



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INSTITUTO DE ENERGÍAS RENOVABLES
ENERGÍA - FUENTES RENOVABLES

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN INTEGRAL DE BIOETANOL Y
BIOGÁS A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CAFÉ**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:

M.I. BIANCA YADIRA PÉREZ SARIÑANA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. SEBASTIAN PATHIYAMATTOM JOSEPH, IER-UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. SERGIO ALBERTO GAMBOA SÁNCHEZ, IER-UNAM

DR. FABIO LUIGI MANZINI POLI, IER-UNAM

DR. SERGIO SALDAÑA TRINIDAD, UPCHIAPAS

DRA. ALINA JUANTORENA UGÁS, UAEM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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. SERGIO ALBERTO GAMBOA SÁNCHEZ, IER-UNAM

Secretario: DR. FABIO LUIGI MANZINI POLI, IER-UNAM

1^{er} Vocal: DR. SEBASTIAN PATHIYAMATTOM JOSEPH, IER-UNAM

2^{er} Vocal: DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA, UAEM

3^{er} Vocal: DR. SERGIO SALDAÑA TRINIDAD, UPCHIAPAS

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE ENERGÍAS RENOVABLES - UNAM, INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CHIAPAS Y UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

TUTOR DE TESIS:

DR. SEBASTIAN PATHIYAMATTOM JOSEPH

FIRMA

Dedicatoria

A mis padres: Elpidio y María Dolores

Por su apoyo y amor incondicional

A mis hermanos: Aldo Giovanni y Jesús Elpidio

Por su paciencia y estima

A mi sobrinas: Johana Michelle, Ximena Monserrat y Renatta Isabella

Para dejarles este legado y ejemplo

Agradecimientos

Con especial reconocimiento, admiración y respeto.

A mi tutor:

Dr. Sebastian Pathiyamattom Joseph

A los integrantes del comité tutor:

Dr. Sergio Alberto Gamboa Sánchez

Dr. Fabio Luigi Manzini Poli

Dr. Sergio Saldaña Trinidad

Dra. Alina Juantorena Ugás

Al Instituto de Energías Renovables (IER)

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

A la Universidad Politécnica de Chiapas (UPChiapas)

Al CONACYT por el apoyo financiero otorgado para la realización de este trabajo, agradezco también al proyecto CONACYT-INF224765.

Al Dr. Antonio De León Rodríguez de la división de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT).

Al Dr. Carlos Alberto Guerrero Fajardo del departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Al Dr. Luis Caspeta Guadarrama por fungir como integrante del jurado de examen de doctor.

A la Dra. Patricia Eugenia Altuzar Coello del IER por la ayuda técnica recibida en los análisis de FTIR.

Al M. B. Leandro Gabriel Ordoñez Acevedo de la división de biología molecular del IPICyT por el apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Yolanda del Carmen Pérez Luna por la revisión que realizó a la tesis.

A mis amigos: Viviana, Fernando, Nayeli, Amílcar, Yolanda, Veronica, Sergio, Vanessa y Cony, por acompañarme en este proceso de crecimiento profesional.

A mis pastores y hermanos de la congregación.

A mi Familia.

Ante todo, gracias a Dios.

Contenido

Resumen	17
1. Introducción	19
1.1. Objetivos	23
1.1.1. Objetivo general	23
2. Marco teórico	25
2.1. Combustibles fósiles y su efecto en el medio ambiente	25
2.2. Biocombustibles	27
2.3. Residuos agroindustriales	29
2.3.1. Cereza de café	31
2.3.2. Mucílago de café	32
2.4. Conversión de azúcares en etanol por fermentación alcohólica	32
2.4.1. Bioetanol	33
2.5. Digestión anaerobia	33
2.5.1. Características y usos del biogás	36
2.6. Biorreactores	36
2.6.1. Sistema discontinuo o batch	37
2.6.2. Sistema semicontinuo o fed-batch	37
2.6.3. Sistema continuo	37
3. Método simple para determinar la producción de bioetanol a partir de mucílago de café.	39
3.1. Resumen	39
3.2. Abstract	40
3.3. Introducción	40

3.4.	Materiales y métodos	41
3.4.1.	Sustrato	41
3.4.2.	Microorganismo	41
3.4.3.	Proceso de fermentación	42
3.4.4.	Métodos analíticos	42
3.4.5.	Método del picnómetro	42
3.4.6.	Comparación de dos medias experimentales	43
3.5.	Resultados y discusiones	43
3.5.1.	Determinación de la concentración de bioetanol	43
3.6.	Conclusiones	47
4.	Optimización de la producción de bioetanol apartir de mucílago de café	49
4.1.	Resumen	49
4.2.	Abstract	50
4.3.	Introducción	50
4.4.	Materiales y métodos	51
4.4.1.	Sustrato	51
4.4.2.	Cultivo de microorganismo y preparación	51
4.4.3.	Fermentación	51
4.4.4.	Diseño experimental	52
4.4.5.	Análisis	53
4.5.	Resultados y discusiones	53
4.5.1.	Caracterización de mucílago de café	53
4.5.2.	Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de bioetanol	55
4.6.	Conclusiones	63
5.	Optimización de la producción de biogás a partir de mucílago de café	65
5.1.	Resumen	65
5.2.	Abstract	66
5.3.	Introducción	66
5.4.	Materiales y métodos	67
5.4.1.	Sustrato	67
5.4.2.	Inóculo	68
5.4.3.	Digestión anaerobia discontinua	68
5.4.4.	Diseño experimental	68
5.4.5.	Análisis	69
5.5.	Resultados y discusiones	69

<i>Contenido</i>	11
5.5.1. Caracterización del sustrato	69
5.5.2. Producción de biogás	70
5.5.3. Análisis de superficie de respuesta y optimización	71
5.6. Conclusiones	74
6. Escalamiento del proceso de fermentación y digestión anaerobia	77
6.1. Resumen	77
6.2. Abstract	78
6.3. Introducción	78
6.4. Materiales y métodos	78
6.4.1. Sustrato y microorganismo	78
6.4.2. Cultivo en biorreactor	79
6.4.3. Análisis	80
6.5. Resultados y discusiones	81
6.5.1. Escalamiento del proceso de producción de bioetanol	81
6.5.2. Escalamiento del proceso de producción de biogás	83
6.6. Conclusiones	85
7. Conclusiones	87
Anexos	91
Referencias	94

Lista de figuras

1.1. Producción mundial de energía primaria [IEA, 2014].	20
1.2. Consumo mundial de energía por energético [IEA, 2014].	21
1.3. Consumo y procedencia de energía del sector transporte [SENER, 2014].	22
2.1. Representación del corte longitudinal de la cereza de café.	31
2.2. Extracción mecánica de mucílago de café.	32
2.3. Proceso de transformación de la materia organica en un proceso de digestión anaerobia [Verea-Valladares, 2009].	35
3.1. Curva de calibración usando mucílago de café como medio de fermentación.	44
3.2. Gráfica de puntos de la concentración inicial de azúcares (\circ), rendimiento (Δ), y rendimiento fraccional (\square) para tres ensayos diferentes usando el método del picnómetro.	45
3.3. Función que describe la ecuación 3.4 para la concentración de bioetanol con respecto a la concentración de azúcares (Design Expert 7.0.0).	46
4.1. Superficies de respuesta descritas por los modelos que representan la dependencia de la producción de bioetanol en el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares.	57
4.2. Superficies de respuesta descritas por los modelos que representan la dependencia del rendimiento producto/sustrato en el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares.	59

4.3.	Superficies de respuesta descritas por los modelos que representan la dependencia de la tasa de producción en el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcar.	61
4.4.	Comportamiento cinético del cultivo discontinuo para la condición óptima (concentración de bioetanol (■), concentración de glicerol (●) y concentración de azúcares (▲)).	62
5.1.	Superficies de respuesta descritas por los modelos que representan la dependencia de la producción de biogas en el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares.	72
5.2.	Cinética de consumo de azúcares (■) y producción de biogás (●) para la condición óptima	73
5.3.	Producción de ácidos grasos volátiles para la condición óptima, en condiciones anaerobias usando lodo residual como inóculo (Ácido láctico (■), ácido acético (●) y ácido butírico (▲)).	74
6.1.	Esquema de biorreactor y disposición del sistema de fermentación discontinua. [Davila-Vazquez et al., 2009]	80
6.2.	Cinética del cultivo discontinuo para la condición óptima escalada a un volumen de 1 L (Potencial redox (-), concentración de bioetanol (■), concentración de azúcares (▲) y concentración de glicerol (●)).	82
6.3.	Correlación lineal entre la concentración de bioetanol y el potencial redox.	83
6.4.	Cinética de producción de biogás (●) y consumo de azúcar (▲.)	84
6.5.	Cinéticas de producción de ácidos grasos volátiles (ácido butírico (■) y ácido láctico (◆)).	84
6.6.	Evolución del potencial redox en la producción de biogás.	85

Lista de tablas

2.1. Usos de los residuos agroindustriales	30
3.1. Producción de bioetanol a partir de mucílago de café determinado por el método del picnómetro y HPLC	44
3.2. Contraste F para dos muestras suponiendo varianzas iguales.	46
4.1. Composición química de mucílago de café.	54
4.2. Concentración de compuestos tóxicos en mucílago de café.	54
4.3. Diseño experimental y resumen de variables dependientes para la producción de bioetanol	55
4.4. Análisis de varianza para el ajuste del modelo para la producción de bioetanol	56
4.5. Análisis de varianza para el ajuste del modelo para el rendimiento producto/sustrato	58
4.6. Análisis de varianza para el ajuste del modelo para la tasa de producción	60
5.1. Diseño experimental y resumen de variables dependientes para la producción de biogás	70

Resumen

El estado de Chiapas es uno de los mayores productores de café en México. En esta industria, hay grandes cantidades de residuos que son tóxicos y perjudiciales para el medio ambiente. Durante el proceso de extracción del grano de café, se generan residuos como: pulpa, mucílago y pergamino. El mucílago de café es un residuo agroindustrial compuesto principalmente de azúcares simples, los cuales resultan ser una fuente aprovechable para la producción de bioetanol y biogás.

La metodología de superficie de respuesta, se aplicó para obtener las condiciones óptimas para la producción de bioetanol y biogás a partir de mucílago de café (MC) como sustrato, usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica y lodo metanogénico en la digestión anaerobia. Las variables iniciales fueron pH, temperatura y concentración inicial de azúcar.

Los experimentos se llevaron a cabo en botellas serológicas de 110 mL. Los resultados sugieren que el mucílago de café es un sustrato viable para la producción de bioetanol y biogás. El escalamiento se llevó a cabo en un biorreactor con un volumen de trabajo de 1 L a temperatura y pH controlado de acuerdo a las condiciones óptimas establecidas en los resultados del diseño experimental, obteniendo una producción máxima de bioetanol de $16.62 \text{ g/L} \pm 0.25$ y de biogás de 2950 mL.

La aportación de este trabajo de investigación es ampliar la reutilización del mucílago de café como residuo, dando a conocer sus características como sustrato en la fermentación y digestión anaerobia para la producción de bioenergía, a través de procesos optimizados para mejorar los rendimientos de los biocombustibles.

Capítulo 1

Introducción

La demanda de energía en el mundo está creciendo aceleradamente, el 88 % de esta demanda se satisface con los combustibles fósiles. Prospectivas han demostrado que la demanda de energía aumentará durante este siglo por un factor de dos o tres [IEA, 2006]. Al mismo tiempo, la concentración de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera están creciendo rápidamente, siendo las emisiones de CO₂ el contribuyente más importante al efecto del cambio climático proveniente de la combustión de combustibles convencionales. Con el fin de minimizar el calentamiento global y efectos del cambio climático, las emisiones de gases de efecto invernadero deben reducirse a menos de la mitad de los niveles de emisiones mundiales de 1990 [IPCC, 2000]. Otro desafío global importante es la seguridad del abastecimiento energético, porque la mayor parte de las reservas de petróleo y de gas convencionales se concentran en regiones políticamente inestables.

En 2012, la producción mundial de energía primaria totalizó en 563,591.72 Petajoules (PJ) (Figura 1.1), 2.0 % mayor que en 2011. Los países con mayor producción primaria fueron China, Estados Unidos, Rusia, Arabia Saudita e India, con participaciones de 18.8 %, 13.4 %, 9.9 %, 4.6 % y 4.0 %, respectivamente. México se situó en el duodécimo lugar, con 1.6 % de la energía total producida en el mundo. Dentro de los cambios en la canasta de producción primaria, destacó el incremento de la participación del carbón y sus derivados, que ganaron 0.2 puntos porcentuales de 2011 a 2012. Por su parte, la nucleoenergía perdió 0.3 puntos porcentuales. Ligado a lo anterior, el principal incremento se observó en la producción del carbón y sus derivados, con 2.4 % respecto al año anterior. La producción mundial de energías renovables incrementó 3.3 %, la de petróleo 1.9 %, y la de gas natural

1.7 %, mientras que la nucleenergía disminuyó 4.7 %.

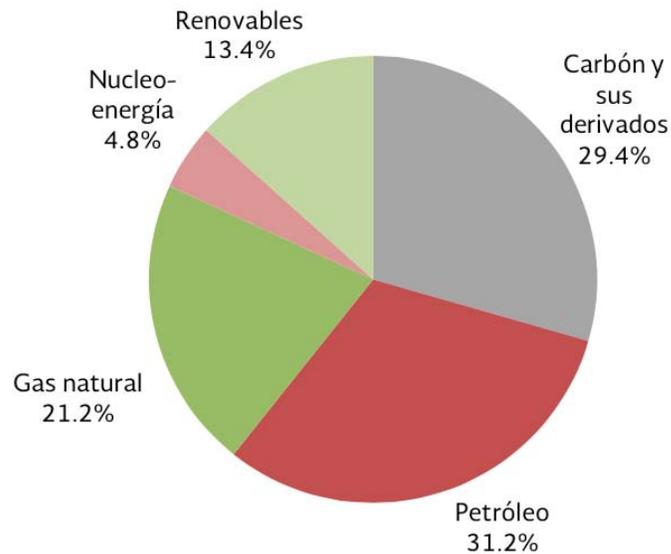


Figura 1.1: Producción mundial de energía primaria [IEA, 2014].

El consumo mundial de energía creció 0.7 % en 2012, al totalizar en 375,926.91 PJ (Figura 1.2). Esto se debió principalmente al incremento en el consumo de electricidad con 2.8 %, al carbón y sus derivados con 0.6 % y a las energías renovables con 0.5 %. Los tipos de energía renovable que tuvieron un incremento en su participación fueron la solar y la eólica, con 849.08 PJ, cifra 15.7 % más alta que la registrada en 2011.

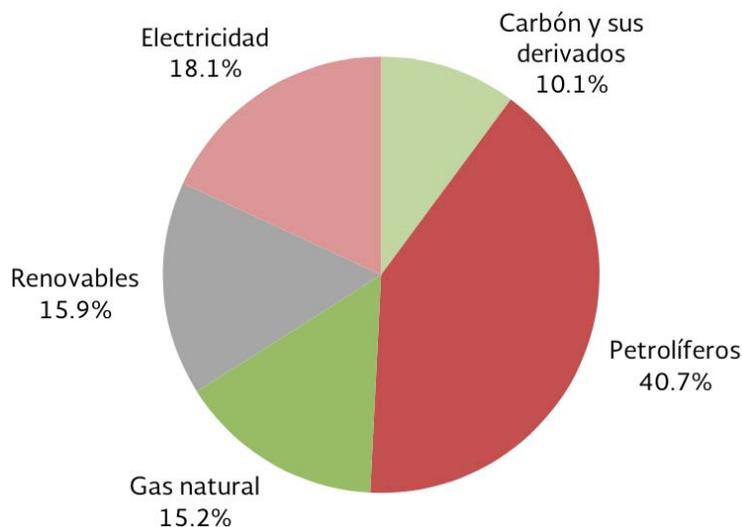


Figura 1.2: Consumo mundial de energía por energético [IEA, 2014].

La producción nacional de petróleo, principal energético primario, disminuyó 2.0 % respecto a 2012, asociado principalmente a la menor producción del principal campo del Activo Cantarell, que se encuentra en declive. Este comportamiento no fue compensado con la mayor producción de los activos Ku-Maloob- Zaap y Abkatún-Pol-Chuc. Al cierre de 2013, se alcanzó una tasa de restitución de reservas de 67.8 %, lo cual implica una caída de 35.0 %, en comparación a 2012. La producción del Activo Integral Ku-Maloob-Zaap representó 34.2 % del total nacional y aumentó 1.0 % en 2013 respecto a 2012. Mientras que la producción del Activo Integral Cantarell fue equivalente a 17.4 % del total, con una caída de 3.2 % respecto al año anterior.

En 2013, el consumo nacional de energía aumentó 2.3 % respecto al año anterior, al totalizar 9,011.83 PJ. Este flujo es el agregado de la energía que se envía a las distintas actividades o procesos para su utilización y principalmente comprende dos divisiones: consumo del sector energético y consumo final total. El consumo final total de energía, definido como la suma del consumo no energético total y el consumo energético total, mostró un incremento de 0.6 % respecto a 2012, totalizando 5,132.32 PJ. Este flujo representa la energía que se destina al mercado interno o a las actividades productivas de la economía nacional.

Los hidrocarburos aportaron el 88.1 % a la producción de energía primaria, 1.1 % menor respecto a lo observado en 2012. La producción de fuentes no fósiles de energía primaria aumentó su participación, pasando de 7.9 % a 8.4 % de 2012 a 2013 [SENER, 2014].

El consumo de combustibles en el sector transporte totalizó 2,262.28 PJ en 2013, 1.6 % menor que en 2012. Durante el 2013 se observó un crecimiento importante en el consumo de energéticos en el transporte aéreo, con un incremento de 4.9 % respecto a 2012. Por otro lado, se observó un decremento de 12 % en los movimientos de carga del transporte marítimo (figura 1.3).

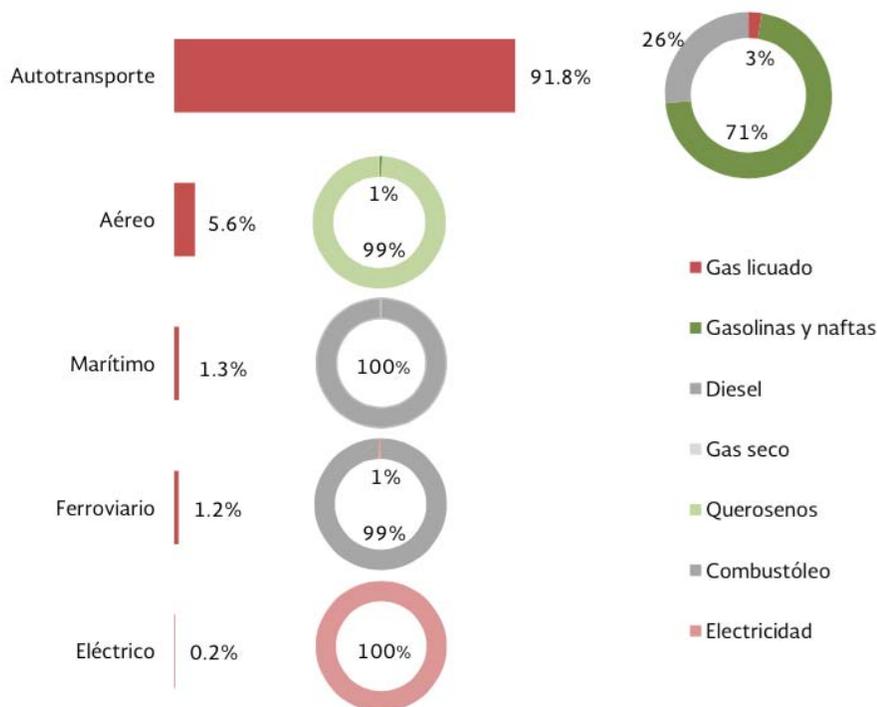


Figura 1.3: Consumo y procedencia de energía del sector transporte [SENER, 2014].

En referencia a los precios de los energéticos, se registraron incrementos, el gas natural 23.6 % en promedio, la gasolina magna 16.5 % y la gasolina premium 16.1 %, el diésel 15.8 % y el gas licuado de petróleo 14.5 %. Por su parte se observó una disminución de los precios de la canasta mexicana de petróleo de 3.3 %, así como del combustóleo y la turbosina con 7.7 % y 3.1 % respectivamente, con respecto al año anterior [SENER, 2014].

Biocombustibles como bioetanol y biogás que son una fuente de energía renovable son candidatos a sustituir el uso del petróleo. El bioetanol es un producto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que se extraen de

material vegetal, su producción tiene cada vez más éxito puesto que su uso promueve una mejor combustión y ayuda a preservar el medio ambiente de las emisiones contaminantes. El biogás a partir de desechos, residuos y cultivos energéticos desempeña un papel importante, ya que es una fuente de energía renovable versátil, que puede ser utilizado para la sustitución de los combustibles fósiles para la generación de potencia y producción de calor, y puede ser potencialmente utilizado también como combustible gaseoso para vehículo. El biogás es rico en metano y puede reemplazar también el gas natural como materia prima para la producción de productos químicos y materiales.

1.1. **Objetivos**

1.1.1. **Objetivo general**

Implementar una metodología para la producción de bioetanol y biogás a partir de mucílago de café.

