cao, G. L., Sheng, T., Ren, H. Y., Wang, A. J., Zhang, J., ... & Ren, N. Q. (2017). Bio-immobilization of dark fermentative bacteria for enhancing continuous hydrogen production from cornstalk hydrolysate. *Bioresource technology*, *243*, 548-555.
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J. W., & Zhang, Y. (2018). Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: a mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresource technology*, *248*, 68-78.

ANEXO 1

ANEXO 1. Gráficas de desempeño de la producción de ácidos grasos volátiles y selectividad para las cuatro cargas orgánicas en los tres tiempos de retención de sólidos estudiados.

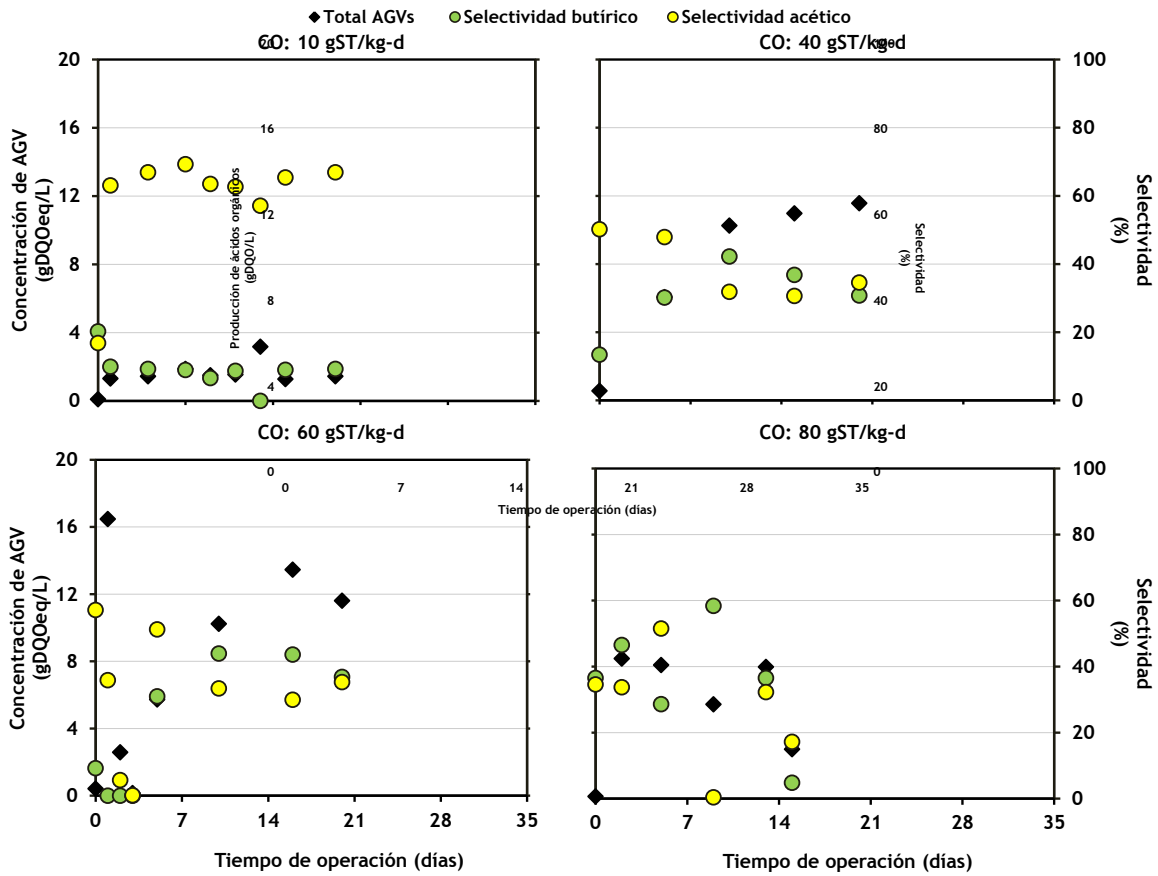


Figura A1. Desempeño de los reactores de fermentación ácido-mixta operados a un tiempo de retención de sólidos de 2.5 días y cuatro cargas orgánicas.

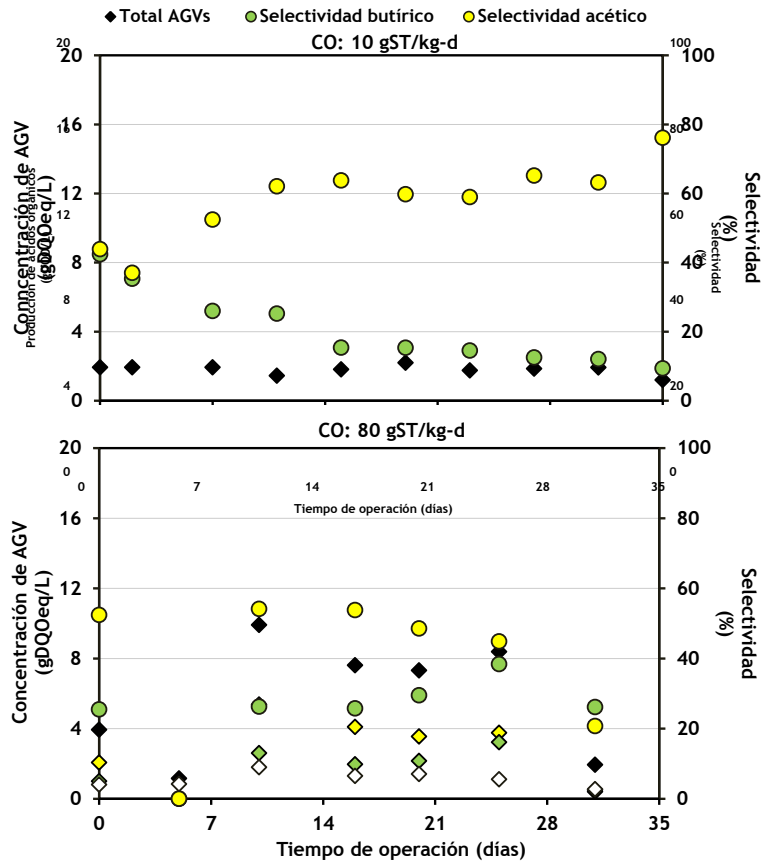


Figura A2. Desempeño de los reactores de fermentación ácido-mixta operados a un tiempo de retención de sólidos de 7.5 días y dos cargas orgánicas.