



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
AMBIENTAL – RESIDUOS SÓLIDOS

ESTUDIO MULTIDIMENSIONAL DE LA PRODUCCIÓN DE BIOALCOHOLES A
PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE CAÑA DE AZÚCAR

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
ALEJANDRA ESPINOSA DE LOS MONTEROS VELASCO

TUTOR PRINCIPAL
DRA. IDANIA VALDEZ VAZQUEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR
DR. OSCAR GONZÁLEZ BARCELÓ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
DRA. PETIA MIJAYLOVA NACHERA, INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL
AGUA

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

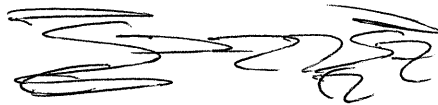
JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. María Teresa Orta Ledesma
Secretario: Dr. Oscar González Barceló
Vocal: Dra. Petia Mijaylova Nachera
1 er. Suplente: Dra. Leonor Patricia Güereca Hernández
2 do. Suplente: Dra. Idania Valdez Vazquez

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA), Unidad Académica Juriquilla-Querétaro. Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.

TUTOR DE TESIS:



Dra. Idania Valdez Vazquez

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Sostenibilidad Energética 2014-05 (CONACYT-SENER), Centro Mexicano de Innovación en Bioenergía, Clúster de Biocombustibles Lignocelulósicos para el Sector Transporte (Subvención No. 249564), y la DGAPA-UNAM proyecto PAPIIT No. IA102018.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca No. 633693.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo el apoyo y el respaldo durante todo este viaje, a pesar de la distancia. A mi padre, por ser el más incondicional y constante, por darme siempre lo mejor de sí. A mi hermano, por escucharme, aconsejarme y demostrarme siempre su apoyo.

A mi tutora, la Dra. Idania Valdez Vazquez, por ser la mejor guía, por cada aprendizaje y retroalimentación, por ser mi nuevo ejemplo de vida, mi nueva meta a seguir. Por todo, GRACIAS.

A los miembros de mi comité la Dra. Petia Mijaylova, el Dr. Oscar González, la Dra. Patricia Güereca y la Dra. María Teresa Orta, por todas sus aportaciones a este trabajo.

Al maestro Jaime Pérez, por absolutamente todo el apoyo brindado, por cada enseñanza transmitida, por la amistad, por cada minuto de partido, por cada detalle y atención, por ser el motor de LIPATA, porque sin usted señor, esos laboratorios y cada proyecto no serían posibles.

A mis compañeros de viaje: Alberto, David, Dayanira, Yara y Yeinner, por todos los momentos compartidos, las risas, el estrés, los nervios, por cada palabra de apoyo, por siempre motivarnos a ser mejores cada día.

A mi familia académica: Adán, Ana, Caro, Christian, Diana, Lore y Mari, por el tiempo, el apoyo, la paciencia y por enseñarme todo lo necesario para desarrollar este trabajo.

A mis hijos: Mauricio, Oswaldo y Jonathan, por ser los más presentes y constantes, por todo el cariño, por cada hermoso recuerdo, por ser mi serendipia en esta aventura, gracias mis bebés.

A mis amigos... A ti, Sharon, por ser la mejor amiga que puede haber encontrado, por ser incondicional, por cada risa, cada lagrima, por cada consejo oportuno, cada regaño necesario, por cada abrazo, por la complicidad, por todos y cada uno de los minutos que pasamos juntas, que para mí son INVALUABLES, por esta amistad que será de por vida. A mi Monchis, por todas las risas ensordecedoras que se escuchaban hasta la luna, cada divertido juego, cada día de pinta, quien diría que todo empezaría con un juego al descubierto y terminaría con un viaje a la playa tan... chistoso. A Diego, por ser mi paracaídas, por ser de las cosas más bonitas que me pasaron en Querétaro, por el amor, por cada segundo inefable a tu lado, por la increíble persona que eres, ahora y siempre formarás parte de mí, gracias totales, arduita. A Gonzalo, por ser el mejor amigo que jamás pude haber imaginado, por cada libro, por cada palabra, por el cariño, por la confianza, por el enriquecimiento mutuo, no tengo ni tendré como agradecerle todo lo que hiciste y sigues haciendo por mí, le diste a mi vida un sentido que no tenía por qué esperar y aun así llegaste a salvarme. El coincidir con personas como ustedes hicieron este viaje más llevadero, fueron lo que necesitaba en mi vida y no lo supe hasta que llegaron, por eso y todo lo que en palabras jamás podré expresar, GRACIAS.