Objetivos específicos

- Extraer y caracterizar el sustrato utilizado como materia prima.
- Establecer un proceso de fermentación para la producción de bioetanol.
- Establecer un proceso de digestión anaerobia para la producción de biogás.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Combustibles fósiles y su efecto en el medio ambiente

Los combustibles fósiles, como el carbón, el petróleo y el gas natural, son actualmente la fuente de energía primaria más importante en el mundo. Formado a partir de material orgánico en el transcurso de millones de años, los combustibles fósiles han alimentado ciudades y el desarrollo de la economía mundial durante el siglo pasado. Sin embargo, los combustibles fósiles son recursos finitos y también pueden dañar irreparablemente el medio ambiente. Según la Agencia de Protección Ambiental, la quema de combustibles fósiles fue responsable de 79% de las emisiones de gases de efecto invernadero de los Estados Unidos en 2010. Estos gases evitan que una parte del calor del sol deje la atmósfera del planeta, provocando cambios potencialmente catastróficos en el clima de la tierra [EESI, 2015].

Petróleo

El petróleo es la fuente principal de combustible del mundo para el transporte. La mayor parte del petróleo se bombea no solo de depósitos subterráneos, sino que también se puede encontrar en pizarras y arenas bituminosas. Una vez extraído, el petróleo crudo es procesado en las refinerías para producir combustibles; gasolina, gas licuado de petróleo y otros productos no combustibles tales como pesticidas, fertilizantes, productos farmacéuticos y plásticos.

Estados Unidos es líder mundial en el consumo de petróleo con 19.2 millones de barriles por día a partir de 2010. Las importaciones de petróleo netas para los EE.UU. fueron de 9.4 millones de barriles por día. Los países exportadores a los Estados Unidos son Canadá, México, Arabia Saudita, Venezuela y Nigeria. El petróleo plantea importantes problemas ambientales, y la fuerte dependencia del transporte en el mundo hace que sea difícil reducir el consumo. Además de la degradación ambiental causada por derrames de petróleo y la extracción, la combustión de petróleo libera partículas finas que pueden conducir a problemas respiratorios graves, y es una fuente importante de emisiones de gases de efecto invernadero [EESI, 2015].

Carbón

El carbón se utiliza principalmente para generar electricidad. China es el líder mundial en la producción de carbón, responsable de casi el 50 % de la oferta mundial.

La combustión de carbón libera contaminantes al aire como: dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno y trióxido de azufre, que generan lluvia ácida. El proceso de minería también puede ser muy perjudicial para el medio ambiente, a menudo resulta en la destrucción de la vegetación y la capa superior del suelo. Los ríos y arroyos también pueden ser destruidos o contaminados por desechos mineros.

La premisa de carbón limpio, recientemente se ha promovido como una manera de utilizar esta fuente de energía abundante y sin dañar el medio ambiente. La captura y almacenamiento de carbono, donde el carbono se separa del carbón y se inyecta en el subsuelo para su almacenamiento a largo plazo, en teoría, podría mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero de la industria del carbón. Sin embargo, la captura y almacenamiento de carbono aún no se ha demostrado como una forma segura o realista para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero de las centrales eléctricas, los costos ambientales y de salud en la minería [EESI, 2015].

Gas natural

Se utiliza con mayor frecuencia para producir calor o electricidad para edificios o procesos industriales. Rusia sigue siendo el principal proveedor de gas para gran parte de Europa. Sin embargo, el gas natural es transportado en forma licuada por barco para satisfacer una mayor demanda mundial de combustible.

El gas natural se quema de forma más limpia que el carbón y el petróleo, con casi cero emisiones de dióxido de azufre y muchas menos emisiones de óxidos de nitrógeno y partículas. El gas natural libera casi un 30 % menos de dióxido de

carbono que el petróleo y un 43 % menos que el carbón. El gas natural se puede utilizar para producir fertilizantes, pinturas, plásticos, etc. [EESI, 2015].

2.2. Biocombustibles

Los biocombustibles son reconocidos como una importante fuente de energía renovable y sostenible para sustituir a los combustibles fósiles.

En los biocombustibles se hace referencia a los combustibles sólidos, líquidos y gaseosos que se derivan de fuentes renovables, como la biomasa, grasas animales, plantaciones o aceites usados. Además de ser renovable, el ciclo de producción y el consumo de estos reduce la emisión de dióxido de carbono comparado con los combustibles fósiles [Čuček et al., 1999].

Esto se debe a que los biocombustibles se derivan de la biomasa, y liberan gases de escape que contienen menos monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno (NO_x), óxidos de azufre (SO_x), hidrocarburos no quemados y partículas en suspensión [Bucksch and Egebäck, 1999]. El contenido de estos contaminantes es menor para inducir riesgos ambientales y de salud, en comparación con el combustible de petróleo [Egebäck and Westerholm, 1997].

A pesar de las conocidas ventajas de la utilización de los biocombustibles sobre los combustibles fósiles, es importante para evaluar los posibles efectos adversos en la salud humana, el medio ambiente y la propiedad como resultado de la producción de biocombustibles [Naik et al., 2010].

Hasta la fecha, diversos análisis sobre la producción de biocombustibles se han realizado en todo el mundo sobre la base de diferentes aspectos; económico, impacto ambiental, desarrollo social, etc. [Jaeger and Egelkraut, 2011]. Además, extensas investigaciones se están llevando a cabo para mejorar continuamente las tecnologías y herramientas de evaluación sobre producción más limpia de los biocombustibles [Klemeš et al., 2012].

Los biocombustibles se pueden clasificar en dos tipos principales, los biocombustibles líquidos y gaseosos. La purificación del biogás convencional en biocombustible de metano enriquecido llevó al desarrollo del biometano. El biohidrógeno es relativamente un nuevo tipo de biocombustible gaseoso, que es producido por la fermentación anaerobia de los residuos agroindustriales por la acción sinérgica de un consorcio de bacterias metanogénicas, acidogénicas y hidrogenoides. Por otra parte, los biocombustibles líquidos se clasifican en bioetanol y biodiésel. Mientras que el bioetanol ha ganado importancia debido a la crisis actual de la energía mundial, el biodiésel ha ocupado el centro del escenario como un potencial.

Hasta la fecha, los biocombustibles han evolucionado desde la primera hasta

la cuarta generación y se diferencian principalmente en las materias primas y las tecnologías utilizadas para su producción [Liew et al., 2014].

Biocombustibles de primera generación

Estos biocombustibles provienen de fuentes que también se usan como alimentos (maíz, trigo, cebada y caña de azúcar), por lo que su producción puede dar lugar a la competencia de las tierras destinadas al cultivo para alimentos o para biocombustibles; además de un aumento significativo de los precios de los alimentos básicos y alimentos para animales, provocando una crisis alimentaria. Sin embargo, la tecnología de conversión es simple y de bajo costo comparada con los biocombustibles de segunda generación [Ajanovic and Haas, 2010].

Biocombustibles de segunda generación

Los biocombustibles de segunda generación se obtienen a partir de materias primas lignocelulósicas (paja de cereales, bagazo de caña de azúcar, residuos forestales), residuos sólidos municipales y cultivos energéticos [OECD/IEA, 2008]. La materia prima lignocelulósica, no requiere tierras de cultivo adicional, no compite con la producción de alimentos, pero su pretratamiento puede llegar a ser costoso. Se necesita desarrollar mayor investigación tecnológica para que sea rentable la conversión de la biomasa lignocelulósica a biocombustibles [Sims et al., 2010].

Biocombustibles de tercera generación

El CO₂ es utilizado como materia prima para la producción de los biocombustibles de tercera generación, usando principalmente organismos autótrofos como las algas. Las algas no compiten por fuentes de alimentos o cultivos, se puede cultivar en estanques y se puede utilizar agua residual o agua de mar, pero presentan mayor consumo de energía para su cultivo (mezcla, centrifugación, filtración), su producción está limitada por la dependencia a la luz del sol, la biomasa presenta problemas de contaminación y los fotobiorreactores tienen un costo elevado [Singh and Gu, 2010].

Biocombustibles de cuarta generación

Los biocombustibles de cuarta generación se producen a partir de algas y otros microorganismos, los cuales se modifican genéticamente para incrementar el rendimiento, el contenido de lípidos y mejorar su habilidad en la captura de CO₂, estos

se encuentran en las primeras etapas de investigación [Ajanovic and Haas, 2010].

A pesar de que el combustible de petróleo podría apoyar suficientemente la actual demanda mundial, su impacto asociado sobre todo a los problemas del medio ambiente se ha convertido en una preocupación importante. La aparición de los biocombustibles desde entonces ha sido considerado como solución sostenible para sustituir el combustible de petróleo debido a su característica renovable y ambientalmente amigable.

2.3. Residuos agroindustriales

La agroindustria es una actividad económica que combina el proceso productivo agrícola con el industrial para generar alimentos o materias primas semielaboradas destinadas al mercado. Constituye una parte del sector industrial que se dedica a producir y/o transformar, almacenar y comercializar productos provenientes del campo. Entre los productos que se industrializan están: frutas, verduras, raíces, semillas, hojas, tubérculos y vainas; algunos se comercializan en fresco y otros son transformados en néctares, jugos, mermeladas, ensaladas, harinas, aceites, vinos, concentrados en polvo y conservas, por mencionar algunos. A partir de lo anterior, se puede entonces decir que los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social [Saval-Bohórquez, 2012].

Los investigadores han adoptado muchas tecnologías para reducir la contaminación y el costo de los productos de valor agregado mediante el uso de residuos agrícolas. Varios procesos han sido desarrollados para utilizar materias primas renovables para la producción de productos de valor agregado tales como enzimas, ácidos orgánicos, etanol, aminoácidos, proteína unicelular, hongos, etc. En la actualidad, se está prestando mucha atención al potencial biotecnológico de los residuos agroindustriales como el bagazo de yuca, bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha, cascarilla de café y pulpa, pulpa de manzana, oleaginosas, trigo/salvado de arroz, etc. (tabla 2.1), para su uso como materia prima en bioprocesos [John et al., 2007]. Aproximadamente 3.5 mil millones de toneladas de residuos agrícolas son anualmente producidos en el mundo [John, 2009].

Tabla 2.1: Usos de los residuos agroindustriales

Residuos agroindustriales	Usos	Referencia
Pulpa de remolacha azucarera, de papa, y cereales	Producción de metano	[Kang and Wetland, 1993]
Pulpa de uva, residuos de almidón, efluentes y melazas residuales del aceite de oliva	Producción de polisacáridos extracelulares	[Israilides et al., 1994]
Salvado de trigo	Producción de ácido ferúlico	[Faulds et al., 1997]
Bagazo de caña de azúcar	Producción de alimento para el ganado enriquecida con proteínas y enzimas	[Pandey et al., 2000a]
Bagazo de yuca	Producción de ácidos orgánicos, compuestos de sabor y aroma, y setas	[Pandey et al., 2000b]
Cáscara de café	Producción de compuestos aromáticos	[Soares et al., 2000]
Bagazo de yuca, pulpa de manzana, soja, grano de amaranto y aceite de soja	Cultivo de cepas de <i>Rhizopus</i> comestibles	[Christen et al., 2000]
Salvado de trigo, salvado y paja de arroz, aserrín y esencia coco	Producción de endoxilanas	[Poorna and Prema, 2006]
Biomasa (maíz, mazorcas y tallos, residuos de caña de azúcar, trigo o paja de arroz)	Producción de etanol	[Lin and Tanaka, 2006]
Tallo de algodón, paja de arroz, bagazo y residuos de plantas de banano	Extracción de fibras lignocelulósicas	[Habibi et al., 2008]
Caña de azúcar, materiales ricos en almidón y biomasa lignocelulósica	Producción de bioetanol	[Sánchez and Cardona, 2008]

2.3.1. Cereza de café

Las cerezas de café, son el fruto fresco del cafeto cuando siguen en el árbol o acaba de ser recogida pero aún no se han secado o extraído el grano. Después de eso se conocen como granos verdes de café. Las cerezas de café crecen en racimos a lo largo de los tallos de la planta. Alcanza un tamaño aproximado de 1.5 cm. Se requieren unos nueve meses para que los frutos del cafeto maduren y adquieran su color rojo brillante o morado. La cereza de café esta constituida por piel, mucílago, pergamino, película delgada, semilla y tallo (figura 2.1).

El café es una bebida que se hace por infusión de las semillas tostadas y trituradas de la planta de café. Debido a la demanda de esta bebida, en la industria del café se generan grandes cantidades de residuos, que son tóxicos y perjudiciales para los procesos biológicos del medio ambiente. Durante la elaboración del café se obtienen los siguientes residuos: pulpa, mucílago, pergamino, etc. [Pérez-Sariñana et al., 2015a].

La superficie cosechada de café cereza en México en el año 2013 fue de 700,116.79 hectáreas, con una producción de 1,257,982.81 toneladas. A nivel nacional Chiapas es el estado que más café cereza produjo con 499,105.16 ton, Veracruz con 365,333.44 ton, Puebla con 136,864.84 ton y Oaxaca con 129,756.01 ton.

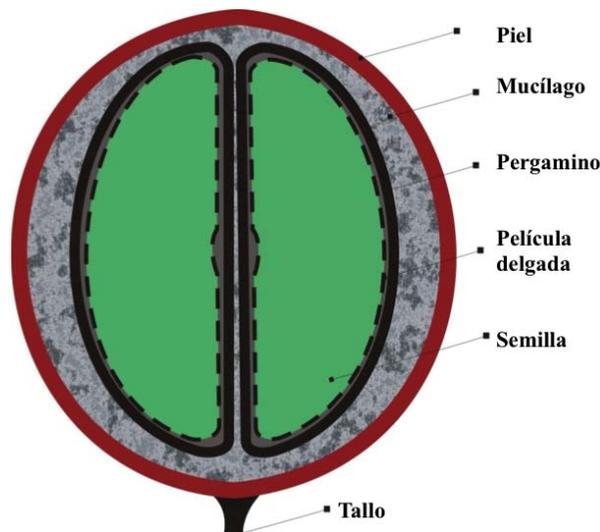


Figura 2.1: Representación del corte longitudinal de la cereza de café.

2.3.2. Mucílago de café

El mucílago de café es un residuo líquido viscoso producido en la industria cafetalera que se desecha sin tratamiento directamente en los cursos de agua, causando serios problemas de contaminación [Pérez-Sariñana et al., 2015b]. Se puede utilizar como sustrato para producir biocombustibles: bioetanol y biogás.

Dentro de los diferentes métodos de extracción, la extracción mecánica de los granos de café (figura 2.2) reduce la cantidad de agua utilizada; en consecuencia, permite recuperar la fracción de mucílago [Pérez-Sariñana et al., 2015c].



Figura 2.2: Extracción mecánica de mucílago de café.

2.4. Conversión de azúcares en etanol por fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica o etílica, es un proceso anaerobio realizado por microorganismos (levaduras, mohos y bacterias), los cuales metabolizan azúcares sim-

ples contenidos en el mosto, convirtiéndose en etanol y dióxido de carbono principalmente.

2.4.1. Bioetanol

El bioetanol es un biocombustible utilizado como un sustituto de la gasolina, producido por procesos simples de fermentación con levaduras que pueden usar azúcares provenientes de materia prima agrícola barata y renovable. Se utilizan una variedad de materias primas comunes ricas en azúcar, incluyendo tallos de caña de azúcar, tubérculos de remolacha azucarera y sorgo dulce. El bioetanol producido a partir de productos agrícolas renovables y baratos, reducen las emisiones de gases de efecto invernadero como CO_2 , NO_3 y SO_4 , disminuyendo la contaminación del medio ambiente. Los residuos y desechos agrícolas tienen varias ventajas, ya que no requieren tierras adicionales, se recogen de grandes extensiones agrícolas y forestales. Algunos de los residuos agroindustriales potencialmente utilizados en la producción de etanol en varios países son mencionados en la tabla 2.1.

2.5. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el cual microorganismos descomponen la materia orgánica, en ausencia de oxígeno. Este proceso genera un gas conocido como biogás entre los cuales el dióxido de carbono y el metano son los más abundantes. El digestato, es el subproducto líquido resultante de la digestión anaerobia y tiene un uso potencial como fertilizante orgánico sustituto de fertilizantes minerales comerciales.

La digestión anaerobia de los cultivos energéticos, residuos y desechos ha ganado importancia ya que permite reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y para facilitar un desarrollo sostenible del abastecimiento energético. La producción de biogás ofrece un soporte versátil a las energías renovables, por ejemplo el metano se puede utilizar para la sustitución de los combustibles fósiles tanto en la generación de calor y electricidad, y como combustible para vehículos. Para la producción de biogás, se aplican diversos tipos de procesos que se pueden clasificar en sistemas de digestión húmedo y seco. Lo que más se aplica, son sistemas de digestión húmedo utilizando digestores de tanque con diferentes tipos de agitador dependiendo del origen de la materia prima.

El biogás se utiliza principalmente en las plantas de cogeneración y plantas de potencia, donde turbinas de microgas y celdas de combustible son alternativas costosas que requieren investigación para reducir los costos y aumentar su factibi-

lidad económica. La transformación de gas y la utilización como combustible para vehículos o inyección en la red de gas natural es de interés creciente debido a que el gas se puede utilizar de una manera más eficiente.

El digestato de la fermentación anaerobia es un valioso fertilizante debido a la mayor disponibilidad de nitrógeno y el mejor efecto de fertilización a corto plazo. El tratamiento anaerobio minimiza la supervivencia de patógenos lo cual es importante para el uso del residuo digerido como fertilizante [Weiland, 2010].

La producción de biogás mediante digestión anaerobia ofrece importantes ventajas sobre otras formas de producción de bioenergía. Ha sido catalogada como una de las tecnologías más eficientes que reduce las emisiones de gases de efecto invernadero en comparación con los combustibles fósiles por la utilización de los recursos disponibles a nivel local [Fehrenbach et al., 2008].

La digestión anaerobia para la producción de metano es un proceso complejo, que se divide en cuatro fases: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (figura 2.3). Los pasos de degradación individuales se llevan a cabo por diferentes consorcios de microorganismos [Angelidaki et al., 1993].

El proceso de digestión anaerobia se desarrolla en las siguientes etapas [Verea-Valladares, 2009]:

- Hidrólisis de biopolímeros (proteínas, carbohidratos y lípidos)
- Fermentación de aminoácidos y azúcares
- Oxidación anaerobia de ácidos grasos de cadena larga y alcoholes
- Oxidación anaerobia de productos intermedios, como ácidos grasos volátiles (AGV)
- Conversión de acetato a metano
- Conversión de hidrógeno a metano

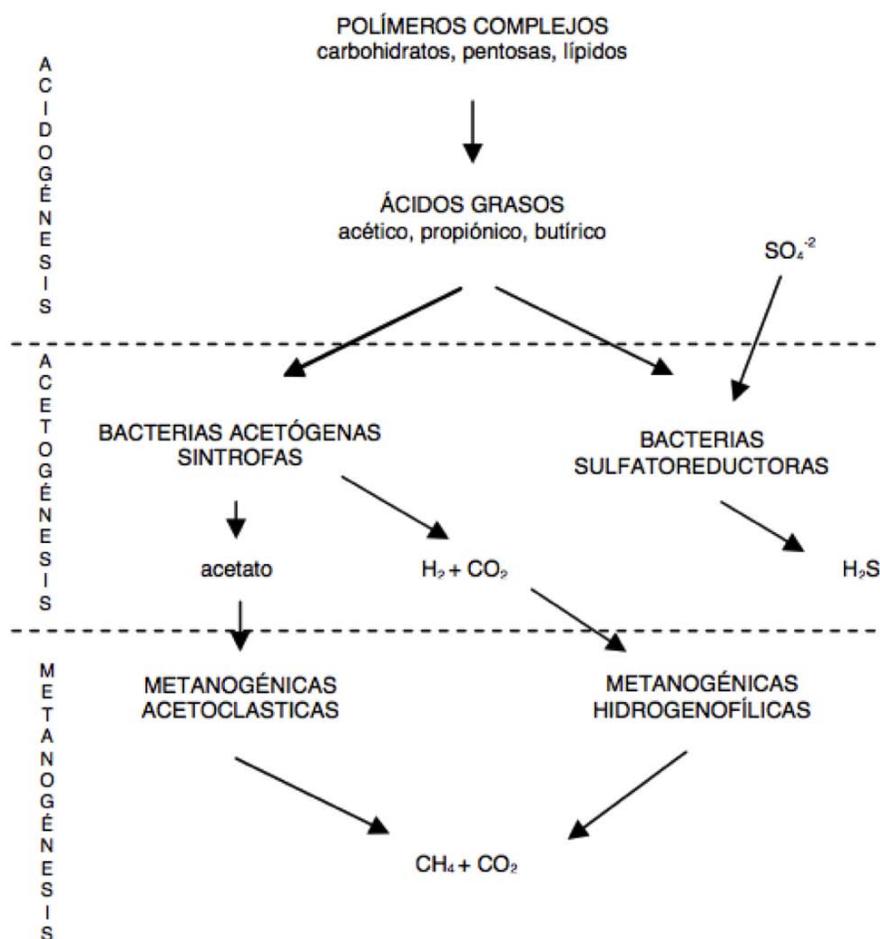


Figura 2.3: Proceso de transformación de la materia orgánica en un proceso de digestión anaerobia [Verea-Valladares, 2009].

Un consorcio complejo de microorganismos participa en la hidrólisis y fermentación de material orgánico, producen cantidades de acetato e hidrógeno, así como también cantidades variables de AGV, como propionato y butirato. Microorganismos excretan enzimas hidrolíticas, por ejemplo, celulasa, celobiasa, xilanasa, amilasa, lipasa, y la proteasa. La mayoría de las bacterias son anaerobias como *Bacteroides*, *Clostridios* y *Bifidobacterias*. Por otra parte, algunas anaerobias facultativas como *Streptococos* y *Enterobacterias* participan. Los ácidos grasos volátiles se convierten en acetato e hidrógeno por bacterias acetogénicas que producen hidrógeno. Bacterias homoacetogénicas típicas son *Acetobacterium woodii* y

Clostridium acetivum. La acumulación de hidrógeno puede inhibir el metabolismo de las bacterias acetogénicas.

El proceso de digestión tiene lugar en condiciones mesofílicas (35-42 °C) o termofílicas (45-60 °C) de temperatura. Es importante mantener una temperatura constante durante el proceso de digestión, los cambios de temperatura o fluctuaciones afectarán a la producción de biogás negativamente.

La formación de metano se lleva a cabo dentro de un intervalo de pH relativamente estrecho, de aproximadamente 6.5 a 8.5 con un intervalo óptimo entre 7.0 y 8.0. El proceso es inhibido si el pH disminuye por debajo de 6.0 o sube por encima de 8.5. El valor del pH aumenta por la acumulación de amoníaco durante la degradación de proteínas, mientras que la acumulación de AGV disminuye el valor del pH. La acumulación AGV no siempre suele resultar en una caída del pH, debido a la capacidad tampón del sustrato. El estiércol animal tiene buffer de alcalinidad que estabiliza el valor de pH en la acumulación de AGV. Este buffer disminuye el ácido acético presente en mayor concentración que otros ácidos grasos (ácido propiónico y butírico) [Wang et al., 1999, Mösche and Jördening, 1999].

2.5.1. Características y usos del biogás

El biogás se produce por medio de digestión anaerobia de residuos orgánicos, incluyendo estiércoles de cultivos microbianos mixtos, se compone principalmente de metano (55-70 % en volumen) y dióxido de carbono (entre 30-45 %) y también puede incluir pequeñas cantidades de sulfuro de hidrógeno (50-2000 ppm), vapor de agua (saturada), oxígeno y diversos hidrocarburos traza [Amigun et al., 2008]. Debido al menor contenido de metano (con un poder calorífico inferior) en comparación con el gas natural, el uso de biogás se limita al uso en los conjuntos de motor-generator y calderas [Chattopadhyay et al., 2009].

2.6. Biorreactores

El biorreactor es un recipiente en el cual se lleva a cabo una reacción catalizada por enzimas o células, libres o inmovilizadas, junto con los mezcladores, equipos de toma de muestra y aparatos de control. El biorreactor es el centro de todo proceso biotecnológico. El diseño y el análisis del comportamiento de un biorreactor dependen del conocimiento de la cinética de las reacciones biológicas y de los balances de energía. En la práctica, esta metodología se hace muy compleja debido a la naturaleza de la catálisis biológica y del caldo de fermentación, los cuales pueden tener propiedades que varían con el tiempo y presentan patrones cinéticos y de flujo

muy complejos.

2.6.1. Sistema discontinuo o batch

El crecimiento de microorganismos en batch se refiere a que las células se cultivan en un recipiente con una concentración inicial, sin que esta sea alterada por nutrientes adicionales o lavado, por lo que el volumen permanece constante y sólo las condiciones ambientales del medio (pH, temperatura, velocidad de agitación, etc.) son controladas por el operador. El proceso finaliza cuando todo el sustrato es consumido por la biomasa. Esta forma de cultivo es simple y se utiliza extensamente tanto en el laboratorio como a escala industrial.

2.6.2. Sistema semicontinuo o fed-batch

En un cultivo semicontinuo o fed-batch, los nutrientes son alimentados al biorreactor de forma continua o discontinua, mientras que no hay efluente en el sistema. Según sea el objetivo de la operación, la adición intermitente del sustrato mejora la productividad de la fermentación manteniendo baja la concentración del sustrato.

2.6.3. Sistema continuo

Un cultivo continuo consiste en alimentar nutrientes y retirar productos continuamente de un biorreactor. Bajo ciertas condiciones el cultivo puede alcanzar un estado estacionario, donde no existe variación con el tiempo del volumen del reactor. De esta manera se puede utilizar para producir sustancias biológicas a condiciones óptimas y para estudios fisiológicos.

Capítulo 3

Método simple para determinar la producción de bioetanol a partir de mucílago de café.

3.1. Resumen

En este trabajo se estableció un método para determinar la concentración de bioetanol empleando un picnómetro verificado con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el picnómetro es una herramienta sencilla usada para determinar la densidad de líquidos con esto obtener información sobre la concentración de etanol. Los resultados mostraron que la concentración de azúcares iniciales afectó la concentración de bioetanol. Una concentración de azúcares iniciales baja de 26.5 g/L genera un rendimiento alto de 45.3% de azúcares para bioetanol y un rendimiento fraccional o relativo del 88.74%. Se utilizaron las pruebas de significación para comparar dos medias experimentales, que revelaron que el método del picnómetro y HPLC proporcionan la misma concentración de bioetanol con varianzas conjuntas de 2.269, 0.242 y 0.112 para tres ensayos diferentes con concentraciones de azúcares iniciales de 26.486 g/L, 49.043 g/L, y 68.535 g/L, respectivamente.

Palabras clave: Picnómetro, HPLC, fermentación, concentración de bioetanol.

3.2. Abstract

This paper established a method to determine bioethanol concentration that uses a pycnometer verified with a high performance liquid chromatography (HPLC) technique; the pycnometer is a simple tool used to determine the density of liquids for getting information about the ethanol concentration. The results showed that the sugar concentration affected the bioethanol concentration. A lower initial sugar concentration of 26.5 g/L generated higher yield of 45.3 % sugar to bioethanol and a fractional or relative yield of 88.74 %. Significance tests were used to compare the two experimental means, revealing that the pycnometer method and HPLC provide the same bioethanol concentration with joint variances of 2.269, 0.242, and 0.112 for 3 different tests with initial sugar concentrations of 26.486 g/L, 49.043 g/L, and 68.535 g/L, respectively.

Keywords: Pycnometer, HPLC, fermentation, bioethanol concentration.

3.3. Introducción

El uso de recursos renovables derivados de la biomasa es beneficioso cuando se trata de desarrollar sistemas sostenibles de energía de diferentes sustratos [Cortright et al., 2002]. La conversión de biomasa en biocombustibles puede reducir la dependencia y vulnerabilidad energética de sistemas de transporte que operan con combustibles derivados del petróleo. El bioetanol ha recibido considerable atención en los últimos años como un oxigenante de combustible o incluso como un combustible líquido sustituto [Vučurović and Razmovski, 2012]. Estudios anteriores hacen referencia a la determinación de etanol o contenido de bioetanol por HPLC [Liebmann et al., 2008] a partir de polisacáridos [Huang et al., 2013]; hojuelas de sorgo y maíz [Chuck-Hernandez et al., 2009], paja de colza [Karagoöz et al., 2013], residuos forestales [Ferreira et al., 2010], y otros. El mucílago de café es un residuo que se desecha directamente en los cursos de agua debido a que no tiene uso alternativo, el cual causa serios problemas de contaminación.

La determinación de la concentración de etanol se puede realizar de varias formas: [Lachenmeier et al., 2010] métodos densimétricos, dicromato de potasio [Breisha, 2010], biosensor potenciométrico [Rotariu et al., 2004], cromatografía de gases (GC) [Wang et al., 2003], electroforesis capilar [Oliver et al., 2014], cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [Huang et al., 2013], espectrometría de Raman [Shih and Smith, 2009], espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) [Liebmann et al., 2008], analizador de bebidas alcohólicas, y análisis de inyección de flujo [Rangel and Tóth, 2000]. Para la espectrofotometría de oxidación de dicro-

mato, los reactivos utilizados son altamente tóxicos y nocivos. Baja estabilidad, reproducibilidad y precisión son las desventajas del método enzimático, biosensor, y potenciometría. Espectrometría de Raman, electroforesis capilar, GC y HPLC requieren un equipo costoso. El método de HPLC tiene una sensibilidad relativamente baja. Espectroscopia NIR y el analizador tienen poca precisión.

El método propuesto para determinar la concentración de bioetanol utilizado en este trabajo fue el método del picnómetro verificado con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), como una herramienta sencilla para determinar la densidad de líquidos para obtener información sobre la concentración de etanol. Este método ayuda a comparar las densidades de dos líquidos, con el peso del picnómetro con cada líquido por separado, comparando sus masas [Pratten, 2009, Piccolo and Bezzo, 2009]. Todo el proceso debe llevarse a cabo a temperatura constante para evitar errores debidos a ligeras variaciones en el volumen. El picnómetro es muy sensible a cambios en la concentración de sales en el agua, por lo que se utiliza para determinar la salinidad del agua y la densidad de líquidos biológicos en los laboratorios, entre otras aplicaciones. El método del picnómetro es una forma alternativa para cuantificar la concentración de etanol en un medio de fermentación cuando falta equipo sofisticado.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Sustrato

El mucílago de café fue extraído mecánicamente y suplementado con sales: 0.02 g/L de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 0.2 g/L de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) [Mishima et al., 2008]

3.4.2. Microorganismo

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* Y-2034 [Wang et al., 2012] se sembró y se mantuvo en medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2% y dextrosa al 2%). Las células se incubaron a 30 °C durante 48 h [Mishima et al., 2008, Musatto et al., 2011a]. La cepa se cultivó en matraces de 250 mL bajo condiciones microaeróbicas y se agitó a 150 rpm a 30 °C durante 24 h para permitir el crecimiento celular en la fase exponencial, las células se resuspendieron en el medio de fermentación.

3.4.3. Proceso de fermentación

El proceso de fermentación se llevó a cabo con tres diferentes concentraciones de azúcares reductores 26.486 g/L, 49.043 g/L, y 68.535 g/L, de acuerdo al diseño experimental (Diseño Expert® Software Software Versión 7.0.0, Stat-Ease, Inc. Minneapolis), por triplicado en matraces de 250 mL, pH de 5 y temperatura de 30 °C [Reddy and Reddy, 2011] con agitación constante a 150 rpm durante 24 h. El volumen utilizado para las fermentaciones fue de 150 mL, con una concentración celular inicial de 1.0×10^6 ufc/mL [Pratten, 2009]. Muestras de cultivo de 1 ml se tomaron a las 24 h y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a 5 °C. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.22 m μ (Millipore, Bedford, MA, USA). Después, se almacenó a -20 °C para su posterior análisis por HPLC.

3.4.4. Métodos analíticos

Durante la fermentación, la concentración de azúcares reductores se determinó por el método de Miller [Miller, 1959]. Recuentos de células viables se midieron con una cámara de Neubauer adaptada a un microscopio óptico [Pereira et al., 2010], el tinte azul de tripano fue utilizado para determinar células viables [Tolnai, 1975]. La concentración de bioetanol se determinó con un picnómetro a través de densidades verificadas con HPLC, utilizando una columna (®Phenomenex, Inc. EE.UU.) eluida a 60 °C con 0.0025 M de H₂SO₄ a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, con un detector de índice de refracción.

3.4.5. Método del picnómetro

Un picnómetro limpio y seco con una capacidad de 50 mL a peso constante se utilizó para cada una de las mediciones. Para preparar el medio usado como referencia, se usó un matraz con medio fermentado con las características descritas anteriormente. Después del proceso de fermentación, el alcohol formado en el medio de fermentación de mucílago de café se evaporó a 78 °C, se enfrió a 20 °C, y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 5 °C. El sobrenadante se utilizó como referencia. Para la curva de calibración (figura 3.1), alcohol etílico (99.9%) se añadió a la referencia para tener concentraciones de etanol de 0 a 50 g/L; los pesos y las densidades determinadas por una balanza analítica y un picnómetro se calcularon a 20 °C. Para determinar la concentración de etanol en la fermentación, se tomó una muestra de medio, y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 5 °C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. La concentración de etanol se calculó a partir de la curva de calibración [AOAC, 1990].

La densidad se calcula usando la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{m_1 - m_0}{v} \quad (3.1)$$

donde ρ es la densidad, m_1 es el picnómetro + masa de la muestra, m_0 es la masa del picnómetro, y v es el volumen del picnómetro.

3.4.6. Comparación de dos medias experimentales

Los resultados de un nuevo método de análisis se pueden contrastar en comparación con los obtenidos mediante un segundo método. En este caso tenemos dos medias muestrales. La hipótesis nula H_0 define que los dos métodos proporcionan el mismo resultado. En otras palabras $H_0: \mu_1 = \mu_2$. Es necesario comprobar si los valores $(y_1 - y_2)$ difieren significativamente de cero. Si las dos muestras tienen desviaciones estándar que no son significativamente diferentes, a continuación, una estimación conjunta de las desviaciones estándar individuales s_1 y s_2 se lleva a cabo [Miller and Miller, 2002]. Por una parte para decidir si las diferencias entre dos muestras \bar{y}_1 y \bar{y}_2 son significativamente diferentes, es decir, para que pueda contrastar la hipótesis nula, $H_0: \mu_1 = \mu_2$, se tiene que calcular el estadístico t :

$$t = \frac{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)}{\sqrt{\frac{1}{n_1^2} + \frac{1}{n_2^2}}} \quad (3.2)$$

donde n son las observaciones y s es calculado a partir de:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (3.3)$$

y t tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

3.5. Resultados y discusiones

3.5.1. Determinación de la concentración de bioetanol

En la figura 3.1 se muestra la curva de calibración con un coeficiente de determinación de 0.997. Esta se utilizó para determinar la concentración de bioetanol en la etapa final de fermentación.

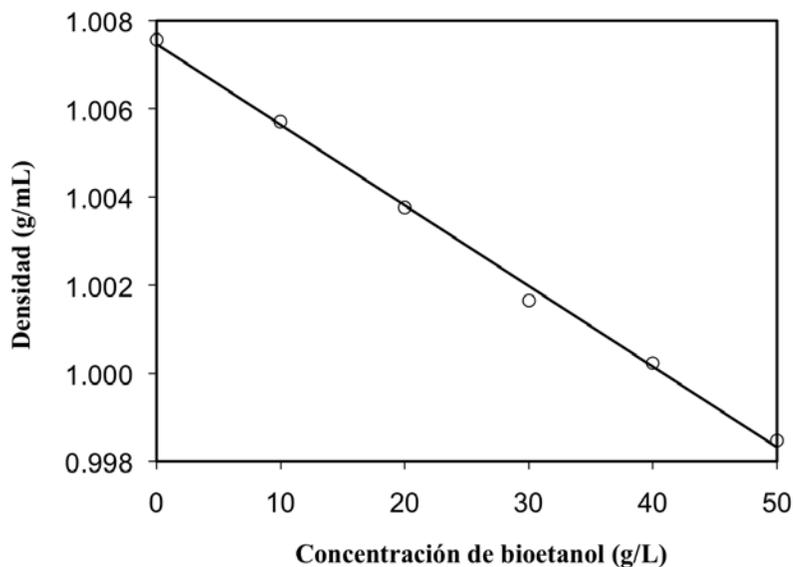


Figura 3.1: Curva de calibración usando mucílago de café como medio de fermentación.

La tabla 3.1 muestra los valores para concentraciones de azúcares iniciales, consumo de azúcares, concentración de bioetanol determinado por el método del picnómetro y HPLC.

Tabla 3.1: Producción de bioetanol a partir de mucílago de café determinado por el método del picnómetro y HPLC

	x_1 g/L	x_2 g/L	y_1 (picnómetro) g/L	y_2 (HPLC) g/L
Ensayo 1	26.486	23.969	12.010 \pm 1.268	11.147 \pm 1.712
Ensayo 2	49.043	45.889	18.243 \pm 0.510	17.570 \pm 0.474
Ensayo 3	68.535	65.051	25.822 \pm 0.609	24.777 \pm 1.775

x_1 : concentración de azúcares reductores, x_2 : consumo de azúcares, y_1 : concentración de bioetanol determinado por el método del picnómetro, y_2 : concentración de bioetanol determinado por HPLC

El consumo de azúcares fue mayor al 90 %, y los rendimientos de conversión de azúcares a bioetanol fueron de 45.345 %, 37.198 % y 37.677 % gramos de bioetanol por gramos de azúcares iniciales. Los rendimientos relativos o fraccionales

fueron de 88.740%, 72.794% y 73.731% con concentraciones de azúcares iniciales de 26.486 g/L, 49.043 g/L, y 68.535 g/L respectivamente. Así que una concentración de azúcares iniciales más baja dio como resultado un rendimiento más alto (figura 3.2).

Los resultados del estudio de un nuevo método de análisis se pueden contrastar en comparación con los obtenidos usando un segundo método como referencia. Hay 4 grados de libertad para todos los casos, de modo que el valor crítico es $t_4=3.36$ ($P = 0.05$). Los valores observados se calcularon como: $t= 1.130, 1.532$ y 1.418 , que fueron menos que el valor crítico, aceptando así la hipótesis nula. Los dos métodos generan siempre el mismo resultado. También se demostró que $P (t > 1,130) = 0.322$, $P (t > 1.532) = 0.200$, y $P (t > 1.418) = 0,229$. Si estas probabilidades son mayores que 0.05, el resultado no es significativo al nivel del 5%. En otras palabras, $x_1 - x_2$ no es diferente de cero. El contraste F para la comparación de las desviaciones estándar se utilizó para determinar si los métodos diferían en su precisión, lo que resulta en $F_{2,2} = 19$. El valor calculado fue inferior a esto (tabla 3.2), así que no había diferencia significativa entre los dos varianzas a un nivel de 5%.

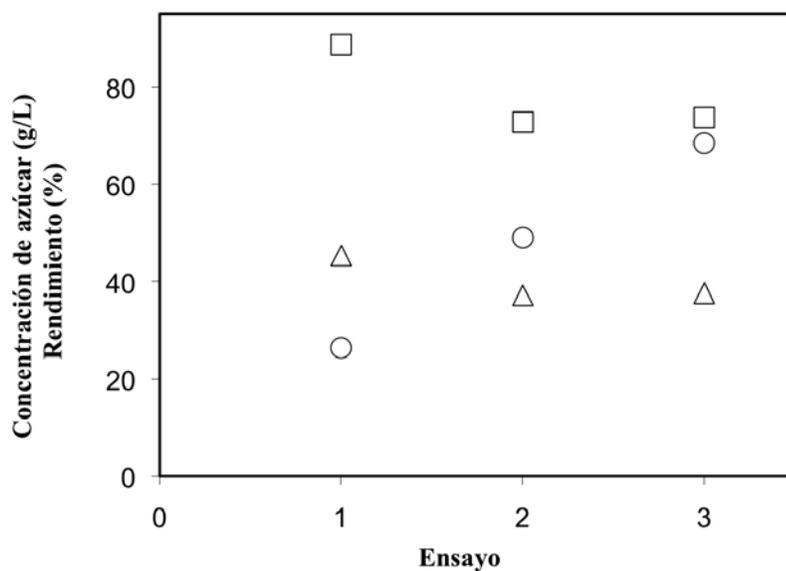


Figura 3.2: Gráfica de puntos de la concentración inicial de azúcares (○), rendimiento (△), y rendimiento fraccional (□) para tres ensayos diferentes usando el método del picnómetro.

Tabla 3.2: Contraste F para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

Concentración de bioetanol	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
	MP	HPLC	MP	HPLC	MP	HPLC
Media	12.010	11.147	18.243	17.570	25.822	24.777
Varianza	1.608	2.931	0.51	0.474	0.609	1.775
Observaciones	3	3	3	3	3	3
Varianzas conjuntas	2.269		0.242		0.112	
Grados de libertad	4		4		4	
Estadístico t	1.130		1.532		1.418	
Valor F	1.823		1.158		8.495	

MP: Método del picnómetro

La ecuación que describe la relación mostrada en la figura 3.3 es la siguiente:

$$y_1 = 7.42e - 02x_1^2 - 2.657e - 01x_1 + 8.16 \quad (3.4)$$

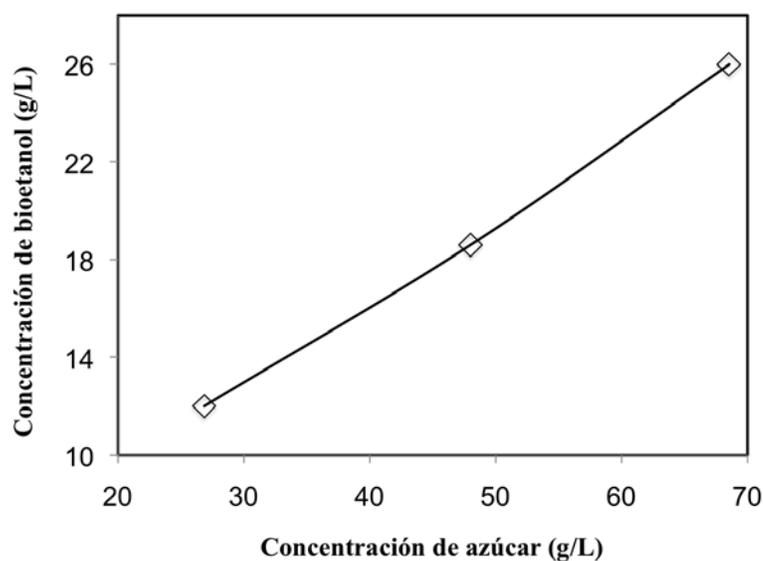


Figura 3.3: Función que describe la ecuación 3.4 para la concentración de bioetanol con respecto a la concentración de azúcares (Design Expert 7.0.0).