Finalmente, a mi familia queretana: Loly, Sofi, Santi, Mai y Dianita, por recargarme de energía y motivarme a seguir cada día.

Sin todos ustedes, nada de esto habría sido posible.

DEDICATORIA

A ti mamá, porque todos mis logros los vivo por ti.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio multidimensional de la producción de bioalcoholes con biomasa lignocelulósica de caña de azúcar. El trabajo se dividió en: 1) producción de etanol y butanol; 2) determinación de indicadores ambientales y económicos.

Se determinaron los efectos: pH (4.5 y 6.5) y carga orgánica (15 y 20 g ST/kg·día) sobre la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), donde la mayor concentración de 8.3 ± 1.3 g/L se logró a la menor carga orgánica. El pH promovió un perfil de AGV diferente: a pH de 4.5 el ácido láctico representó 67 % y el ácido butírico 16% del total de AGV, mientras que a pH de 6.5 el ácido acético representó el 47% del total. Se determinó el efecto de once factores sobre la producción de butanol: pH (5.5 y 7.5), adición de CaSO_4 (0 y 2 g/L), NaSO_4 (0 y 4 g/L), Zn (0 y 2 mg/L), Fe (0 y 2 mg/L), glucosa (0 y 30 g/L), efluente acidogénico (16 y 32 g DQO/L), y bioaumentación con cuatro cepas de *Clostridium*. La mayor producción de butanol de 80 mg/L fue a pH de 7.5, con adición de Fe y efluente acidogénico de 32 g DQO/L.

Con estos resultados experimentales, se propuso una modificación al esquema de biorrefinería publicado por Valdez-Vazquez y Sanchez (2018), donde se redistribuyeron los AGV para incrementar la producción de butanol. Ambos escenarios fueron contrastados en términos de eficiencia energética (EE), costo total de producción (CTP), consumo de agua y emisiones de CO_2 . La nueva propuesta incrementa la producción de butanol de 10 a 16 g/L, reduce 29% el CTP e incrementa 22% la EE. Las emisiones de CO_2 se reducen un 58%. Sin embargo, la nueva propuesta tiene un incremento casi 3 veces mayor en consumo de agua.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	12
1 INTRODUCCIÓN.....	13
2 MARCO TEÓRICO.....	15
2.1 Combustibles fósiles	15
2.1.1 Contaminación atmosférica	15
2.1.2 Gases de Efecto Invernadero	17
2.1.3 Cambio climático.....	17
2.2 Desarrollo de biocombustibles	18
2.2.1 Biocombustibles líquidos.....	19
2.2.2 Etanol	19
2.2.2.1 Propiedades físicas y químicas.....	19
2.2.2.2 Estabilidad, reactividad y corrosividad	20
2.2.3 Butanol.....	20
2.2.3.1 Propiedades físicas y químicas.....	20
2.2.3.2 Estabilidad, reactividad y corrosividad	21
2.2.4 Biocombustibles de primera generación.....	21
2.2.4.1 Materias primas	21
2.2.4.2 Producción de bioalcoholes primera generación.....	22
2.2.5 Biocombustibles de segunda generación	23
2.2.5.1 Composición de biomasa lignocelulósica	23
2.2.5.2 Producción de bioalcoholes segunda generación	25
2.2.5.3 Fermentación acetobutílica	27
2.3 Impactos ambientales en la producción de biocombustibles 2G.....	29
2.3.1 Agua.....	29
2.3.2 Emisiones.....	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo general	31