El modelo de análisis para el diseño de un factor fue significativo. Sólo había una posibilidad 0.01 % de que un modelo de valor-F tan grande podría ocurrir debido al ruido. Los valores de $P > F$ menos de 0.05 indican que los términos de modelo son significativos. En este caso, x_{12} y x_1 eran los términos del modelo significativos. La adecuación de los modelos fue expresada por el coeficiente de determinación (R^2), que para la determinación de la concentración de bioetanol fue cercano a 1.0.

3.6. Conclusiones

Este estudio se estableció una metodología para determinar la concentración de bioetanol a partir de mucílago de café por el método del picnómetro, verificado con HPLC.

Las concentraciones de azúcares iniciales de 26.486 g/L, 49.043 g/L, y 68.535 g/L generaron rendimientos de 0.453, 0.371, y 0.376 gramos de bioetanol por gramo de azúcares iniciales y rendimientos fraccionales o relativos de 88.740 %, 72.794 %, y 73.731 %, respectivamente.

De acuerdo con las pruebas de significación que comparan dos medias experimentales, el método del picnómetro y HPLC proporcionan la misma concentración de bioetanol (método del picnómetro: 12.010 g/L, 18.242 g/L, y 25.821 g/L; HPLC: 11.146 g/L, 17.570 g/L, y 24.776 g/L) con varianzas conjuntas de 2.269, 0.242, y 0.112 a tres ensayos diferentes con concentraciones iniciales de azúcares de 26.486 g/L, 49.043 g/L, y 68.535 g/L, respectivamente.

El método del picnómetro propuesto aquí es una forma alternativa para cuantificar la concentración de bioetanol en un medio de fermentación cuando hay una falta de equipo sofisticado.

Este capítulo se publicó como artículo en la revista Bioresources NCSU

Pérez-Sariñana Bianca Yadira , Saldaña-Trinidad Sergio, Guerrero-Fajardo Carlos Alberto , Santis-Espinosa Luis Fernando, and Sebastian P. J. (2015). A Simple Method to Determine Bioethanol Production from Coffee Mucilage, Verified by HPLC. *BioResources*, 10(2), 2691–2698. DOI: 10.15376/ biores.10.2.2691-2698

Capítulo 4

Optimización de la producción de bioetanol a partir de mucílago de café

4.1. Resumen

La metodología de superficie de respuesta iniciando con 2^k diseño factorial completo, se aplicó para obtener las condiciones óptimas para la producción de bioetanol a partir de mucílago de café (MC) como sustrato y se usó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034 como inóculo. MC es un residuo agroindustrial compuesto principalmente de azúcares simples.

Las variables iniciales fueron pH, temperatura y concentración inicial de azúcar, se analizó el rendimiento producto/sustrato y la tasa de producción de bioetanol en la fermentación. El empleo de la condición óptima dio como resultado la mayor producción de bioetanol: pH de 5.1, temperatura de 32 °C, concentración inicial de azúcares de 61.8 g/L, producción de bioetanol estimada de 15.02 g/L y experimental de 16.29 ± 0.39 g/L, con un rendimiento de 0.27 y una tasa de producción de 0.34 g/Lh. El glicerol es el subproducto predominante del metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae*. La metodología de superficie de respuesta se empleó con éxito para optimizar la fermentación de mucílago de café, por tanto es una alternativa eficaz para mejorar la producción de bioetanol.

Palabras clave: Fermentación, producción de bioetanol, análisis de superficie de respuesta, optimización.

4.2. Abstract

The response surface methodology starting with 2^k full factorial design was applied to obtain optimum conditions for the bioethanol production from coffee mucilage (CM) as substrate and *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034 was used as inoculum. CM is an agroindustrial residue mainly composed of simple sugars.

Initial variables were pH, temperature and initial concentration of sugar, the product/substrate and the rate of production of bioethanol fermentation performance was analyzed. The use of the optimum condition resulted in higher production of bioethanol: pH 5.1, temperature 32 °C, initial concentration of sugars of 61.8 g/L, production of bioethanol estimated 15.02 g/L and experimental 16.29 ± 0.39 g/L, with 0.27 performance and a production rate of 0.34 g/Lh. Glycerol is the predominant product of fermentative metabolism in *S. cerevisiae*. The response surface methodology was used successfully to optimize the fermentation of coffee mucilage, therefore, it is effective to enhance the bioethanol concentration alternative.

Keywords: Fermentation, bioethanol production, response surface analysis, optimization.

4.3. Introducción

Las emisiones de dióxido de carbono a partir de la quema de combustibles fósiles generan el calentamiento global, debido a esto, es necesario encontrar fuentes de energía alternativas y sustentables [Kapdan and Kargi, 2006]. La producción de bioetanol por fermentación alcohólica ha recibido gran importancia en los últimos años, debido a la alta demanda como combustible y suplemento de gasolina [Yan and Lin, 2009, Balat and Balat, 2009]. Uno de los principales beneficios de este cambio es que el combustible a partir de biomasa es renovable y puede disminuir la dependencia externa del abastecimiento de combustibles fósiles a largo plazo [Mabee and Saddler, 2010].

El café es una de las bebidas más consumidas en todo el mundo y es el segundo producto más comercializado después del petróleo. Debido a la gran demanda de este producto, se generan grandes cantidades de residuos en la industria del café, que son tóxicos y provocan problemas ambientales [Mussatto et al., 2011b].

En México, Chiapas es uno de los mayores estados productores de café. Durante el proceso de extracción del grano de café, se generan residuos como pulpa, mucílago y cascarrilla. Recientemente, se han hecho investigaciones para utilizar estos residuos para la generación de bioenergía [In-Seong et al., 2012, Mussatto et al., 2011a, Mussatto et al., 2010]. La metodología de superficie de respuesta y un diseño factorial completo 2^k , se emplearon para determinar la influencia del pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares en mucílago de café, con el objetivo de optimizar la producción de bioetanol.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Sustrato

El mucílago de café (MC) se obtuvo por extracción mecánica en el municipio de las Rosas, Chiapas, México. La composición fue de 4 kg de café cereza por litro de agua. Se suplementó con 0.5 g/L de sulfato de amonio [De Leon-Rodríguez et al., 2008]. El mucílago de café se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min y se pasteurizó a 65 °C 25 min y se enfrió durante 20 min en hielo [Alvarado-Cuevas et al., 2013]. El MC tuvo un pH de 4.5. La composición química de mucílago de café se muestra en la tabla 4.1.

4.4.2. Cultivo de microorganismo y preparación

Saccharomyces cerevisiae NRRL Y-2034 se obtuvo de la colección de cepas de la Universidad Politécnica de Chiapas. La cepa se mantuvo en agar YPD (1 % p/v extracto de levadura, 2 % p/v de peptona, 2 % p/v de glucosa, y 2 % p/v de agar) en tubos inclinados a 4 °C, cultivos frescos en YPD se utilizaron como inóculos crecidos durante 48 h. La cepa se cultivó en agitación constante a 200 rpm en matraces de 250 mL a temperatura de 28 °C durante 24 h para permitir el crecimiento de células en fase exponencial, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, las células se resuspendieron en el medio de fermentación.

4.4.3. Fermentación

Los experimentos de fermentación discontinua se llevaron a cabo en botellas serológicas de 110 mL con agitación constante a 200 rpm durante 48 h, usando las condiciones iniciales descritas en el diseño experimental (figura 4.3). La densidad celular se ajustó a una densidad óptica (DO 600 η m) de 0.5. Muestras de cultivo de 1 mL fueron tomadas cada 3 h y se centrifugaron a 1,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.22 μ m (Millipore, Bedford, MA,

EE.UU.) se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis. La validación de las condiciones óptimas se evaluó por triplicado.

La producción de bioetanol (PB) es la cantidad de etanol producido por litro de medio de cultivo a las 48 h de fermentación. El rendimiento del proceso ($R_{P/S}$) es la cantidad de etanol producido por azúcar consumido, y la tasa de producción (TP) es la cantidad de etanol producido por litro y por hora. Los parámetros del proceso se obtuvieron de la siguiente manera:

$$R_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad (4.1)$$

$$TP = \frac{PB}{t} \quad (4.2)$$

Donde, $R_{P/S}$ es el rendimiento del proceso, P_f es la concentración final de bioetanol (g/L), P_i es la concentración inicial de bioetanol (g/L), S_f es la concentración final de azúcares (g/L), S_i es la concentración inicial de azúcares (g/L), TP es la tasa de producción (g/Lh), PB es el bioetanol producido (g/L) y t es el tiempo (h).

4.4.4. Diseño experimental

Un diseño factorial completo 2^k con tres niveles generó 20 ensayos, este se realizó para evaluar el efecto del pH (factor X_1), temperatura (factor X_2) y concentración inicial de azúcares (factor X_3) como variables independientes de la fermentación. La ecuación 4.3 se utilizó para construir los gráficos de superficie de respuesta y para predecir el valor óptimo de cada variable dependiente.

$$Y_B = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{33} X_3^2 \quad (4.3)$$

Donde, Y_B es la respuesta predicha correspondiente al bioetanol al final del proceso de fermentación, X_1 , X_2 y X_3 son variables independientes, β_0 es un término independiente, β_1 , β_2 y β_3 son efectos lineales, β_{12} , β_{13} y β_{23} son términos de interacción y β_{11} , β_{22} y β_{33} son coeficientes cuadráticos.

El modelo se evaluó con efecto significativo, buen ajuste y los valores de R^2 . Se obtuvieron los valores óptimos de la solución de la ecuación de regresión. El

análisis de la superficie de respuesta, el ANOVA y las condiciones óptimas se obtuvieron utilizando el software comercial (Statgraphics centurión XVI. Manugistics Inc., Rockville, MD). Los modelos ajustados para PB , $R_{P/S}$ y TP se evaluaron mediante análisis ANOVA. Los efectos significativos en las variables dependientes se determinaron mediante la prueba t con un valor de probabilidad menor que 0.05 (valor de $p < 0,05$).

4.4.5. Análisis

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry usando albúmina de suero bovina (BSA) (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) como estándar. Azúcares, etanol, glicerol y compuestos tóxicos se determinaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), usando una columna Phenomenex a 60 °C con 0.0025 M de H_2SO_4 a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min con un detector de índice de refracción. Los minerales fueron determinados por ICP-OES (plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de emisión óptica).

Otros compuestos de MC se analizaron en un cromatógrafo de gases (CG) 7820A acoplado con un espectrómetro de masas (EM) 5977E (Agilent Technologies) utilizando una columna capilar de silicio-fenil metil 5 % de 30 m de largo, 250 micras de diámetro interior y espesor de 0.25 μm . El detector del EM fue operado bajo ionización por impacto electrónico a 70 eV utilizando el modo de exploración en 45-450 uma. Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masas a los obtenidos en la biblioteca NIST 11 de la base de datos del EM.

4.5. Resultados y discusiones

4.5.1. Caracterización de mucílago de café

Los carbohidratos son los constituyentes más importantes del café cereza, la composición de mucílago de café para la muestra analizada fue de 37.67 g/L de galactosa, 35.65 g/L de glucosa, 1.06 g/L de lactosa y 0.1193 g/L de proteínas.

De acuerdo al análisis de ICP-OES, CM contiene varios minerales. El potasio es el elemento más abundante, seguido de fósforo, calcio, azufre y magnesio (tabla 4.1). En este trabajo se encontraron otros compuestos tales como glicerol, cafeína, ácido acético, ácido láctico, fenol, 2,6 y 3,4-dimetoxi, entre otros. También se encontró siringaldehído en baja concentración producido por hidrólisis de lignina, y nula concentración de hidroximetilfurfural (tabla 4.2).

Tabla 4.1: Composición química de mucílago de café.

Componente	Concentración g/L
Glucosa	35.65
Galactosa	37.67
Lactosa	1.06
Proteína	0.089
Analito	mg/L
Aluminio	0.47
Antimonio	n.d.
Asénico	n.d.
Azufre	30.19
Boro	0.16
Bario	0.02
Berilio	n.d.
Calcio	37.08
Cadmio	n.d.
Cobalto	n.d.
Cobre	2.45
Cromo	n.d.
Estaño	n.d.
Estroncio	0.07
Fierro	0.65
Fósforo	41.55
Litio	0.01
Magnesio	10.05
Manganeso	0.07
Molibdeno	n.d.
Níquel	0.01
Plata	n.d.
Plomo	n.d.
Potasio	239.80
Selenio	n.d.
Silicio	1.58
Sodio	7.18
Talio	n.d.
Vanadio	n.d.
Zinc	0.14

n.d.: no detectado

Tabla 4.2: Concentración de compuestos tóxicos en mucílago de café.

Compuesto tóxico	Concentración mg/L
Hidroximetilfurfural	0.24 ± 0.00
Siringaldehido	610.42 ± 0.65

4.5.2. Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de bioetanol

La tabla 4.3 muestra el resumen de los resultados de PB , $R_{P/S}$ y TP .

Tabla 4.3: Diseño experimental y resumen de variables dependientes para la producción de bioetanol

Ensayo	Variable independiente			Variable dependiente		
	Factor X_1	Factor X_2 °C	Factor X_3 (g/L)	PB (g/L)	$R_{P/S}$	TP (g/Lh)
1	5.05	32.5	50	13.60	0.28	0.28
2	5.7	28	65	14.38	0.23	0.30
3	5.7	28	35	10.93	0.32	0.23
4	5.05	39.36	50	13.99	0.28	0.29
5	5.05	32.5	50	14.16	0.29	0.29
6	4.4	37	65	14.42	0.23	0.30
7	5.05	32.5	72.87	13.67	0.19	0.28
8	6.04	32.5	50	13.47	0.27	0.28
9	5.05	32.5	50	14.10	0.29	0.29
10	5.05	32.5	50	14.93	0.30	0.31
11	4.4	28	35	9.01	0.26	0.19
12	4.4	37	35	9.06	0.27	0.19
13	5.7	37	65	14.20	0.22	0.29
14	5.05	32.5	50	14.35	0.29	0.30
15	5.05	32.5	27.13	8.28	0.31	0.17
16	4.4	28	65	14.92	0.23	0.31
17	4.06	32.5	50	13.06	0.27	0.27
18	5.05	32.5	50	13.76	0.28	0.29
19	5.05	25.64	50	13.06	0.26	0.27
20	5.7	37	35	8.82	0.26	0.18

X_1 : pH, X_2 : temperatura, X_3 : concentración de azúcares, PB : producción de bioetanol, $R_{P/S}$: rendimiento producto/sustrato, TP : tasa de producción.

La PB logra un máximo valor de 14.93 g/L, y un valor mínimo de 8.28 g/L. Para el $R_{P/S}$ los valores variaron en un rango de 0.19 hasta 0.32. Mientras que el TP logra un valor máximo de 0.31 g/Lh, y un valor mínimo de 0.17 g/Lh.

El análisis ANOVA mostró que PB fue afectada de manera significativa por X_3 y X_{32} (tabla 4.4). La ecuación 4.4 describe PB , como una función del pH, temperatura y concentración de azúcares.

$$PB = -54.353 + 9.756X_1 + 1.058X_2 + 0.903X_3 - 0.555X_1^2 - 0.011X_2^2 + 0.006X_3^2 - 0.086X_1X_2 - 0.023X_1X_3 + 0.002X_2X_3 \quad (4.4)$$

Tabla 4.4: Análisis de varianza para el ajuste del modelo para la producción de bioetanol

Fuente	Coefficiente polinomial	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrada	Prueba F	Valor P
Coefficiente	-54.35					
X_1	9.76	0.18	1	0.18	0.53	0.48
X_2	1.06	0.22	1	0.22	0.66	0.43
X_3	0.90	73.82	1	73.82	218.72	0
X_1^2	-0.56	0.59	1	0.59	1.76	0.21
$X_1 X_2$	-0.09	0.51	1	0.51	1.52	0.25
$X_1 X_3$	-0.02	0.41	1	0.41	1.21	0.30
X_2^2	-0.01	0.59	1	0.60	1.76	0.21
$X_2 X_3$	0.002	0.148	1	0.15	0.44	0.52
X_3^2	-0.006	26.17	1	26.16	77.53	0
Error total		3.37	10	0.34		
Total (corr.)		106.02	19			

X_1 : pH, X_2 : temperatura, X_3 : concentración de azúcares, GL: grados de libertad, Prueba F: prueba de fisher, Valor P: valor de distribución de probabilidad. Coeficiente de correlación (R^2): 0.97, coeficiente de correlación ajustado: 0.94, error estándar: 0.58

El valor máximo de PB fue de 14.92 g/L y se obtiene cuando el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares fueron 5.05, 32.5 °C y 50 g/L (figura 4.1), respectivamente.

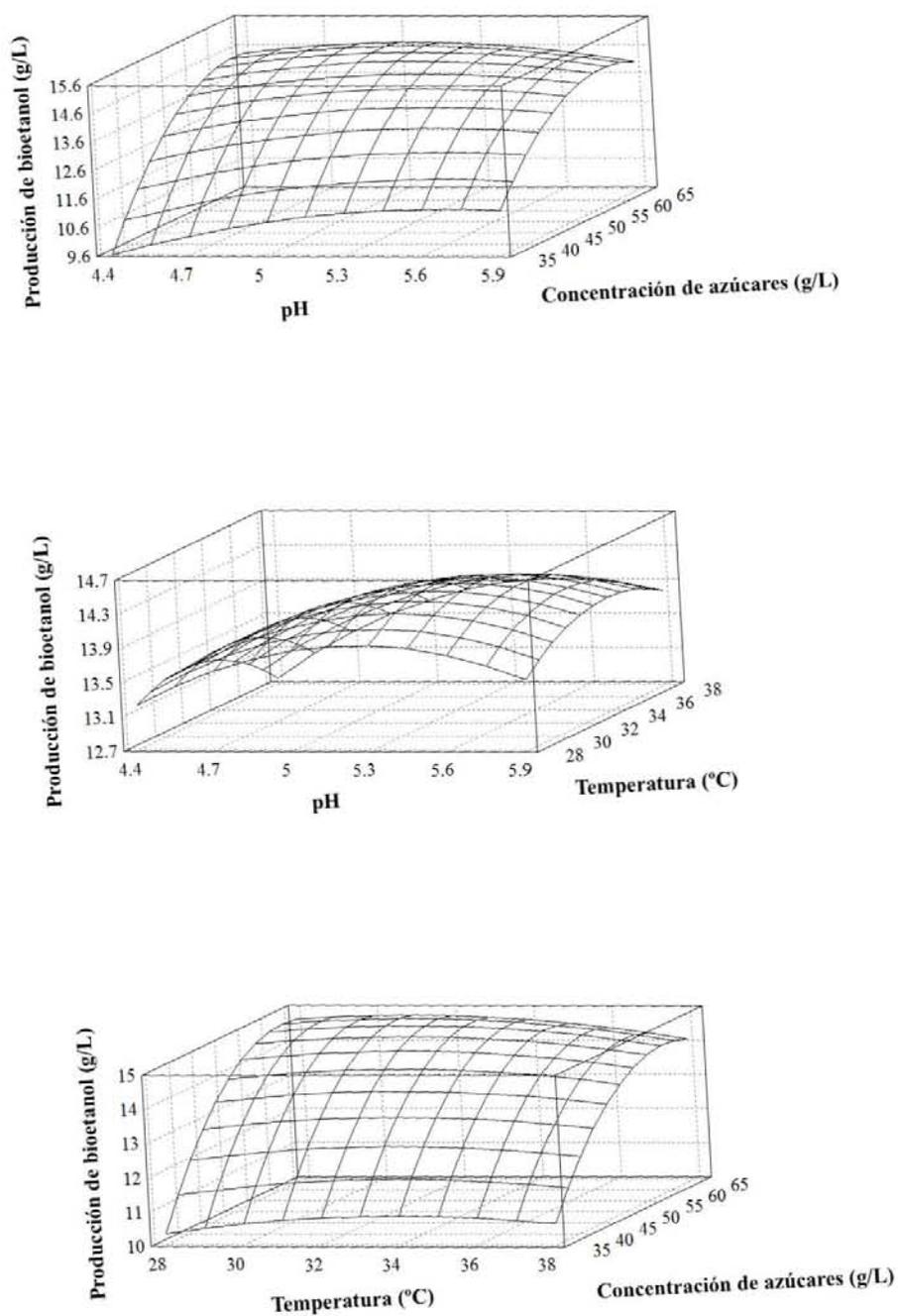


Figura 4.1: Superficies de respuesta descritas por los modelos que representan la dependencia de la producción de bioetanol en el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares.

El análisis ANOVA mostró que $R_{P/S}$ se afectó de manera significativa por X_3 y X_{32} (tabla 4.5). La ecuación que describe $R_{P/S}$ (ecuación 4.5), como una función del pH, temperatura y concentración de azúcares es la siguiente.

$$R_{P/S} = -0.9236 + 0.2396X_1 + 0.0248X_2 + 0.0097X_3 - 0.9113X_1^2 - 0.00024X_2^2 + 0.0001X_3^2 - 0.0027X_1X_2 + 0.00062X_1X_3 + 0.00008X_2X_3 \quad (4.5)$$

Tabla 4.5: Análisis de varianza para el ajuste del modelo para el rendimiento producto/sustrato

Fuente	Coefficiente polinomial	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrada	Prueba F	Valor P
Coefficiente	-0.9236					
X_1	0.24	0.0002	1	0.0002	0.86	0.37
X_2	0.02	0.0001	1	0.0001	0.76	0.40
X_3	0.009	0.008	1	0.008	43.56	0.0001
X_1^2	-0.01	0.0002	1	0.0002	1.34	0.27
$X_1 X_2$	-0.002	0.0005	1	0.0005	2.71	0.13
$X_1 X_3$	-0.0006	0.0003	1	0.0003	1.62	0.23
X_2^2	-0.0002	0.0003	1	0.0003	1.46	0.25
$X_2 X_3$	0.0001	0.0003	1	0.0003	1.38	0.27
X_3^2	-0.0001	0.007	1	0.007	35.56	0.0001
Error total		0.001	10	0.0002		
Total (corr.)		0.02	19			

Coefficiente de correlación (R^2): 0.89, coeficiente de correlación ajustado: 0.81, error estándar: 0.01

El valor máximo de $R_{P/S}$ fue de 0.32 y se obtiene cuando el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares fueron 5.7, 28 °C y 35 g/L (figura 4.2), respectivamente.

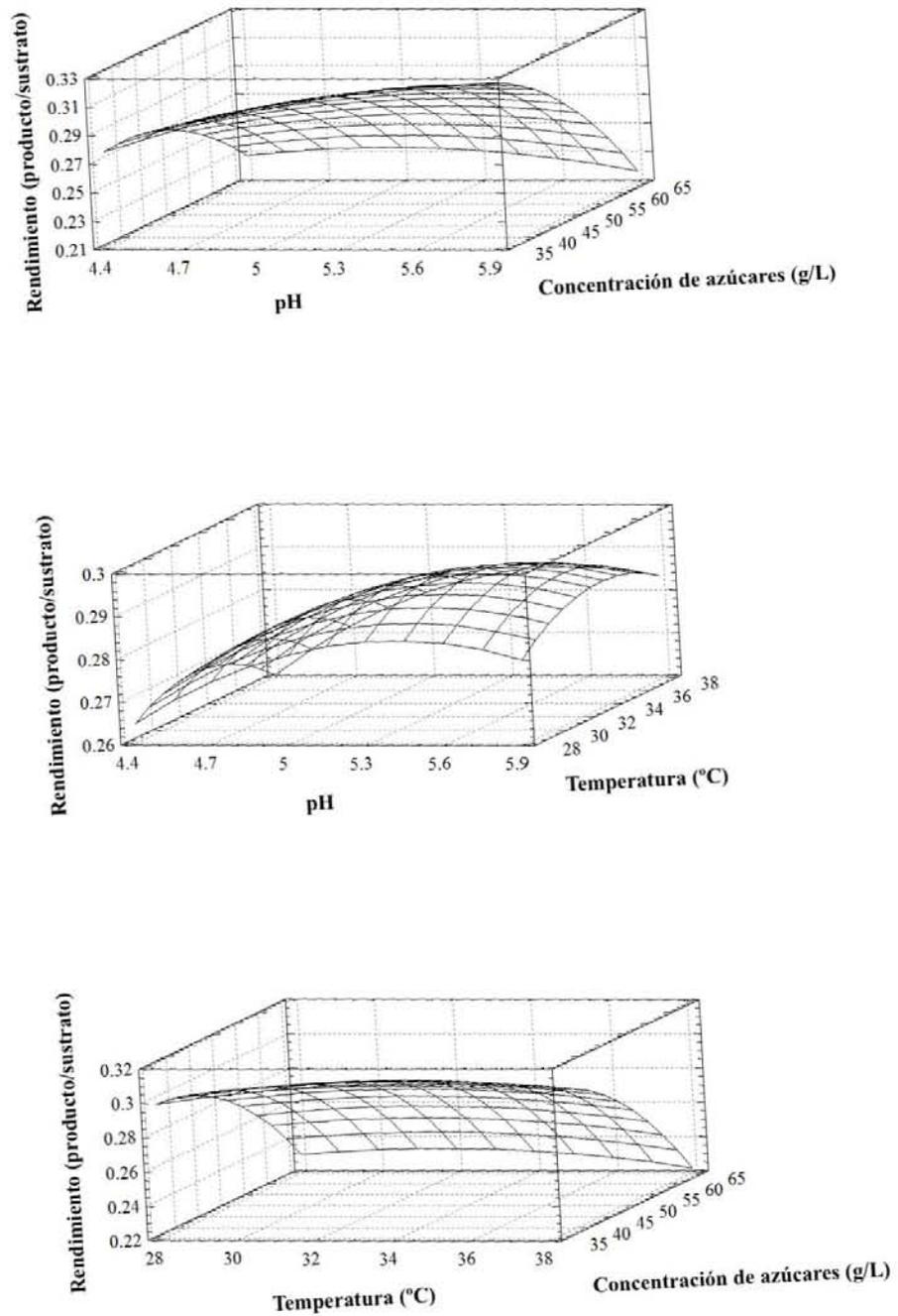


Figura 4.2: Superficies de respuesta descritas por los modelos que representan la dependencia del rendimiento producto/sustrato en el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares.

El análisis ANOVA mostró que TP fue afectado de manera significativa por X_3 y X_{32} (tabla 4.6). La ecuación 4.6 describe TP como una función del pH, temperatura y concentración de azúcar.

$$TP = -1.1915 + 0.2148X_1 + 0.0236X_2 + 0.0190X_3 - 0.0127X_1^2 - 0.00026X_2^2 + 0.00014X_3^2 - 0.0018X_1X_2 + 0.00048X_1X_3 + 0.00004X_2X_3 \quad (4.6)$$

Tabla 4.6: Análisis de varianza para el ajuste del modelo para la tasa de producción

Fuente	Coefficiente polinomial	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrada	Prueba F	Valor P
Coefficiente	-1.19					
X_1	0.21	7.75E-05	1	7.74E-05	0.46	0.51
X_2	0.02	9.61E-05	1	9.61E-05	0.57	0.47
X_3	0.02	0.03	1	0.03	190.84	0
X_1^2	-0.01	0.0003	1	0.0003	1.85	0.20
$X_1 X_2$	-0.001	0.0002	1	0.0002	1.33	0.28
$X_1 X_3$	-0.0004	1.76E-05	1	0.0002	1.05	0.33
X_2^2	-0.0002	0.0003	1	0.0003	1.85	0.20
$X_2 X_3$	4.18E-05	6E-05	1	6.38E-05	0.38	0.55
X_3^2	-0.0002	0.01	1	0.01	69.73	0
Error total		0.002	10	0.0002		
Total (corr.)		0.05	19			

Coefficiente de correlación (R^2): 0.96, coeficiente de correlación ajustado: 0.93, error estándar: 0.01

El valor máximo de TP fue de 0.31 g/Lh y se obtiene cuando el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcar fueron 5.05, 32.5 °C y 50 g/L (figura 4.3), respectivamente. La misma condición para PB , ya que TP es una función del tiempo, tal como se define en la ecuación 4.2.

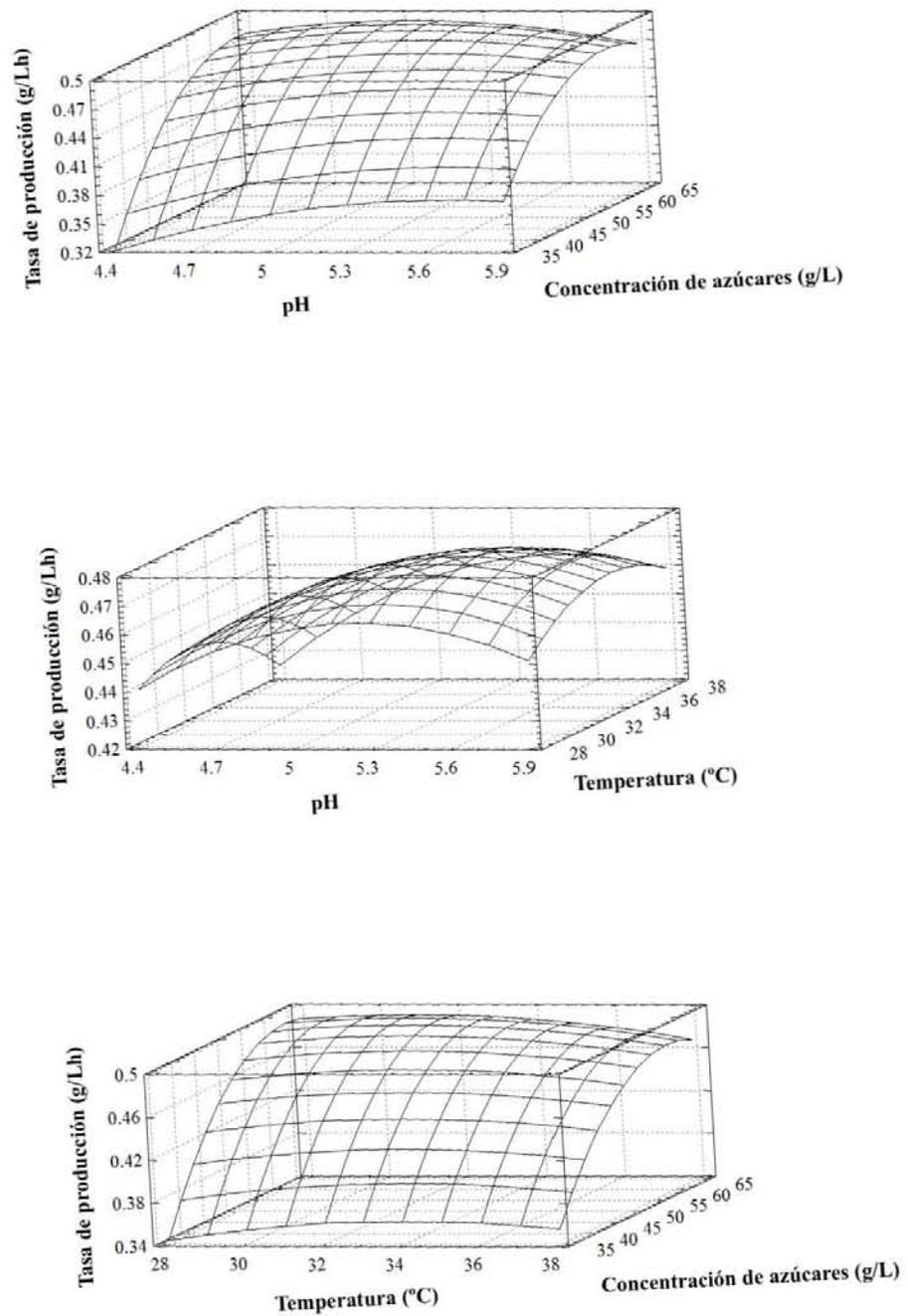


Figura 4.3: Superficies de respuesta descritas por los modelos que representan la dependencia de la tasa de producción en el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcar.

Criterios como el rendimiento, tasa de producción y producción de bioetanol se utilizan para evaluar las fermentaciones. En este trabajo la optimización simultánea no se realizó, ya que una alta producción de bioetanol y alto rendimiento no son compatibles, porque para obtener una alta producción de bioetanol se requiere una alta concentración de sustrato, que causa inhibición al microorganismo dando lugar a una tasa de producción baja. [Balusu et al., 2005].

En esta investigación la condición óptima para la producción de bioetanol a partir de mucílago de café se estimó como pH de 5.1, temperatura de 32 °C, concentración inicial de azúcar de 61.8 g/L y *PB* de 15.02 g/L. Bajo esta condición se produjo experimentalmente 16.29 ± 0.39 g/L de bioetanol.

En la figura 4.4 se muestra el comportamiento cinético del cultivo discontinuo para la condición óptima. También se encontró baja concentración de glicerol. La mayoría de los estudios relativos a la formación de glicerol se han llevado a cabo utilizando la levadura, *S. cerevisiae* [Mohammad et al., 2002].

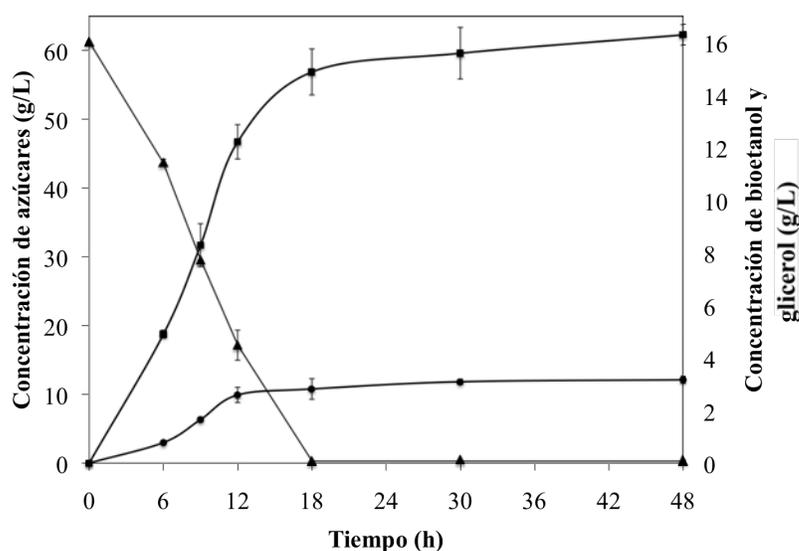


Figura 4.4: Comportamiento cinético del cultivo discontinuo para la condición óptima (concentración de bioetanol (■), concentración de glicerol (●) y concentración de azúcares (▲)).

El glicerol es un metabolito bien conocido, formado por muchos microorganismos incluyendo bacterias, levaduras, mohos y algas [Vijaikishore and Karanth, 1986, Rehm and Redd, 2008, Spencer, 1968]. El glicerol es un subproducto produ-

cido del metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae* por reacciones anabólicas en condiciones anaerobias [Lagunas and Gancedo, 1973, Oura, 1977, Taherzadeh et al., 1996, Albers et al., 1998]. En condiciones óptimas en este proyecto se produjo 3.16 ± 0.13 g/L.

4.6. Conclusiones

El mucílago de café es un residuo agroindustrial compuesto principalmente por galactosa y glucosa.

La metodología de superficie de respuesta se empleó con éxito, para optimizar la fermentación de mucílago de café y producir bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034.

El glicerol es un subproducto del metabolismo fermentativo produciendo 3.16 ± 0.13 g/L.

Las condiciones óptimas para la producción de bioetanol se establecieron como: pH de 5.1, temperatura de 32 °C, concentración inicial de azúcar de 61.8 g/L y una producción de bioetanol estimada de 15.02 g/L. En esta condición, la producción de bioetanol experimental fue de 16.29 ± 0.39 g/L, un rendimiento de 0.27 y una tasa de producción de 0.34 g/Lh.

Este capítulo fue publicado como artículo en la revista Bioresources NCSU

Pérez-Sariñana Bianca Yadira, De León-Rodríguez Antonio, Saldaña-Trinidad Sergio, and Sebastian P. J. (2015). Optimization of Bioethanol Production From Coffee Mucilage. BioResources 10(3), 4326-4338. DOI: 10.15376/biores.10.3.4326-4338

Capítulo 5

Optimización de la producción de biogás a partir de mucílago de café

5.1. Resumen

El aumento de la demanda mundial de energía promueve el uso de cultivos energéticos y residuos agroindustriales para la producción de biogás o metano. En la agroindustria, los residuos del café como mucílago es una fuente importante de carbohidratos, principalmente de galactosa y glucosa, sustratos necesarios en la digestión anaerobia. El objetivo de este estudio, fue optimizar el proceso de digestión anaerobia de mucílago de café para la producción de biogás (metano).

Un diseño experimental factorial completo 2^3 con puntos centrales fue establecido, generando 20 ensayos, teniendo en cuenta factores como el pH, la temperatura y la concentración de azúcares iniciales (suma de glucosa y galactosa). Los resultados de la caracterización de mucílago de café indicaron la presencia de glucosa y galactosa en concentraciones de 35.65 g/L y 37.67 g / L, respectivamente. La condición óptima para la producción de biogás a partir de mucílago de café estimada por el software estadístico fue pH de 8.2, temperatura de 37 °C y concentración de azúcar de 27 g/L. En este proyecto de investigación, se usó la condición óptima experimental para la producción de biogás a partir de mucílago de café como: pH de 8.2, temperatura de 37 °C, concentración de azúcar de 25.5 g/L y 313 mL de

biogás, este último superó la condición óptima estimada.

Palabras clave: Mucílago de café, digestión anaerobia, producción de biogás, metano, optimización.

5.2. Abstract

The increase in global energy demand promotes the use of energy crops and agro-industrial residues for biogas or methane production. In agribusiness, the coffee waste as mucilage is a major source of carbohydrates mainly galactose and glucose, necessary substrates in anaerobic digestion. The aim of this study was to produce and optimize process of anaerobic digestion from coffee mucilage to methane production. Results

An experimental design 23 full factorial with center points was set, generating 20 treatments, considering factors such as pH, temperature and initial sugars concentration (sum of glucose and galactose). The characterization results of coffee mucilage indicated the presence of glucose and galactose in concentrations of 35.65 g/L and 37.67 g/L, respectively. Optimal conditions for the methane production from coffee mucilage estimated by statistical software were pH 8.2, temperature 37 °C and sugar concentration of 27 g/L. Through this research project, the experimental optimum conditions for the production of methane from coffee mucilage were used, which were pH 8.2, temperature 37 °C, sugar concentration of 25.5 g/L and 313 mL biogas, this last exceeded the estimated optimal condition.

Keywords: Coffee mucilage, anaerobic digestion, biogas production, methane, optimization.

5.3. Introducción

El biogás es considerado como energía renovable producido a partir de biomasa, que se ha convertido en un biocombustible importante debido a los beneficios ambientales que ofrece [Appels et al., 2008]. Los sustratos utilizados para la digestión anaerobia son los cultivos energéticos, residuos orgánicos y estiércol de animales [Angelidaki et al., 2009].

Después del petróleo, el segundo producto más comercializado es el café, debido a la demanda de esta bebida, para su extracción se obtienen grandes cantidades de residuos. Estos residuos son ricos en azúcares y compuestos con propiedades funcionales que no reciben el tratamiento adecuado de manera que se conviertan

en fuentes de contaminación para ríos y cauces, principalmente [Avallone et al., 2000].

La cereza del café contiene pulpa, mucílago, café verde, cascarilla, con 40.6 %, 21.5 %, 20 % y 17.9 % respectivamente. En el caso de la fracción de mucílago de café, está unido al grano en el procesamiento húmedo después del despulpado sin degradación enzimática [Chanakya and De Alwis, 2004]. La extracción mecánica permite la separación y la concentración de esta fracción, para ser utilizado como un sustrato en la digestión anaerobia. El mucílago de café se compone de 37.67 g/L de galactosa, 35.65 g/L de glucosa, 1.06 g/L de lactosa y 0.1193 g/L de proteínas [Pérez-Sariñana et al., 2015a].

La superficie cosechada de cereza de café en México en 2014 fue 699,307.33 hectáreas, con una producción 1,166,025.82 toneladas. Chiapas fue el estado que mas cereza de café produjo con 402,099.78 toneladas, si consideramos que el 21.5 % es mucílago se tendrían 86451.45 toneladas [SIAP, 2014].

La metodología de superficie de respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas para el diseño de experimentos utilizados para modelar y analizar los problemas, en el que una variable de interés es influenciado por otras. El objetivo es optimizar la variable de interés, esto se logra mediante la determinación de las condiciones óptimas del sistema. Los dos diseños más usados en RSM son el diseño compuesto central (CCD) y el diseño de Box-Behnken (BBD). El CCD es ideal para series de experimentos, provee una cantidad de información para demostrar la falta de ajuste [Myers, 1971, Montgomery, 1996].

5.4. **Materiales y métodos**

5.4.1. **Sustrato**

El mucílago de café se utilizó como sustrato, que se obtiene por extracción mecánica de la cereza de café en el estado de Chiapas, México. Para la extracción se utiliza una despulpadora con desmucilagador, el mucílago extraído se almacena en botellas a -20 °C para evitar la degradación debido al contenido de azúcar que contiene. Las concentraciones de azúcares en el diseño experimental fueron 5 (72, 65, 50, 35 y 27 g/L) a partir de la concentración mas alta de 72 g/L, se diluyó con agua a las concentraciones deseadas, medida con HPLC. Una vez que estas concentraciones se alcanzaron, se pasteuriza a 65 °C durante 30 min y 20 min en hielo. Posteriormente el volumen requerido se transfirió a cada botella serológica estéril.

5.4.2. Inóculo

Para los ensayos se utilizó como inóculo lodo metanogénico de un reactor anaeróbico industrial de tratamiento de aguas residuales generadas durante el procesamiento de una fábrica de confitería ubicada en la zona industrial de la ciudad de San Luis Potosí, México [Kaosol and Sohgrathok, 2013]. El inóculo se almacenó a 4 °C antes de usarlo.

5.4.3. Digestión anaerobia discontinua

La digestión anaerobia discontinua se llevó a cabo en botellas serológicas de 110 mL con un volumen de trabajo de 100 mL, se añadió 98 mL de mucilago de café, 1 mL de inóculo y 1 mL de solución tampón para controlar el pH, compuesto de los siguientes minerales (mg/L): Na₂HPO₄, 11.900; NH₄H₂PO₄, 4500; K₂HPO₄, 125; MgCl₂·6H₂O, 100; ZnCl₂, 75; FeSO₄·6H₂O, 25; MnSO₄·7H₂O, 15; Na₂MoO₄·2H₂O, 12,5; CuSO₄ · 5H₂O, 5; CoCl₂ · 8H₂O, 3 [Davila-Vazquez et al., 2008].

Este proceso se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones del diseño experimental, los ensayos se agitaron a 200 rpm durante 108 h y se tomaron muestras de cultivo cada 12 h.