3.2	Objetivos específicos.....	31
4	METODOLOGÍA.....	32
4.1	Etapa 1. Etapa experimental.....	33
4.1.1	Producción de ácidos grasos volátiles en reactores acidogénicos	33
4.1.1.1	Sustrato.....	33
4.1.1.2	Inóculo.....	34
4.1.1.3	Procedimiento y diseño experimental	34
4.1.2	Producción de bioalcoholes en reactores solventogénicos	35
4.1.2.1.1	Sustrato	36
4.1.2.1.2	Inóculo	36
4.1.2.1.3	Procedimiento y diseño experimental.....	36
4.1.2.2	Ensayo Plackett-Burman	38
4.1.2.2.1	Preparación de inóculo	38
4.1.2.2.2	Procedimiento y diseño experimental.....	38
4.1.2.3	Métodos analíticos.....	40
4.1.2.3.1	Determinación de composición de bagazo de caña de azúcar.....	40
4.1.2.3.2	Sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas	40
4.1.2.4	Volumen y composición de biogás	40
4.1.2.5	Ácidos grasos volátiles (AGV)	40
4.1.2.6	Demanda química de oxígeno (DQO).....	41
4.1.2.7	Carbohidratos totales.....	41
4.1.2.8	Análisis estadísticos y cálculos	41
4.2	Etapa 2. Indicadores ambientales y económicos.....	43
4.2.1	Delimitación del sistema.....	43
4.2.2	Planteamiento de escenarios	43
4.2.2.1	Indicadores ambientales	44
4.2.2.1.1	Emisiones de CO ₂	44
4.2.2.1.2	Consumo de agua.....	46
4.2.2.2	Indicadores económicos	46
4.2.2.2.1	Eficiencia energética.....	46

4.2.2.2.2	Costos de producción.....	47
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1	Reactores acidogénicos	48
5.2	Reactores solventogénicos	57
5.2.1	Diseño factorial 2 ²	57
5.2.2	Diseño Plackett-Burman	60
5.3	Indicadores ambientales	65
5.3.1	Consumo de agua.....	66
5.3.2	Emisiones de CO ₂	67
5.4	Indicadores económicos	68
5.4.1	Eficiencia energética (EE)	68
5.4.2	Costos de producción.....	68
6	CONCLUSIONES	69
7	REFERENCIAS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Emisiones de CO ₂ por sector en México. Fuente: Agencia Internacional de Energía 2017.....	16
Figura 2-2. Diagrama de producción de bioalcoholes de primera generación. Fuente: Qureshi (2008).....	22
Figura 2-3. Composición general de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Mood (2013).	24
Figura 2-4. Diagrama de producción de bioalcoholes de segunda generación. Fuente: Valdez-Vazquez (2015).	25
Figura 2-5. Acidogénesis y solventogénesis. Modificado de Gheshlaghi <i>et al.</i> , 2009.	29
Figura 4-1. Metodología propuesta para el estudio multidimensional de la producción de bioalcoholes a partir de biomasa residual de caña de azúcar.	32
Figura 4-2. Bioproceso consolidado en dos fases para producción de acetona-butanol-etanol. .	33
Figura 4-3. Reactores semi-continuo para la producción de ácidos grasos volátiles.	35
Figura 4-4. Modelos de biorrefinería con tres bioprocesos: a) propuesta base y b) propuesta modificada (Valdez-Vázquez y Sánchez, 2018).	44
Figura 5-1. Desempeño de los reactores para fermentación acidogénica operados en modo semi-continuo. a) pH inicial de 4.5 y cargas orgánicas de 15 y 20 g ST/kg·d. b) pH inicial de 6.5 y cargas orgánicas de 15 y 20 g ST/kg·d.	49
Figura 5-2. Gráfico de producción total de: (a) AGV, (b) ácido acético, (c) ácido butírico y (d) ácido propiónico.....	51
Figura 5-3. Producción total de AGV en función del pH.	53
Figura 5-4. Producción de AGV en función de la carga orgánica.	55
Figura 5-5. Gráfico de producción total de: (a) butanol y (b) etanol.....	56
Figura 5-6. Cinéticas de producción de ácidos grasos volátiles y solventes (acetona-butanol-etanol) durante 11 días de incubación en los tratamientos 4, 7 y control del diseño Plackett-Burman.....	60
Figura 5-7. Consumo de agua por tonelada de caña de azúcar procesada para cada escenario. .	66
Figura 5-8. Emisiones de CO ₂ por tonelada de caña de azúcar procesada para cada escenario. .	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Estructura química de materiales de biomasa lignocelulósica.	22
Tabla 2-2. Usos agrupados del agua por sector.	30
Tabla 4-1. Diseño factorial 2^2 para estudiar el efecto del pH y carga orgánica sobre la producción de ácido acético y butírico a partir de bagazo de caña.	35
Tabla 4-2. Composición del efluente acidogénico utilizado como sustrato.	36
Tabla 4-3. Diseño factorial 2^2 para estudiar el efecto del tipo de inóculo y adición de aceptor de electrones sobre producción de bioalcoholes.	37
Tabla 4-4. Diseño Plackett-Burman para estudiar el efecto de once factores sobre producción de bioalcoholes.	39
Tabla 4-5. Reacciones bioquímicas y conversión en el reactor acidogénico.	45
Tabla 4-6. Reacciones bioquímicas y conversión en el reactor solventogénico.	45
Tabla 5-1. Análisis de varianza (ANOVA) para la producción de AGV, ácido acético, butírico, propiónico y láctico.	50
Tabla 5-2. Producción de ácidos grasos volátiles a partir de residuos orgánicos en lote.	52
Tabla 5-3. ANOVA del efecto del pH y carga orgánica sobre la producción de bioalcoholes. ..	55
Tabla 5-4. Producción de bioalcoholes en diseño factorial 2^2	57
Tabla 5-5. ANOVA del efecto del tipo de inóculo sobre la producción de butanol.	58
Tabla 5-6. Producción de bioalcoholes utilizando aceptores de electrones en el medio.	59
Tabla 5-7. Producción de solventes (acetona-butanol-etanol) en el diseño Plackett-Burman.	61
Tabla 5-8. Análisis de varianza (ANOVA) para la producción de ABE.	62
Tabla 5-9. Comparación de trabajos con los factores significativos sobre la producción de butanol.	64
Tabla 5-10. Productos en biorrefinería base vs. propuesta.	65
Tabla 5-11. Indicadores económicos en biorrefinería base vs. propuesta.	68