5.4.4. Diseño experimental

Un diseño factorial completo 2^k con cinco niveles generó 20 ensayos, realizados para evaluar el efecto del pH (factor X₁), la temperatura (factor X₂) y la concentración inicial de azúcar (factor X₃) como variables independientes. La ecuación 5.1 se utilizó para construir los gráficos de superficie de respuesta para el modelo y para predecir el valor óptimo:

$$Y_{BG} = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{11} X_1^2 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \alpha_{22} X_2^2 + \alpha_{23} X_2 X_3 + \alpha_{33} X_3^2 \quad (5.1)$$

Donde, Y_{BG} es la respuesta predicha correspondiente a la producción de biogás al final del proceso de fermentación, X₁, X₂ y X₃ son variables independientes, α₀ es un término independiente, α₁, α₂ y α₃ son efectos lineales, α₁₂, α₁₃ y α₂₃ son términos de interacción y α₁₁, α₂₂ y α₃₃ son coeficientes cuadráticos. El modelo se evaluó con buen ajuste, significancia y determinación de coeficientes.

El valor óptimo se obtuvo resolviendo la ecuación de regresión. El ANOVA, la superficie de respuesta y las condiciones óptimas se obtuvieron utilizando el software comercial (Statgraphics Centurión XVI.II Manugistics Inc., Rockville, MD). Los efectos significativos en las variables dependientes se determinaron mediante la prueba *t* con un valor de probabilidad menor que 0.05 (valor de $p < 0.05$).

5.4.5. Análisis

La determinación de biogás producido (metano) se realizó por el método de volumen de desplazamiento de agua, con una trampa de NaOH al 2N [Raposo et al., 2006]. Se tomaron muestras de medio de digestión anaerobia para determinar el consumo de azúcares y la concentración de ácidos grasos volátiles por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando una columna Phenomenex a 60 °C con H₂SO₄ 0.0025 M a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min con un detector de índice de refracción [Moreno and Polo, 2003].

5.5. Resultados y discusiones

5.5.1. Caracterización del sustrato

Los principales compuestos observados en el mucílago de café son monosacáridos tales como galactosa y glucosa, así como lactosa como disacárido, proteínas y ácido acético, el pH inicial de mucílago de café fue 4.5. La formación de ácido acético puede ser debido a la manipulación en el transporte y almacenamiento de mucílago de café, ya que este se mantuvo a temperaturas de congelación, con el fin de limitar la fermentación causada por el contenido de microorganismos capaces de consumir los azúcares presentes [Jackels and Jackels, 2005].

5.5.2. Producción de biogás

Tabla 5.1: Diseño experimental y resumen de variables dependientes para la producción de biogás

Ensayo	Variable independiente			Variable dependiente		
	Factor X_1	Factor X_2 °C	Factor X_3 (g/L)	PBG (g/L)	$R_{BG P/S}$	TP_{BG} (g/Lh)
1	6	37	50	188	0.0212	0.0547
2	6	37	50	180	0.0203	0.0523
3	6	37	50	173	0.0195	0.0503
4	6	37	50	188	0.0212	0.0547
5	6	37	50	162	0.0183	0.0471
6	6	37	50	171	0.0193	0.0497
7	6	44.62	50	90	0.0101	0.0261
8	6	37	72.87	140	0.0108	0.0407
9	3.7	37	50	5	0.0005	0.0014
10	6	37	27.13	272	0.0569	0.0791
11	8.29	37	50	269	0.0304	0.0782
12	6	29.38	50	45	0.0050	0.0130
13	7.5	32	65	178	0.0154	0.0517
14	7.5	32	35	203	0.0328	0.0590
15	4.5	42	65	6	0.0005	0.0017
16	4.5	32	35	78	0.0126	0.0226
17	4.5	42	35	6	0.0009	0.0017
18	7.5	42	65	172	0.0149	0.0500
19	4.5	32	65	6	0.0005	0.0017
20	7.5	42	35	168	0.0271	0.0488

X_1 : pH, X_2 : temperatura, X_3 : concentración de azúcares, PBG : producción de biogás, $R_{BG P/S}$: rendimiento producto/sustrato, TP_{BG} : tasa de producción.

Los ensayos con valores de pH cercanos a 7, mostraron una producción de biogás (PBG) por encima de 100 mL, similar a la descrita por Charles et al., que indica que los valores entre 6.8 a 8.2 son óptimos para la producción de biogás de la digestión [Charles et al., 2009]. Appels et al. observaron que los valores óptimos son cerca de 6.5 a 7.5 [Appels et al., 2008]. Bagi et al. indicaron que el pH óptimo está

por arriba de 7, y se alcanza mediante el ajuste de las soluciones tampón durante el sistema de digestión [Bagi et al., 2007].

Para valores de temperatura cercanos a 38-42 °C, se obtuvo una *PBG* promedio de 170 mL, estos parámetros son similares a las mencionadas en Alzate et al., Achou et al. y Ward et al. [Alzate-Gaviria et al., 2007, Achou et al., 2012, Ward et al., 2008]. Los efectos presentados en *PBG* a temperaturas por debajo o por encima de 38-42 °C, muestra los valores de producción más bajos, como menciona Cho et al. [Cho and Park, 1995].

Los ensayos con pH de 3.7, temperatura de 37 °C y concentración de azúcar de 50 g/L, presentaron una producción de biogás nula, esto tiene una similitud con los reportados por Chen y Hashimoto, Donoso et al., Eskicioglu y Ghorbani, González y García [Chen and Hashimoto, 1996, Donoso et al., 2009, Eskicioglu and Ghorbani, 2011, González and García, 2009]. Esta condición indican que a pH bajo favorece el desarrollo de inhibidores en el sistema como: ácidos grasos volátiles, amoníaco y CO₂. Las temperaturas superiores a 44 °C, generan condiciones termófilas [Budi-yono et al., 2009], inhibiendo el crecimiento de bacterias metanogénicas.

El rendimiento producto/sustrato ($R_{BG\ P/S}$) de cada ensayo experimental se evaluó en moles de CH₄ con respecto a mol de azúcar (mol CH₄/mol A). También se analizó la tasa de producción expresada en CH₄ mmol por hora (mmol CH₄/h). Ambos se muestran en la tabla 5.1. El mayor $R_{BG\ P/S}$ fue 0.0569 mol CH₄/mol A, que corresponde a las condiciones de ensayo de pH 6, temperatura de 37 °C, y concentración de azúcar de 27 g/L, el rendimiento más bajo fue de 0.0005 mol CH₄/mol A, estos tres ensayos tenían condiciones de pH 3.7, 4.5 y 4.5, temperaturas de 37 °C, 32 °C y 42 °C, y concentraciones de azúcar de 50 g/L, 65 g/L y 65 g/L, respectivamente (tabla 5.1).

5.5.3. Análisis de superficie de respuesta y optimización

El análisis de varianza mostró un efecto estadísticamente significativo en el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares por tener valores de 0.0134, 0.0004 y 0.0037, respectivamente (valor de probabilidad < 0.05), con un nivel de confianza del 95 %. El término cuadrático de X_1^2 presenta el mayor efecto, seguido de los términos lineales X_3 y X_2 . En la ecuación 5.2, X_1 , X_2 y X_3 son variables codificadas de pH, temperatura y concentración inicial de azúcares, respectivamente. El coeficiente de regresión fue de 0.96, con un intervalo de confianza favorable.

$$\begin{aligned}
 PBG = & -15.6146 + 0.8176X_1 + 0.8260X_2 + 0.0691X_3 - 0.0583X_1^2 \\
 & - 0.0120X_2^2 + 0.0001X_3^2 + 0.0029X_1X_2 + 0.0016X_1X_3 + 0.0009X_2X_3
 \end{aligned}
 \tag{5.2}$$

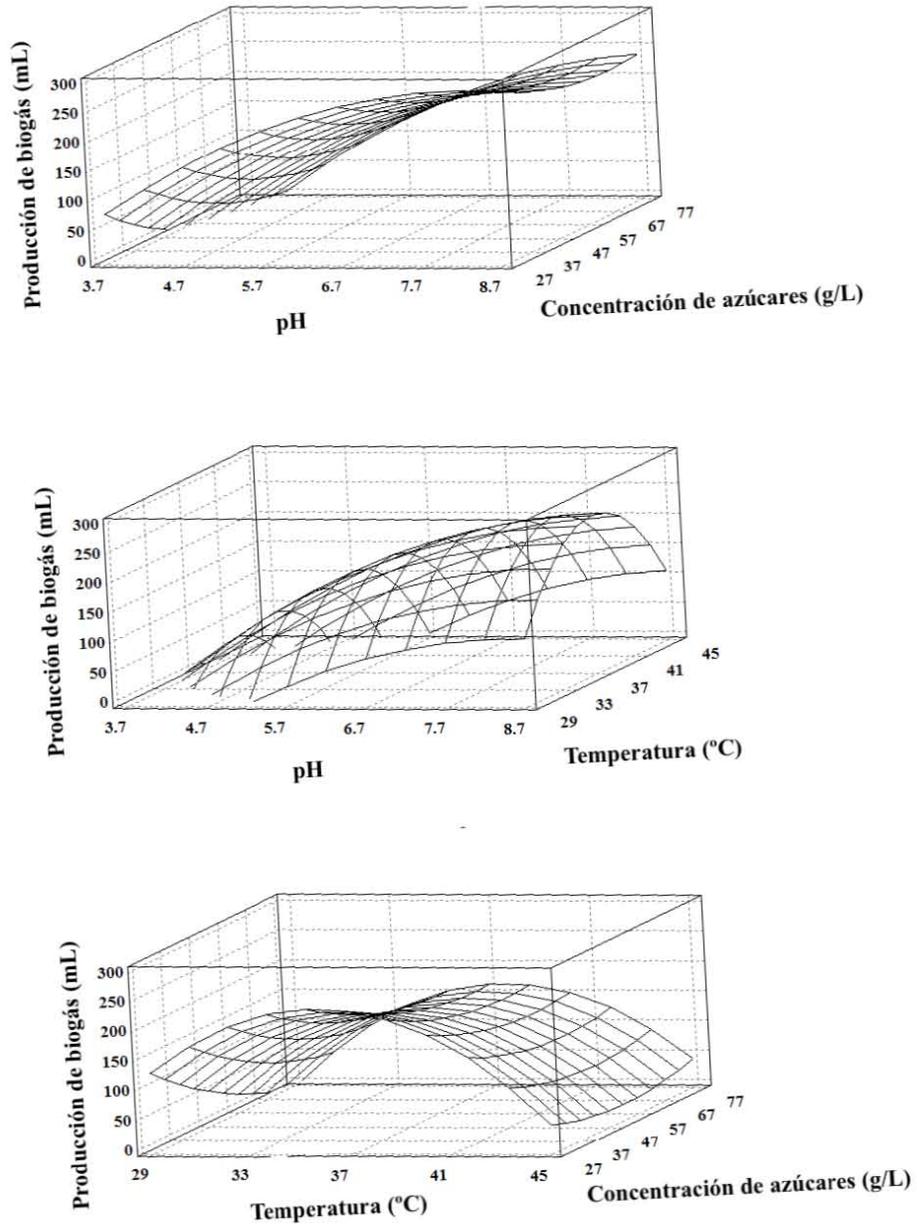


Figura 5.1: Superficies de respuesta descritas por los modelos que representan la dependencia de la producción de biogás en el pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares.

La figura 5.1 ilustra los efectos del pH, la temperatura y la concentración inicial de azúcares con respecto a *PBG*. El efecto combinado de pH con la temperatura muestra la *PBG* alta a pH 8, y temperaturas alrededor de 37 °C. Sobre el análisis de cada variable de entrada en el diseño experimental, las variables óptimas para la producción de biogás a partir de mucílago de café fueron pH de 8.29, temperatura de 36.22 °C, concentración inicial de azúcares de 27 g/L y *PBG* de 293 mL. A partir de la condiciones predichas se obtuvo una *PBG* experimental de 311 mL, con un consumo de azúcar de 40 % (figura 5.2).

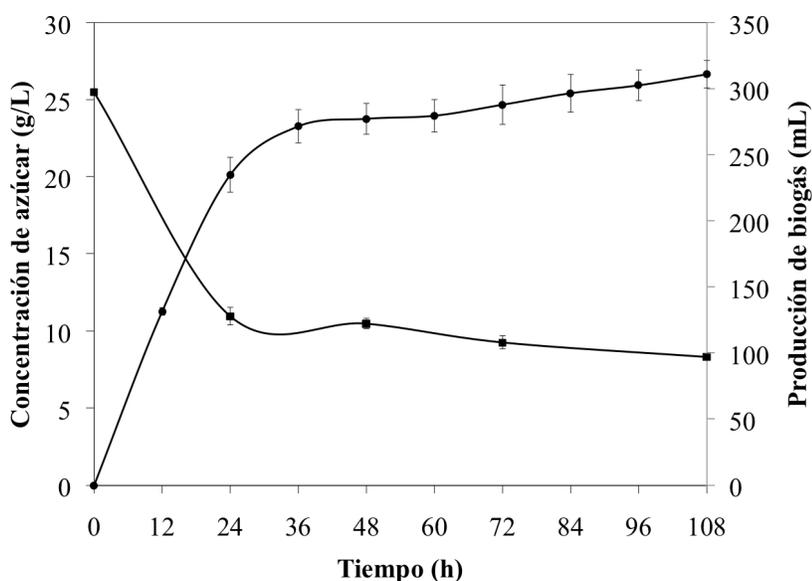


Figura 5.2: Cinética de consumo de azúcares (■) y producción de biogás (●) para la condición óptima

Para la cuantificación de ácidos grasos volátiles (AGV) se analizaron principalmente ácido butírico, ácido láctico y ácido acético, la figura 5.3 muestra el comportamiento de estos.

Se encontró ácido butírico en concentraciones de 1833 mg/L, que es la concentración más alta en la digestión, seguido de ácido láctico 1547 mg/L. Un tercer compuesto formado fue el ácido acético con 757 mg/L, la alta formación de este ácido es debido a la fase de adaptación del inóculo para el medio [Bouallagui et al., 2009]. Los AGV se puede utilizar como sustratos en la formación de metano [Foster et al., 2007], por lo tanto, la disminución se produce a las 48 horas con un registro de 213 mg/L de ácido acético. Con respecto a los dos ácidos restantes fueron menos

asimilados por el lodo metanogénico.

Según Fang et al. [Fang et al., 2011] y Fantozzi et al. [Fantozzi and Buratti, 2009], los valores superiores a 6000 mg/L tienen un efecto inhibitor sobre el proceso de digestión, por lo tanto, en esta investigación los AGV no generan este efecto.

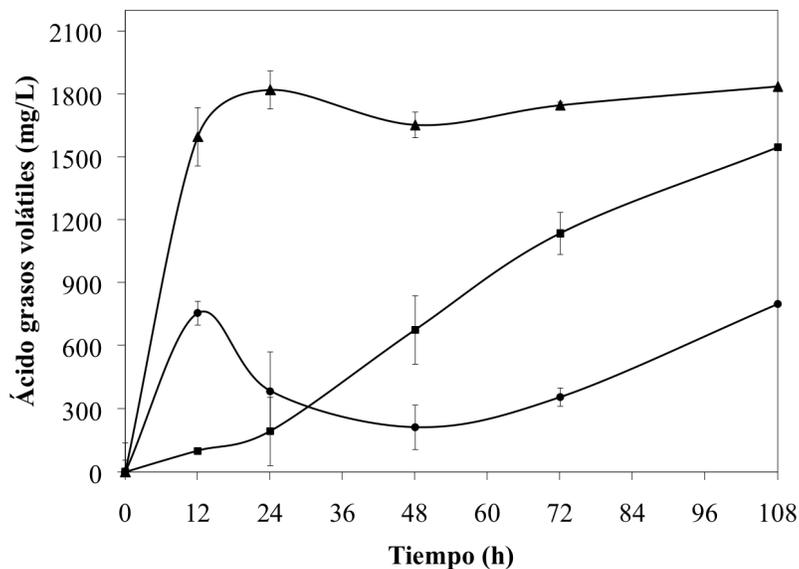


Figura 5.3: Producción de ácidos grasos volátiles para la condición óptima, en condiciones anaerobias usando lodo residual como inóculo (Ácido láctico (■), ácido acético (●) y ácido butírico (▲)).

5.6. Conclusiones

Con la caracterización del mucílago de café se pueden identificar azúcares aprovechables para la producción de biogás.

El uso de mucílago de café como sustrato para la producción de biogás es una opción viable para la producción eficiente de biocombustible.

La condición óptima para la producción de biogás a partir de mucílago de café estimada fueron pH de 8.2, temperatura de 37 °C, concentración inicial de azúcar de 25.5 g/L y una producción de 293 mL de biogás. Bajo esta condición la producción de biogás fue de 311 mL, superando la condición predicha.

La optimización del proceso mejora el sistema de producción de biogás sobre condiciones óptimas, de modo que el rendimiento de la producción de biogás tam-

bien mejora.

Este capítulo se encuentra en revisión como artículo en la revista BMC Biotechnology

Pérez-Sariñana Bianca Yadira, Díaz-González Amilcar, De León-Rodríguez Antonio, Saldaña-Trinidad Sergio, Pérez-Luna Yolanda. Biogas Production From Coffee Mucilage (2015).

Capítulo 6

Escalamiento del proceso de fermentación y digestión anaerobia

6.1. Resumen

En el presente trabajo se escaló la producción de bioetanol y biogás a partir de mucílago de café, las condiciones óptimas para los procesos fueron: pH de 5.1, temperatura de 32 °C, concentración inicial de azúcares de 61.8 g/L, producción de bioetanol estimada de 15.02 g/L; y pH de 8, temperatura de 37 °C, concentración de azúcar de 25.5 g/L y producción de biogás estimada de 293 mL. El escalamiento se llevó a cabo en un biorreactor con un volumen de trabajo de 1 L a temperatura y pH controlado, obteniendo una producción de bioetanol de 16.62 g/L \pm 0.25 y de biogás de 2950 mL. Se monitoreó el potencial redox, la concentración de azúcares y glicerol durante la fermentación. Se determinó la función de regresión lineal entre el potencial redox y la producción de bioetanol.

Palabras clave: Escalamiento de procesos, biorreactor, fermentación, digestión anaerobia.

6.2. Abstract

In this work the production of bioethanol and biogas scaled from coffee mucilage, optimal conditions for the process were: pH 5.1, temperature 32 °C, initial sugar concentration of 61.8 g/L, bioethanol production estimated 15.02 g / L; and pH 8, at 37 °C, sugar concentration of 25.5 g/L and estimated biogas production of 293 mL. Scaling was performed in a bioreactor with a working volume of 1 L to temperature and pH controlled, I obtained production of bioethanol from 16.62 g/L \pm 0.25 biogas and 2950 mL. Monitoring the redox potential, the sugar concentration during fermentation and glycerin. The relationship between redox potential and bioethanol production was determined.

Keywords: Scaling processes, bioreactor, fermentation, anaerobic digestion.

6.3. Introducción

El diseño eficiente de los sistemas de biorreactores esta basado en la tasa de equilibrio físico y los procesos biológicos. Los procesos físicos de interés son, la transferencia de masa y mezcla de líquidos; mientras que en los procesos biológicos de interés es el metabolismo de las células, en contraste con los microorganismos, el crecimiento y la acumulación de metabolitos secundarios. Dado que la tecnología de biorreactor se ha desarrollado principalmente para el cultivo de microorganismos, los reactores estándar necesitan adaptaciones para los requerimientos específicos [Tal et al., 1983].

El potencial redox mide la energía química de oxidación reducción mediante un electrodo, convirtiéndola en energía eléctrica. El potencial redox es positivo cuando se produce oxidación y negativo cuando se produce reducción. Normalmente, las reacciones redox vienen acompañadas de cambios de pH en el medio. La determinación del potencial redox permite la monitorización continua del proceso de fermentación, ya que la alteración drástica del potencial redox indican perturbaciones en la concentración celular [Mühlbach, 1998]. La concentración celular esta ligada a la cantidad de producto producida en una fermentación [García, 1993].

6.4. Materiales y métodos

6.4.1. Sustrato y microorganismo

El mucílago de café fue usado como sustrato para la fermentación y la digestión anaerobia, extraído del café cereza usando una despulpadora.

Para el proceso de fermentación se utilizó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034. Al sustrato se le adicionó 0.5 g/L de sulfato de amonio, se centrifugó y se pasteurizó de acuerdo a las condiciones descritas en el capítulo 4.

Para el proceso de digestión anaerobia se usó como inóculo lodo metanogénico de un reactor anaeróbico industrial de tratamiento de aguas residuales durante 108 h, se añadió 980 mL de mucílago de café, 10 mL de inóculo y 10 mL de solución tampón, como se describió en el capítulo 5.

6.4.2. Cultivo en biorreactor

A partir de las condiciones óptimas obtenidas en el capítulo 4: pH de 5.1, temperatura de 32 °C, concentración inicial de azúcares de 61.8 g/L, producción de bioetanol estimada y experimental de 15.02 g/L y $16.29 \pm 0,39$ g/L. Y pH de 8, temperatura de 37 °C, concentración inicial de azúcares de 25.5 g/L y producción de biogás estimada y experimental de 293 mL y 313 mL, respectivamente.