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación (1)	34
Ecuación (2)	41
Ecuación (3)	42
Ecuación (4)	46

1 INTRODUCCIÓN

El consumo total de combustibles fósiles aumentó aproximadamente un 51% en el período 1995-2015, y se prevé que su consumo aumentará aproximadamente un 18% en el período 2015-2035 (Yıldız, 2018). La dependencia de los sectores económicos sobre los combustibles fósiles ha resultado en el incremento en los precios de éstos, por lo que surge la necesidad de crear alternativas energéticas distintas a las convencionales como: energía hidráulica, eólica, solar y bioenergía. El uso de la bioenergía en forma de biocombustibles líquidos tiene ventajas porque posee la característica de ser almacenable y con alta densidad energética para ser utilizada en el sector transporte. Los biocombustibles líquidos como el etanol y butanol se consideran limpios y renovables y pueden contribuir para que el sector transporte sea más sostenible (Salvador, 2010).

Los biocombustibles líquidos se clasifican en función de las materias primas y tecnologías de producción, en biocombustibles de primera (1G), segunda (2G), tercera (3G) y cuarta generación (4G) (Saldini *et al.*, 2016). Los biocombustibles 1G compiten directamente con la producción de alimentos, por lo que la atención se ha centrado en los biocombustibles 2G (Hayes *et al.*, 2015). Los biocombustibles 2G utilizan como principal materia prima biomasa lignocelulósica, como pasto, maderas de bajo precio, desechos municipales y residuos agrícolas/agroindustriales (Bathia *et al.*, 2017). En México, el cultivo con mayor volumen de producción es la caña de azúcar, generando la mayor cantidad de biomasa lignocelulósica del país en forma de bagazo (Valdez-Vazquez *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2019). El procesamiento del bagazo de caña típicamente requiere de diversas etapas secuenciales, lo que encarece el proceso (Senties-Herrera *et al.*, 2014).