Se realizaron cultivos discontinuos en un biorreactor de 1 L (Applikon, Foster City, CA), como se muestra en la figura 6.1. El pH se ajustó a 5 y se monitoreó en línea usando un electrodo autoclavable (Applikon) conectado a una bioconsola ADI 1035 (Applikon). Una vez que el pH alcanza el valor indicado, se controla automáticamente en el punto de ajuste indicado y mediante el uso de soluciones, NaOH y HCl al 2N.

El potencial redox se mide en línea con un electrodo redox autoclavable (Applikon, Schiedam, Holanda) conectado a un potenciómetro (B&C Electronics, Italia) mediante un puerto RS232, los datos fueron registrados en una PC. El programa BioXpert 1.3 (Applikon) se utilizó para la adquisición de datos. Los cultivos se realizaron por duplicado a una agitación constante de 200 rpm con dos turbinas Rushton de seis aspas.

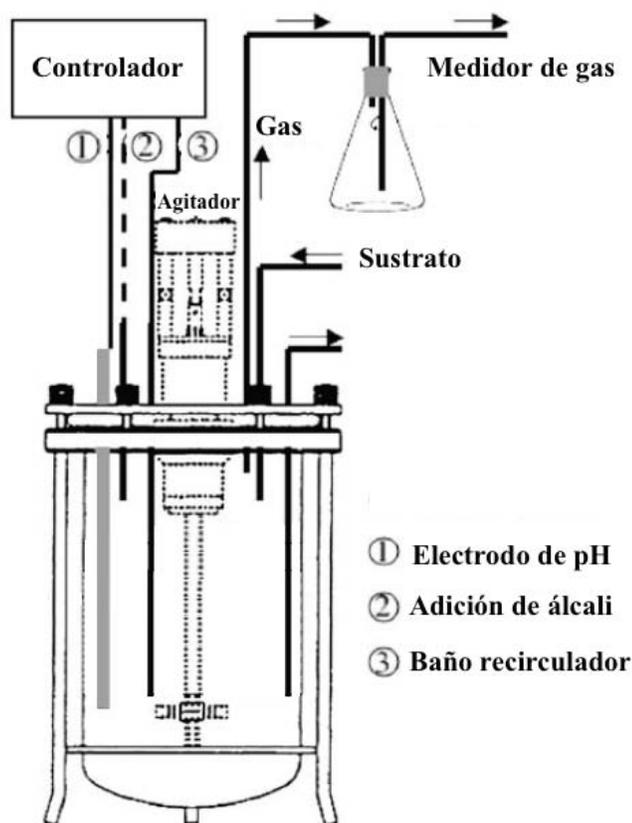


Figura 6.1: Esquema de biorreactor y disposición del sistema de fermentación discontinua. [Davila-Vazquez et al., 2009] .

6.4.3. Análisis

La determinación de la concentración de azúcares, etanol y glicerol se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando una columna Phenomenex a 60 °C con 0.0025 M de H_2SO_4 a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min con un detector de índice de refracción. El biogás producido (principalmente metano) se cuantificó por el método de desplazamiento volumétrico de agua, con una trampa de NaOH 2N [Raposo et al., 2006].

Otros compuestos del mucílago de café se analizaron en un cromatógrafo de gases (CG) 7820A acoplado con un espectrómetro de masas (EM) 5977E (Agilent Technologies) utilizando una columna capilar de silicio-fenil metil 5% de 30 m de largo, 250 micras de diámetro interior y espesor de 0.25 μm . El detector del EM

fue operado bajo ionización por impacto electrónico a 70 eV utilizando el modo de exploración en 45-450 uma. Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masas a los obtenidos en la biblioteca NIST 11 de la base de datos del EM.

6.5. Resultados y discusiones

6.5.1. Escalamiento del proceso de producción de bioetanol

En la figura 6.2 se muestra la evolución del potencial redox y la cinética de producción de bioetanol. La medida del potencial redox permite conocer las diferentes relaciones entre los compuestos presentes en la fermentación, los compuestos oxidados y reducidos. El pH y el oxígeno afectan a los valores de Pr , y por lo tanto el equilibrio depende del pH, cuanto mayor es el pH menor es el Pr y también del oxígeno, cuanto más oxígeno disuelto menor Pr .

Se graficó la cinética de consumo de azúcares y la concentración de glicerol producida. Se observa el mismo comportamiento y producción que en botellas serológicas, la concentración de glicerol fue 2.91 ± 0.32 g/L en el escalamiento a 1 L, y 3.16 ± 0.13 g/L en botellas serológicas con un volumen de trabajo de 100 mL.

La figura 6.3 muestra la función de regresión lineal entre el potencial redox y la producción de bioetanol (ecuación 6.1)), con el objetivo de obtener una estimación del bioetanol que se producirá en futuras fermentaciones con las mismas condiciones experimentales..

$$PB = -0.0549Pr + 10.3619 \quad (6.1)$$

Donde PB es la producción de bioetanol (g/L) y Pr es el potencial redox (mV), el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.97.

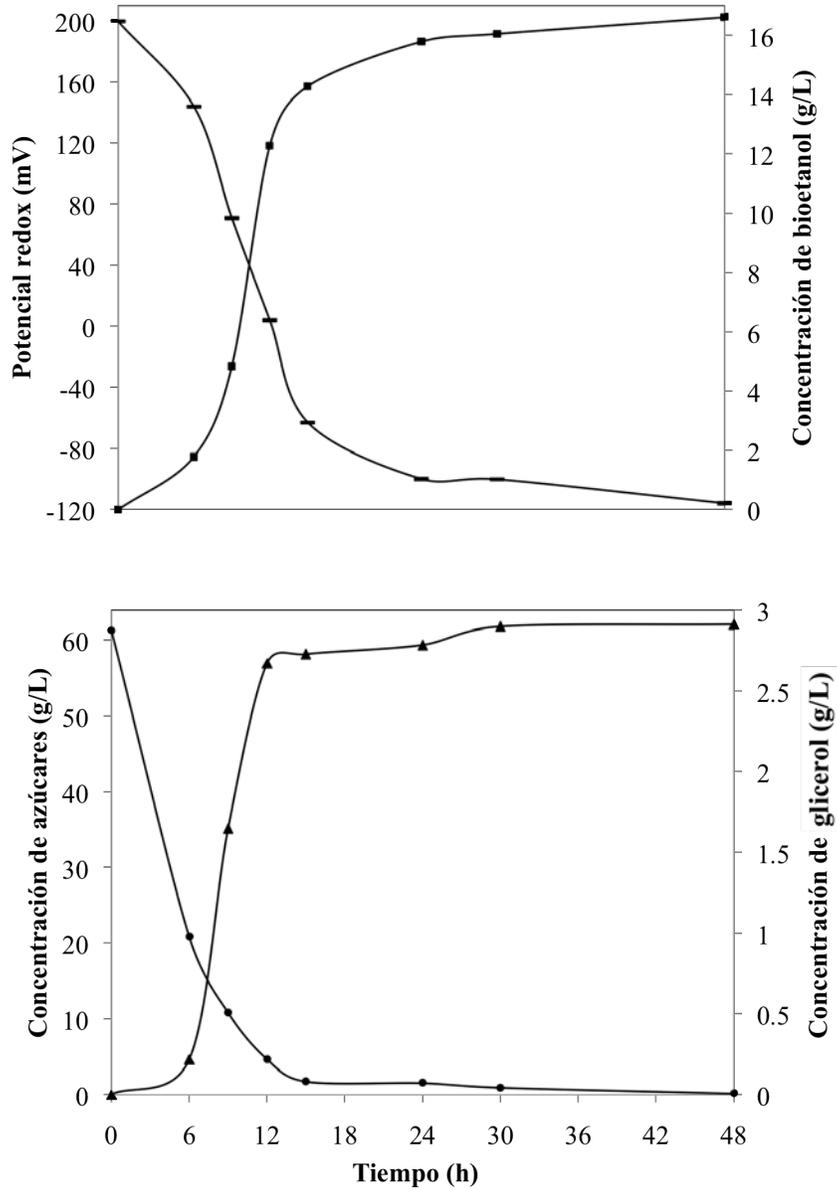


Figura 6.2: Cinética del cultivo discontinuo para la condición óptima escalada a un volumen de 1 L (Potencial redox (-), concentración de bioetanol (■), concentración de azúcares (▲) y concentración de glicerol (●)).

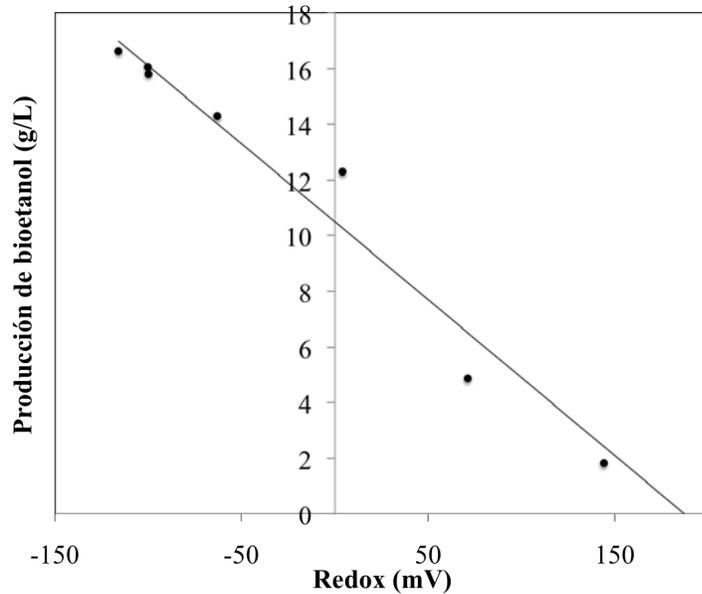


Figura 6.3: Correlación lineal entre la concentración de bioetanol y el potencial redox.

6.5.2. Escalamiento del proceso de producción de biogás

En la figura 6.4 se muestra la cinética de producción de biogás y el consumo de azúcares, como se puede observar se consumió el 100 % de los azúcares produciendo 2950 mL de biogás, el cual el metano es el principal componente.

Se graficó la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) (ácido butírico y ácido láctico) en la figura 6.5. Los AGV, son productos intermedios mayoritarios del proceso anaeróbico, es uno de los parámetros que más eficazmente pueden indicar la evolución del proceso de digestión. Este es uno de los más utilizados en los sistemas de control debido a su rápida respuesta ante variaciones del sistema. Durante la degradación anaeróbica, la materia orgánica compleja es hidrolizada y fermentada en compuestos de bajo peso molecular, incluyendo ácidos grasos de cadena corta. Estos incluyen principalmente ácidos acético, propiónico y butírico. Cuando la relación simbiótica entre acidogénicos y metanogénicos se rompe, los AGV se acumulan [FAO, 2011].

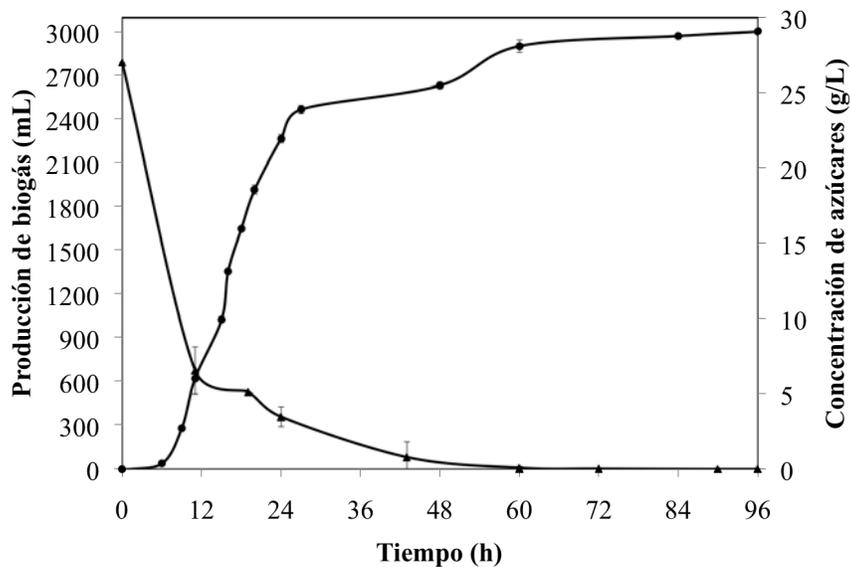


Figura 6.4: Cinética de producción de biogás (●) y consumo de azúcar (▲).

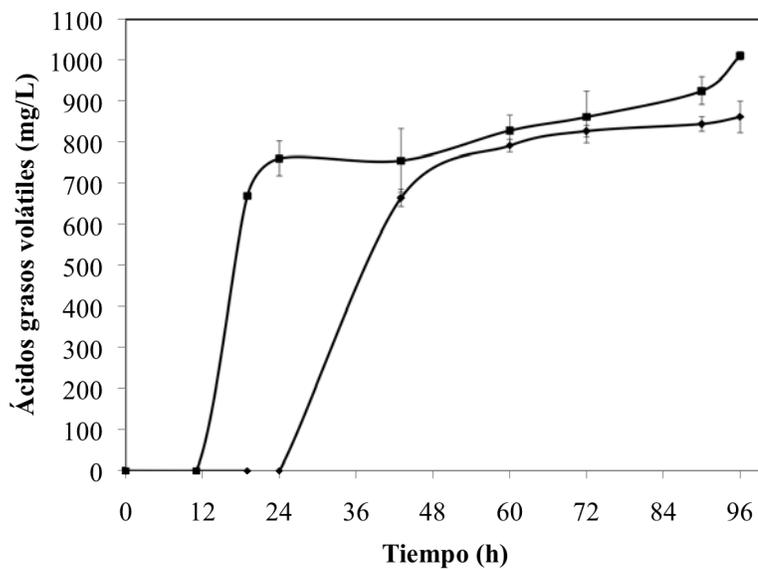


Figura 6.5: Cinéticas de producción de ácidos grasos volátiles (ácido butírico (■) y ácido láctico (◆)).

La evolución del potencial redox se muestra en la figura 6.6. El potencial redox es un parámetro muy sensible a cambios en el biorreactor. Los cambios en la mezcla de materia prima o en el pH provocará un cambio en el potencial redox, aunque ningún desequilibrio del proceso es inminente. El electrodo redox determina el voltaje entre sustancias oxidantes (donantes de electrones) y sustancias reductoras (aceptores de electrones) que se disuelven en el contenido del biorreactor. Los valores del potencial redox deben ser negativos con el fin de asegurar el ambiente fuertemente reductor que las bacterias metanogénicas necesitan para su óptima actividad [FAO, 2011].

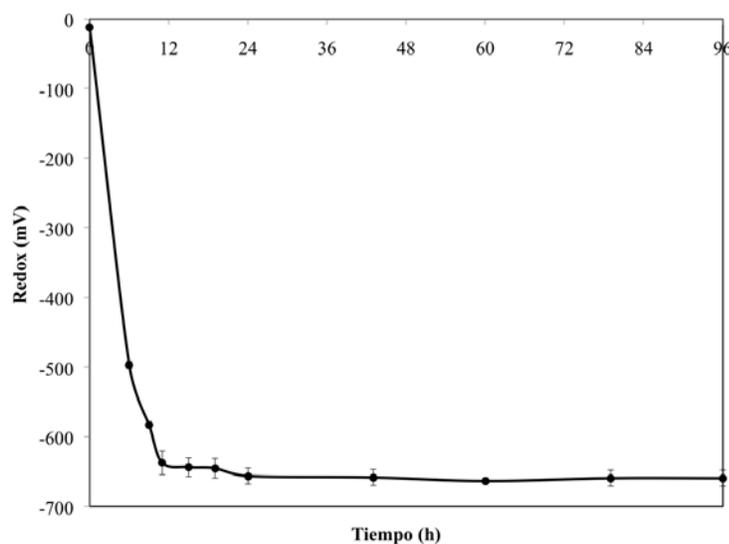


Figura 6.6: Evolución del potencial redox en la producción de biogás.

6.6. Conclusiones

El escalamiento se llevó a cabo en un biorreactor con un volumen de trabajo de 1 L a temperatura y pH controlado, obteniendo una producción de bioetanol de $16.62 \text{ g/L} \pm 0.25$ y de biogás de 2950 mL, a partir de pH 5.1, temperatura de $32 \text{ }^\circ\text{C}$, concentración inicial de azúcares de 61.8 g/L , y pH de 8, temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, concentración de azúcares de 25.5 g/L , respectivamente.

La producción de glicerol como subproducto del metabolismo fermentativo fue $2.91 \pm 0.32 \text{ g/L}$, 7% menos que en botellas serológicas con un volumen de trabajo

de 100 mL.

Se monitoreó el potencial redox en la producción de bioetanol, indicando que no existieron perturbaciones en la concentración celular.

El valor negativo del potencial redox en la producción de biogás aseguró el ambiente reductor que las bacterias metanogénicas necesitan para su óptima actividad.

Capítulo 7

Conclusiones

- En este trabajo de investigación se implementó una metodología para la producción de bioetanol y biogás a partir de mucílago de café.
- La conversión de azúcares a bioetanol fue aproximadamente del 98 %, para concentraciones de 26.486 g/L, 49.043 g/l, y 68.535 g/L.
- El método del picnómetro propuesto, es una forma alternativa para estimar la concentración de bioetanol en un medio líquido fermentado cuando hay falta de equipo sofisticado, tal como es el HPLC.
- Las concentraciones de azúcares reductores iniciales de 26.486 g/L, 49.043 g/l, y 68.535 g/L generaron rendimientos de 0.453, 0.371, y 0.376 gramos de bioetanol por gramo de azúcar inicial y rendimientos fraccionales o relativos de 88.740 %, 72.794 %, y 73.731 %, respectivamente.
- De acuerdo con las pruebas de significación que comparan dos medias experimentales, el método del picnómetro y HPLC proporcionan la misma concentración de bioetanol, las varianzas conjuntas calculadas fueron de 2.269, 0.242, y 0.112 a tres pruebas diferentes con concentraciones de azúcares reductores de 26.486 g/L, 49.043 g/L, y 68.535 g/L, respectivamente.
- El mucílago de café es un residuo agroindustrial compuesto principalmente por galactosa y glucosa.
- La metodología de superficie de respuesta se empleó con éxito para producir bioetanol y optimizar la fermentación de mucílago de café por *Saccharomyces*

cerevisiae NRRL Y-2034. En este proceso, el glicerol es un subproducto del metabolismo fermentativo.

- Las condiciones óptimas para la producción de bioetanol se establecieron como: pH de 5.1, temperatura de 32 °C, concentración inicial de azúcares de 61.8 g/L y una producción de bioetanol estimada de 15.02 g/L. Con estas condiciones, la producción de bioetanol experimental fue de 16.29 ± 0.39 g/L, un rendimiento de bioetanol de 0.27 y una tasa de producción de 0.34 g/Lh.
- La optimización es una alternativa para aumentar la producción de bioetanol en mucílago de café.
- Con la caracterización del mucílago de café se pueden identificar azúcares aprovechables para la producción de biogás.
- El uso de mucílago de café como sustrato para la producción de biogás es una opción viable para la producción eficiente de biocombustible.
- Las condiciones óptimas para la producción de biogás a partir de mucílago de café estimada fueron pH de 8.2, temperatura de 37 °C, concentración inicial de azúcar de 25.5 g/L y una producción de 293 mL de biogás. La producción de biogás experimental fue de 311 mL, superando en un 6 % la condición predicha.
- La optimización del proceso mejora el sistema de producción de biogás sobre condiciones óptimas, de modo que el rendimiento de la producción de biogás también mejora.
- El escalamiento se llevó a cabo en un biorreactor con un volumen de trabajo de 1 L a temperatura y pH controlado, obteniendo una producción de bioetanol de $16.62 \text{ g/L} \pm 0.25$ y de biogás de 2950 mL, a partir de pH 5.1, temperatura de 32 °C, concentración inicial de azúcares de 61.8 g/L, y pH de 8, temperatura de 37 °C, concentración de azúcares de 25.5 g/L, respectivamente.
- Se monitoreó el potencial redox en la producción de bioetanol, indicando que no existieron perturbaciones en la concentración celular.
- El valor negativo del potencial redox en la producción de biogás aseguró el ambiente reductor que las bacterias metanogénicas necesitan para su óptima actividad.

- La producción de glicerol como subproducto del metabolismo fermentativo fue 2.91 ± 0.32 g/L, 7% menos que en botellas serológicas con un volumen de trabajo de 100 mL.
- El mucílago de café tiene potencial para producir bioetanol y biogás.

Anexos

Producción científica

Artículos

Optimization of Bioethanol Production from Coffe Mucilage, (2015). Pérez-Sariñana Bianca Yadira, Antonio De León-Rodríguez, Saldaña-Trinidad Sergio, P. J. Sebastian. *BioResources* 10:4326-4338, Revistas Indizada (ISSN: 1930-2126).

A Simple Method to Determine Bioethanol Production from Coffee Mucilage, Verified by HPLC (2015). Pérez-Sariñana Bianca Yadira, Saldaña-Trinidad Sergio, Guerrero-Fajardo Carlos Alberto, Santis-Espinosa Luis Fernando, and P. J. Sebastian. *BioResources* 10:2691-2698, Revista Indizada (ISSN: 1930-2126).

Ethanol production by fermentation from waste coffee mucilage coffe mucilage. (2015), Pérez-Sariñana Bianca Yadira, Guerrero-Fajardo Carlos Alberto, Saldaña-Trinidad Sergio, P. J. Sebastian. *Indian Journal of Applied Research* 5:197-199, Revista Indizada (ISSN: 2249-555X).