Además de la parte técnica, es indispensable garantizar que el proceso de producción de biocombustibles 2G, además de ser rentables, tengan bajos impactos ambientales y beneficios claros y cuantificables para las comunidades rurales (García *et al.*, 2011). Las herramientas que se proponen para esto son la huella de carbono, huella hídrica, análisis de ciclo de vida, número de empleos e ingresos, entre otros (Farrell *et al.*, 2006, Gerbens-Leenes *et al.*, 2009, Fingerman *et al.*, 2010). Por lo que resultan necesarios estudios multidimensionales que evalúen la parte tecnológica, social y ambiental, de forma integrada.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de bioalcoholes a partir de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar con un enfoque multidimensional.

La estrategia experimental estuvo dividida en dos etapas: una etapa experimental donde se evaluó la producción de ácidos grasos orgánicos (como precursores de bioalcoholes de interés) y la producción de solventes (etanol y butanol). Con ayuda de diseños experimentales, se logró evaluar diversos factores que influyen en la fermentación acetobutílica. En la segunda etapa, se calcularon indicadores socio ambientales de la cadena de producción (agronómica e industrial). Los impactos ambientales se midieron con los indicadores de huella hídrica y huella de carbono. Mientras que, para los impactos sociales, se determinó del número de empleos y los ingresos, que podrían generarse a partir de este proceso de producción de bioalcoholes, a través de modificaciones en el

escenario propuesto por Valdez-Vazquez y Sánchez (2018), que utiliza el software SuperPro Designer v 9.0.

La integración de los aspectos técnico, social y ambiental permitirá establecer criterios para la implementación de sistemas de producción de biocombustibles de segunda generación sostenibles, que servirá como referencia para la creación de futuras biorrefinerías en el país.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Combustibles fósiles

Los combustibles fósiles están formados por procesos naturales de millones de años de descomposición de materia orgánica. Estos combustibles formados a partir de los restos fosilizados, se forman por la exposición al calor y la presión en la corteza terrestre. El consumo de energía en 2015 consistió en 32.9% de petróleo, 29.2% de carbón, y 23.9% de gas natural, lo que equivale a un 86,0% del consumo de combustibles fósiles en el mundo, que son no renovables, tan solo para la producción energética primaria (Yıldız, 2018).

El sector transporte es el mayor consumidor de combustibles en México seguido de la generación de electricidad. La dependencia del sector transporte por el petróleo como fuente de energía produce condiciones cada vez más desfavorables en los ámbitos social, político y ambiental (cambio climático, contaminación atmosférica y problemas de salud) (Lenz *et al.*, 2003). De acuerdo con cifras del Balance Nacional de Energía, el consumo nacional de combustibles creció 8.5% en el periodo 2007-2017, pasando de $2.18e^{17}$ a $2.36e^{17}$ joules (J) (SENER, 2017). Para el 2017, el autotransporte representó el 90% del consumo de gasolina, seguido por la aviación nacional (7%), el transporte marítimo nacional (1.7%) y el ferroviario nacional (1.3%).

El dióxido de carbono (CO_2) es un gas de efecto invernadero que se libera durante el proceso de combustión de los combustibles fósiles, el cual se estima que para 2050 habrá aumentado al doble. Esto ha conducido a desarrollar distintas estrategias y medidas a fin de reducir el nivel de emisiones de GEI (Schafer & Victor, 1999).

2.1.1 Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica se define como la presencia en el aire de toda materia o energía que al incorporarse o actuar en la atmósfera altere o modifique su composición y condición natural (SEMARNAT, 2015). Sin embargo, cuando se generan emisiones en grandes cantidades, la atmósfera pierde su capacidad de equilibrio ocasionando con ello la alteración del ambiente natural. Los contaminantes del aire se han clasificado en dos categorías, contaminantes primarios y secundarios. Los contaminantes primarios son aquellos procedentes directamente de las fuentes de emisión, este tipo de fuente se divide a su vez en fuentes naturales y antrópicas. Los contaminantes secundarios son aquellos producidos en la atmósfera por reacciones fotoquímicas.

Actualmente la contaminación del aire se considera un problema serio en las ciudades con gran actividad industrial y tránsito vehicular (Karue *et al.*, 1992). En México, el sector transporte es uno de los mayores emisores de contaminantes anuales, en 2014 se calcularon 164,199.635 giga gramos (Gg) de CO_2 equivalente (eq), estas emisiones están divididas por sectores entre los

principales se encuentran, con un 35.1% del sector transporte, 32% del sector de generación de energía eléctrica, 13.4% al sector industrial, como se observa en la figura 1 (SENER, 2014).

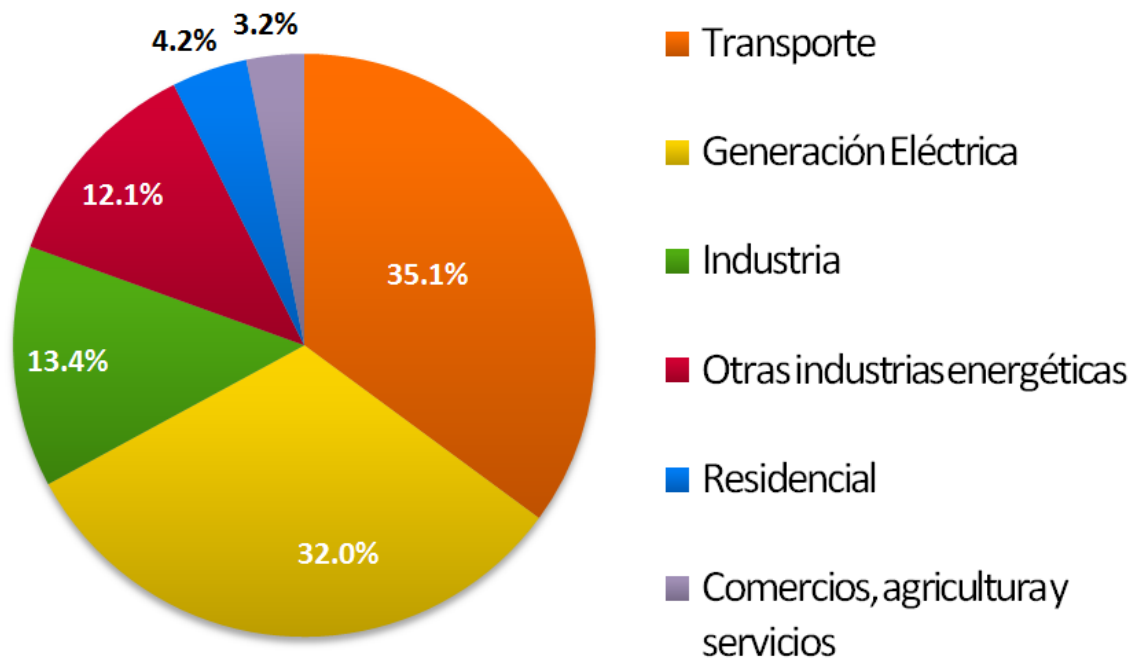


Figura 2-1. Emisiones de CO₂ por sector en México. Fuente: Agencia Internacional de Energía 2017.

2.1.2 Gases de Efecto Invernadero

Cabe resaltar que, naturalmente, existen en la atmósfera gases de efecto invernadero, conformados por dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O), vapor de agua (H₂O) y Ozono (O₃). Los cuales permiten que la radiación solar absorbida por la tierra no escape por completo de la atmósfera y así mantenga al planeta en una temperatura estable.

En México, los gases de efecto invernadero más abundantes en la atmósfera son CO₂, CH₄ y N₂O, los cuales, en el periodo de 1992-2014, crecieron en emisiones 33 %, 32% y 5%, respectivamente (SENER, 2014):

CO₂ – La cantidad de CO₂ concentrada en la atmósfera ha aumentado por actividades humanas, como la deforestación, el cambio de uso de tierra, y el uso de combustibles fósiles.