Drying mango (*Mangifera Indica L.*) with solar energy as a pretreatment for bioethanol production (2015). Santis-Espinosa L. Fernando, Pérez-Sariñana Bianca Yadira, Guerrero-Fajardo Carlos Alberto, Saldaña-Trinidad Sergio, López-Vidaña Erick C., and P. J. Sebastian. *BioResources* 10:6044-6054, Revista Indizada (ISSN: 1930-2126).

Ethanol production process by lignocellulosic material fermentation from water hyacinth biomass (2014). Pérez-Sariñana Bianca Yadira, Sierra-Cantor Jonathan Fabián, Saldaña-Trinidad Sergio, Guerrero-Fajardo Carlos Alberto, Pathiyamat-

tom Joseph Sebastian. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 12:1150-1155, Revista Arbitrada (ISSN: 1934-7375).

Bioethanol production from coffee mucilage (2014). Pérez-Sariñana Bianca Yadira, Saldaña-Trinidad Sergio, S.E.L. Fernando, P.J. Sebastian, D. Eapen. *Energy Procedia* 57:950- 956, Revista Arbitrada (ISSN: 1876-6102).

Evaluation of agro-industrial wastes to produce bioethanol: case study - mango (*Mangifera Indica L.*) (2014). Santis Espinosa L. Fernando, Pérez-Sariñana Bianca Yadira, Saldaña- Trinidad Sergio, D. Eapen, P.J. Sebastian. *Energy Procedia* 57:860-866, Revista Arbitrada (ISSN: 1876-6102).

Biogas Production From Coffee Mucilage (2015). Pérez-Sariñana Bianca Yadira, Díaz-González Amilcar, De León-Rodríguez Antonio, Saldaña-Trinidad Sergio, Pérez-Luna Yolanda. En revisión por pares, *BMC Biotechnology*.

Libro

Biogás, alternativa ambiental en el manejo de residuos orgánicos para su uso como energético sustentable (2015). Carlos Alberto Guerrero Fajardo, Bianca Yadira Pérez-Sariñana, Silvia Catalina Cometta Conde, Fabio Emiro Sierra Vargas, Sebastian Pathiyamattom Joseph, editorial Académica Española, ISBN978-3-659-07190-4.

Participación en congresos

XXIV International Materials Research Congress. A simple method to determine bioethanol concentration. Perez Sariñana Bianca Yadira, Saldaña Trinidad-Sergio, Guerrero-Fajardo Carlos Alberto, Santis-Espinosa Luis Fernando, P. J. Sebastian. Agosto 2015, Cancún Quintana Roo.

The 5th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, Elsevier Conferences. Optimization of bioethanol production from coffee mucilage. Pérez-Sariñana Bianca Yadira, De León-Rodríguez Antonio, Saldaña-Trinidad Sergio, P. J. Sebastian. June 2015, San Diego, USA.

XXIII International Materials Research Congress. Biogas production from coffee mucilage. Díaz González Amilcar, Perez-Sariñana Bianca Yadira, De León Rodríguez Antonio, P. J. Sebastian, Saldaña Trinidad Sergio. Agosto 2014, Cancún Quintana Roo.

International Solar Energy Society, Solar World Congress. Bioethanol production from coffee mucilage. Perez-Sariñana Bianca Yadira, Saldaña Trinidad Sergio, Santis Espinosa Luis Fernando, P. J. Sebastian. Agosto 2013, Cancún Quintana Roo.

XXII International Materials Research Congress. Methodology for the acid hydrolysis of coffee husk. Perez Sariñana Bianca Yadira, Vázquez Chacón Nacir, Saldaña Trinidad Sergio, Santis Espinosa Luis Fernando, P. J. Sebastian. Agosto 2013, Cancún Quintana Roo.

XXI International Materials Research Congress. Bioethanol production from coffee mucilage. Perez-Sariñana Bianca Yadira, Saldaña Trinidad Sergio, P. J. Sebastian, Santis Espinosa Luis Fernando. Agosto 2012, Cancún Quintana Roo.

Estancias de posgrado

Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, 8 de septiembre al 8 de diciembre del 2014, asesor: Dr. Carlos Alberto Guerrero Fajardo del departamento de Química-Facultad de Ciencias, Líder Grupo: “Aprovechamiento Energético de Recursos Naturales-APRENA”.

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, 20 de enero al 25 de abril del 2014, asesor: Dr. Antonio de León Rodríguez de la división de Biología Molecular.

Referencias

- Achou, I. N., Bjorn, A., and Bjornsson, L. (2012). Stable operation during pilot-scale anaerobic digestion of nutrient supplemented maize/sugar beet silage. *Bioresource technology*, 118:445–454.
- Ajanovic, A. and Haas, R. (2010). Economic challenges for the future relevance of biofuels in transport in eu countries. *Energy*, 35:3340–3348.
- Albers, E., Lidén, G., Larsson, C., and Gustafsson, L. (1998). Anaerobic redox balance and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Recent Research Developments in Microbiology*, 2:253–279.
- Alvarado-Cuevas, Z. D., Ordoñez-Acevedo, L. G., Ornelas-Salas, J. T., and De León-Rodríguez, A. (2013). Nitrogen sources impact hydrogen production by *escherichia coli* using cheese whey as substrate. *New Biotechnology*, 6:585–590.
- Alzate-Gaviria, L. M., Sebastian, P. J., Pérez-Hernández, A., and Eapen, D. (2007). Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32:3141–3146.
- Amigun, B., Sigamoney, R., and von Blottnitz, H. (2008). Commercialisation of biofuel industry in africa: A review. *Renewable Sustainable Energy Review*, 12:690–711.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, J., Campos, A., Guwy, J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., and Van Lier, J. (2009). Defining the biomethane potential (bmp) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, 59:927–934.

- Angelidaki, I., Ellegaard, L., and Ahring, B. K. (1993). A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 42:159–166.
- AOAC (1990). *Official Methods, 945.06. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Fifteenth edition.
- Appels, L., Baeyens, J., and Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34:755–781.
- Avallone, S., Guiraud, J. P., Guyot, B., Olguin, E., and Brillouet, J. M. (2000). Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. *Food Chemistry and Toxicology*, 65:1308–1311.
- Bagi, Z., Ács, N., Bálint, B., Horváth, L., Dobó, K., Perei, K., Rákhely, G., and Kovács, K. (2007). Biotechnological intensification of biogas production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76:473–482.
- Balat, M. and Balat, H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied energy*, 86:2273–2282.
- Balusu, R., Paduru, R., Kuravi, S. K., G., S., and G., R. (2005). Optimization of critical medium components using response surface methodology for ethanol production from cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* ss19. *Process Biochemistry*, 40:3025–3030.
- Bouallagui, H., Touhami, Y., Cheikh, R., and Hamdi, M. (2009). Bio-reactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Process Biochemistry*, 40:989–995.
- Breisha, G. Z. (2010). Production of 16 % ethanol from 35 % sucrose. *Biomass and Bioenergy*, 34:1243–1249.
- Bucksch, S. and Egebäck, K. (1999). The swedish program for investigations concerning biofuels. *Science of the Total Environment*, 235:293–303.
- Budiyono, Widiassa, I. N., Johari, S., and Sunarso (2009). Influence of inoculum content on performance of anaerobic reactors for treating cattle manure using rumen fluid inoculum. *International Journal of Engineering and Technology*, 3:109–116.
- Chanakya, H. and De Alwis, A. (2004). Environmental issues and management in primary coffee processing. *Process Safety and Environmental Protection*, 82:291–300.

- Charles, W., Walker, L., and Ruwisch, R. (2009). Effect of preaeration and inoculum on the start-up of batch thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 100:2329–2335.
- Chattopadhyay, S., Mukerji, A., and R., S. (2009). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, chapter 4, pages 61–74. Springer.
- Chen, T. and Hashimoto, A. (1996). Effect of ph and substrate: inoculum ratio on batch methane fermentation. *Bioresource technology*, 56:179–186.
- Cho, J. and Park, S. (1995). Biochemical methane potential and solid state anaerobic digestion of korean food wastes. *Bioresource technology*, 52:245–253.
- Christen, P., Bramorski, A., Revah, S., and Soccol, C. R. (2000). Characterization of volatile compounds produced by *rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. *Bioresource Technology*, 71:211–215.
- Chuck-Hernandez, C., Perez-Carrillo, E., and Serna-Saldivar, S. O. (2009). Production of bioethanol from steam-flaked sorghum and maize. *Journal of Cereal Science*, 50:131–137.
- Cortright, R. D., Davda, R. R., and Dumesic, J. A. (2002). Hydrogen from catalytic reforming of biomass-derived hydrocarbons in liquid water. *Letters to Nature*, 418:964–967.
- Davila-Vazquez, G., Alatríste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., and Razo-Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and ph. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19):4989–4997.
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., De León-Rodríguez, A., and Razo-Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:4296–4304.
- De Leon-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P. ., Barba de la Rosa, A. P., and Blaschek, H. P. (2008). Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from agave salmiana using response surface methodology. *Chemical Engineering Process*, 47:76–82.
- Donoso, A., Retamal, C., Carballa, M., Ruiz, G., and Chamy, R. (2009). Influence of temperature on the hydrolysis, acidogenesis and methanogenesis in mesophilic anaerobic digestion: parameter identification and modeling application. *Water Science Technology*, 60:9–17.

- EESI (2015). *Environmental and Energy Study Institute, Fossil Fuels*.
www.eesi.org.
- Egebäck, K. and Westerholm, R. (1997). Environmental potential of the alternative fuels; biogas, ethanol, methanol, natural gas, rme and dme. *Swedish Transport and Communications Research Board (KFB), Baveno, Italy*.
- Eskicioglu, C. and Ghorbani, M. (2011). Effect of inoculum/substrate ratio on mesophilic anaerobic digestion of bioethanol plant whole stillage in batch mode. *Process Biochemistry*, 46:1682–1687.
- Fang, C., Boe, K., and Angelidaki, I. (2011). Anaerobic co-digestion of by-products from sugar production with cow manure. *Water Research*, 45:3473–3480.
- Fantozzi, F. and Buratti, C. (2009). Biogas production from different substrates in an experimental continuously stirred tank reactor anaerobic digester. *Bioresource Technology*, 100:5783–5789.
- FAO (2011). *Manual de biogás*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Santiago de Chile.
- Faulds, C. B., Bartolome, B., and Williamson, G. (1997). Novel biotransformation of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterase. *Industrial Crops and Products*, 6:367–374.
- Fehrenbach, H., Giegrich, J., Reinhardt, G., Sayer, U., Gretz, M., Lanje, K., and Schmitz, J. (2008). Kriterien einer nachhaltigen bioenergienutzung im globalen maßstab. *UBA-Forschungsbericht*, 206:41–112.
- Ferreira, S., Gil, N., Queiroz, J., Duarte, P., and Domingues, F. C. (2010). Bioethanol from the portuguese forest residue *pterospartum tridentatuman* - an evaluation of pretreatment strategy for enzymatic saccharification and sugars fermentation. *Bioresource Technology*, 101:7797–7803.
- Foster, T., Pérez, M., and Romero, I. (2007). Composting potential of different inoculum sources in the modified sebac system treatment of municipal solid wastes. *Bioresource Technology*, 98:3354–3366.
- García, M. (1993). *Bioteología Alimentaria*, chapter 1, pages 1–2. Limusa.
- González, C. and García, P. (2009). Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass and Bioenergy*, 33:1065–1069.

- Habibi, Y., Zawawy, W. K. E., Ibrahim, M. M., and Dufresne, A. (2008). Processing and characterization of reinforced polyethylene composites made with lignocellulosic fibers from egyptian agro-industrial residues. *Composites Science and Technology*, 68:1877–1885.
- Huang, Y., Jin, Y., Fang, Y., Li, Y., and Zhao, H. (2013). Simultaneous utilization of non-starch polysaccharides and starch and viscosity reduction for bioethanol fermentation from fresh *canna edulis* ker. tubers. *Bioresource Technology*, 128:560–564.
- IEA (2006). World energy outlook. *International Energy Agency, Paris*.
- IEA (2014). World energy balances. *International Energy Agency, Paris*.
- In-Seong, C., Seung-Gon, W., Su-Bae, K., and Hyeun-Jong, B. (2012). Conversion of coffee residue waste into bioethanol with using popping pretreatment. *Bioresource Technology*, 125:132–137.
- IPCC (2000). Special report on emission scenarios. *Intergovernmental Panel on Climate Change*.
- Israilides, C., Scanlon, B., Smith, A., Harding, S., and Jumel, K. (1994). Characterization of pullulans produced from agro-industrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 25:203–209.
- Jackels, S. C. and Jackels, C. F. (2005). Characterization of the coffee mucilage fermentation process using chemical indicators: A field study in nicaragua. *Food Chemistry and Toxicology*, 70:321–325.
- Jaeger, W. and Egelkraut, T. (2011). Biofuel economics in a setting of multiple objectives and unintended consequences. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15:4320–4333.
- John, R. P. (2009). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, chapter 11, pages 226–236. Springer.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., and Pandey, A. (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74:524–534.
- Kang, H. and Wetland, P. (1993). Ultimate anaerobic biodegradability of some agro-industrial residues. *Bioresource Technology*, 43:107–111.

- Kaosol, T. and Sohgrathok, N. (2013). Enhancement of biogas production potential for anaerobic co-digestion of wastewater using decanter cake. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 8(1):494–502.
- Kapdan, I. K. and Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38:569–582.
- Karagoöz, P., Rocha, I., Özkan, M., and Angelidaki, I. (2013). Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. *Bioresource Technology*, 104:349–357.
- Klemeš, J., Varbanov, P., and Huisingh, D. (2012). Recent cleaner production advances in process monitoring and optimisation. *Journal of Cleaner Production*, 34:1–8.
- Lachenmeier, D. W., Godelmann, R., Steiner, M., Ansay, B., Weigel, J., and Krieg, G. (2010). Rapid and mobile determination of alcoholic strength in wine, beer and spirits using a flow-through infrared sensor. *Chemistry Central Journal*, 4:1–10.
- Lagunas, R. and Gancedo, J. M. (1973). Reduced pyridine-nucleotides balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 37:90–94.
- Liebmann, B., Friedl, A., and Varmuza, K. (2008). Determination of glucose and ethanol in bioethanol production by near infrared spectroscopy and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 642:171–178.
- Liew, W. H., Hassim, M. H., and Ng, D. K. S. (2014). Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. *Journal of Cleaner Production*, 71:11–29.
- Lin, Y. and Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69:627–642.
- Mabee, W. E. and Saddler, J. N. (2010). Bioethanol from lignocellulosics: Status and perspectives in canada. *Bioresource Technology*, 101:4806–4813.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytic Chemistry*, 31:426–428.
- Miller, J. N. and Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, chapter 3, pages 45–49. Prentice Hall, 4 edition.

- Mishima, D., Kuniki, M., Sei, K., Soda, S., Ike, M., and Fujita, M. (2008). Ethanol production from candidate energy crops: Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and water lettuce (*Pistia stratiotes L.*). *Bioresource Technology*, 99:2495–2500.
- Mohammad, J. T., Lennart, A., and Gunnar, L. (2002). Strategies for enhancing fermentative production of glycerol - a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:53–66.
- Montgomery, D. C. (1996). *Design and analysis of experiments*. Wiley, New York, 4th edition edition.
- Moreno, M. and Polo, M. (2003). *High-performance liquid chromatography*, page 1174. Elsevier.
- Mösche, M. and Jördening, H. J. (1999). Comparison of different models of substrate and product inhibition in anaerobic digestion. *Water research*, 33:2545–2554.
- Mühlbach, H. P. (1998). Cell plant cell cultures in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, 4:113–175.
- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P., C., R. I., and Teixeira, J. A. (2010). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 83:368–374.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M., Carneiro, L. M., and Teixeira, J. A. (2011a). Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*, 92:763–768.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., and Teixeira, J. A. (2011b). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4:661–672.
- Myers, R. H. (1971). *Response surface methodology*. Boston: Allyn and Bacon.
- Naik, S., Goud, V., Rout, P., and Dalai, A. (2010). Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:578–597.
- OECD/IEA (2008). From 1st to 2nd generations of biofuel technologies, overview of current industry and rd&d activities. pages 1–12.

- Oliver, J. D., Gaborieau, M., and Castignolles, P. (2014). Ethanol determination using pressure mobilization and free solution capillary electrophoresis by photo-oxidation assisted ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*, 1348:150–157.
- Oura, E. (1977). Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry*, 12:19–21.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., and Soccol, V. T. (2000a). Biotechnological potential of agro-industrial residues. i: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74:69–80.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T., Vandenberghe, L. P. S., and Mohana, R. (2000b). Biotechnological potential of agro-industrial residues. ii: cassava bagasse. *Bioresource Technology*, 74:81–87.
- Pereira, F. B., Guimarães, P. M., Teixeira, J. A., and Domingues, L. (2010). Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, 101:7856–7863.
- Piccolo, C. and Bezzo, F. (2009). A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biomass and Bioenergy*, 33:478–491.
- Poorna, C. A. and Prema, P. (2006). Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro-industrial residues. *Biochemical Engineering Journal*, 32:106–112.
- Pratten, N. A. (2009). Review, the precise measurement of the density of small samples. *Journal of Materials Science*, 16:1737–1747.
- Pérez-Sariñana, B. Y., A., D.-R., Saldaña-Trinidad, S., and Sebastian, P. J. (2015a). Optimization of bioethanol production from coffee mucilage. *BioResources*, 10:4326–4338.
- Pérez-Sariñana, B. Y., Saldaña-Trinidad, S., Guerrero-Fajardo, C. A., Santis-Espinosa, L. F., and Sebastian, P. J. (2015b). A simple method to determine dioethanol production from coffee mucilage, verified by hplc. *BioResources*, 10:2691–2698.
- Pérez-Sariñana, B. Y., Saldaña-Trinidad, S., Guerrero-Fajardo, C. A., and Sebastian, P. J. (2015c). Ethanol production by fermentation from waste coffee mucilage. *Indian Journal of Applied Research*, 5:197–199.

- Rangel, A. O. S. S. and Tóth, I. V. (2000). Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection. *Analytica Chimica Acta*, 416:205–210.
- Raposo, F., Banks, C., Siegert, I., Heaven, S., and Borja, R. (2006). Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process Biochemistry*, 41(6):1444–1450.
- Reddy, L. V. and Reddy, O. V. S. (2011). Effect of fermentation conditions on yeast growth and volatile composition of wine produced from mango (*mangifera indica* L.) fruit juice. *Food and Bioproducts Processing*, 89:487–491.
- Rehm, H. and Redd, G. (2008). *Microbial production of glycerol and other polyols*, chapter 5. Wiley, biotechnology set, second edition.
- Rotariu, L., Bala, C., and Magearu, V. (2004). New potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic beverages. *Analytica Chimica Acta*, 513:119–123.
- Saval-Bohórquez, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16:14–46.
- SENER (2014). *Balance Nacional de Energía*. Secretaría de Energía. Subsecretaría de Planeación Energética y Desarrollo Tecnológico, Dirección General de Planeación e Información Energética. www.sener.gob.mx.
- Shih, C. J. and Smith, E. A. (2009). Determination of glucose and ethanol after enzymatic hydrolysis and fermentation of biomass using raman spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 653:200–206.
- SIAP (2014). *Cierre de la producción agrícola por cultivo*. SAGARPA. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. www.siap.gob.mx.
- Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N., and Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101:1570–1580.
- Singh, J. and Gu, S. (2010). Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:2596–25610.
- Soares, M., Christen, P., Pandey, A., Raimbault, M., and Soccol, C. R. (2000). A novel approach for the production of natural aroma compounds using agro-industrial residue. *Bioresource Technology*, 23:695–699.

- Spencer, J. (1968). Production of polyhydric alcohols by yeasts. *Progress in Industrial Microbiology*, 7:1–42.
- Sánchez, O. J. and Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99:5270–5295.
- Taherzadeh, M. J., Lidén, G., Gustafsson, L., and Niklasson, C. (1996). The effect of pantothenate deficiency and acetate addition on anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 46:176–182.
- Tal, B., Rokem, J., and Goldberg, I. (1983). Factors affecting growth and product formation in plant cells growing in continuous culture. *Plant Cell Reports*, 2:219–222.
- Tolnai, S. (1975). A method for viable cell count. *Methods in Cell Science*, 1:37–38.
- Čuček, L., Varbanov, P., Klemeš, J., and Kravanja, Z. (1999). The swedish program for investigations concerning biofuels. *Energy*, 44:135–145.
- Verea-Valladares, L. (2009). Generación de biogás mediante digestión anaerobia de residuos orgánicos de reactores acoplados. Master's thesis, Centro de Investigación en energía.
- Vijaikishore, P. and Karanth, N. (1986). Glycerol production by fermentation - a review. *Process Biochemistry*, 21:54–57.
- Vučurović, V. M. and Razmovski, R. N. (2012). Sugar beet pulp as support for *saccharomyces cerevisiae* immobilization in bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 39:128–134.
- Wang, M., Choong, Y., Su, N., and Lee, M. (2003). A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11:133–140.
- Wang, Q. H., Kuninobu, M., Ogawa, H., and Kato, Y. (1999). Degradation of volatile fatty in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 16:407–416.
- Wang, W., Zhuang, X., Yuan, Z., Yu, Q., Qi, W., Wang, Q., and Tan, X. (2012). High consistency enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse pretreated with liquid hot water. *Bioresource Technology*, 108:252–257.

- Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J., and Jones, D. L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource technology*, 99:7928–7240.
- Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 85:849–860.
- Yan, J. and Lin, T. (2009). Biofuels in asia. *Applied energy*, 86:S1–S10.