CH₄ – El humano produce este gas mediante procesos como la descomposición de basura, agricultura, especialmente el cultivo de arroz y el manejo de desechos animales utilizados como fertilizantes.

N₂O – El humano contribuye a la producción de óxido nitroso mediante el uso de fertilizantes, consumo de combustibles fósiles, producción de ácido nítrico y quema de biomasa.

Los sectores de transporte y generación de electricidad son los responsables del 67.1% de las emisiones totales a nivel nacional, que en el periodo de 1992-2014, crecieron 81% y 116%, respectivamente (SENER, 2014).

Actividades como la quema de combustibles derivados del carbono aumentan esa proporción y se produce el fenómeno de “efecto invernadero”, el cual evita que una parte del calor recibido desde el sol deje la atmósfera (estratosfera) y vuelva al espacio, produciendo un sobrecalentamiento en la superficie terrestre, dando como consecuencia el calentamiento global y finalmente un cambio climático.

2.1.3 Cambio climático

Existe una cantidad de gases de efecto de invernadero en la atmósfera que son absolutamente necesarios para regular la temperatura de la Tierra. Pero al exceder la cantidad de estos gases en la atmósfera se genera el efecto invernadero que sobrecalienta la superficie terrestre, lo cual provoca que el clima global se vea alterado por este incremento en la temperatura. Este calentamiento global, por su parte, es la manifestación más evidente del cambio climático, el cual se define como todo cambio que ocurre en el clima a través del tiempo (SEMARNAT, 2009).

El cambio climático antropogénico (i.e., causado por el hombre) se debe a la actividad industrial y de transporte principalmente. Los efectos del cambio climático son múltiples y potencialmente desastrosos para el planeta, algunos de los más importantes son:

Aumento en el nivel del mar: Esto es causado, principalmente, por el derretimiento de los polos y la expansión del agua por medio del calor. Esto podría causar la desaparición de islas e inundación de zonas costeras.

Sequías: El cambio climático provoca mayores sequías y cambios en las temporadas de lluvia, lo que ocasiona distorsiones en las épocas de cosecha y, por lo tanto, en la oferta de alimentos.

Acidificación del océano: El mar absorbe CO₂ naturalmente. Por lo tanto, al incrementarse la cantidad de CO₂, el agua se vuelve más ácida, lo que pone en peligro la sobrevivencia de los ecosistemas arrecifales, mismos que son fundamentales para muchas especies de vida marina, lo que podría generar una reacción en cadena.

Extinción de especies: La desertificación y la deforestación ponen en peligro a diversas especies, ya que se ven obligadas a desplazarse a otros hábitats cuando los ecosistemas de los que dependen para sobrevivir se ven amenazados.

Adicionalmente a los efectos ya mencionados, el cambio climático podría tener otras consecuencias, como el cambio en los patrones de migración de algunas especies, eventos climáticos más frecuentes y extremos, como tormentas y huracanes y daños en la generación de energía, entre otros (INECC, 2016).

2.2 Desarrollo de biocombustibles

Actualmente, el sistema de transporte mundial depende en un 98% del combustible fósil, lo que ha traído como consecuencia la reducción de las reservas de petróleo y el incremento de las emisiones de gases efecto invernadero causantes del calentamiento global (Agarwal, 2007; Randelli, 2009). Debido a que los sectores agrícolas y del transporte son los principales consumidores de combustibles fósiles y, por consecuencia, los que más contribuyen a la contaminación ambiental, se estima que el uso de biocombustibles en estos sectores reducirá significativamente las emisiones de los gases de efecto invernadero. Con la nueva crisis energética y el calentamiento global, existe la creciente necesidad de producir combustibles más baratos y limpios. Como resultado, en muchas partes del mundo se han establecido monocultivos a gran escala de diversas plantas para obtener biocombustibles. Ejemplo de ello es la producción de etanol en Brasil y en Estados Unidos a partir de la caña de azúcar y del maíz, respectivamente (Álvarez–Maciel, 2009).

De acuerdo a la Ley de Promoción y Desarrollo de los bioenergéticos, los biocombustibles se definen como los combustibles sólidos, líquidos o gaseosos, que se obtienen a partir de biomasa de actividades agrícolas, pecuarias, silvicultura, acuacultura, algacultura, residuos de pesca, residuos domésticos, comerciales e industriales, que pueden utilizarse para cualquier aplicación

energética (térmica, eléctrica o mecánica) y son clasificados como biocombustibles de primera, segunda y tercera generación. Actualmente, algunos combustibles de origen biológico son mezclados con combustibles fósiles en pequeñas cantidades (5-10%), proporcionando una reducción en la emisión de gases de efecto invernadero.

2.2.1 Biocombustibles líquidos

La producción de biocombustibles líquidos a partir de biomasa ha sido un gran logro de la biotecnología, porque son una fuente renovable y abundante en lugares donde los combustibles líquidos derivados de petróleo no están disponibles (Tai y Stephanopoulos, 2013). En años recientes se han estudiado los impactos económicos y ambientales de la producción de biocombustibles como etanol, butanol, metano, hidrógeno y biodiésel. Resaltando la importancia del estudio de la producción de bioalcoholes, debido a que es una tecnología capaz de sustituir el consumo de combustibles derivados de petróleo (Chisti y Yan, 2011), principalmente aquellos destinados para el sector de transporte. Además ofrece ventajas ambientales como la reducción de emisiones de GEI hasta el 70-90% con respecto a los combustibles fósiles (Timilsina y Mevel, 2013).

2.2.2 Etanol

El alcohol etílico, también conocido como etanol, es un líquido de baja densidad y alta fluidez con alto calor de combustión. La fórmula química del alcohol etílico es C_2H_5OH y su fórmula extendida es CH_3CH_2OH . Su molécula está formada por una cadena de dos carbonos (etano), en la que un H ha sido sustituido por un grupo hidroxilo (-OH).

El etanol producido a partir de la caña de azúcar tiene tasas de reducción de entre el 40 y el 62% de las emisiones de GEI en comparación con la gasolina. Los azúcares fácilmente fermentables como la sacarosa, la glucosa y la fructosa se convierten directamente en etanol durante la fermentación alcohólica, mientras que el almidón, la celulosa y la hemicelulosa necesitan ser hidrolizados a azúcares simples para ser fermentados (Wang, 2011).

2.2.2.1 Propiedades físicas y químicas

El etanol es un líquido transparente, incoloro con un olor y sabor característico. La masa molar del alcohol etílico es de 46.06 g / mol. Su punto de fusión y de ebullición son de -114 °C y 78 °C, respectivamente. Es un líquido volátil y su densidad es 0.789 g/ ml. El alcohol etílico es también inflamable y produce una llama azul sin humo. Es miscible en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos tales como ácido acético, acetona, benceno, tetracloruro de carbono, cloroformo y éter (Wang *et al.*, 2011).

2.2.2.2 Estabilidad, reactividad y corrosividad

El etanol es clasificado como un compuesto estable, volátil y altamente inflamable. Se encenderá fácilmente por el calor o algún punto de ignición. Los vapores pueden formar mezclas explosivas con el aire. El etanol es tóxico cuando se ingiere en grandes cantidades, actúa en el sistema nervioso central. También es irritante para los ojos y la nariz. Es altamente inflamable y reacciona violentamente con peróxidos, cloruro de acetilo y bromuro de acetilo. Cuando entra en contacto con algunos catalizadores de platino puede encenderse. Los síntomas en caso de inhalación son: tos, dolor de cabeza, fatiga, somnolencia. Puede producir piel seca. Si la sustancia entra en contacto con los ojos producirá enrojecimiento, dolor o sensación de ardor. Si se ingiere produce sensación de quemazón, dolor de cabeza, confusión, mareo e inconsciencia (IPCS, 1994.).

2.2.3 Butanol

El butanol (alcohol butílico o 1-butanol) es un alcohol primario constituido por 4 carbonos cuya fórmula es $C_4H_{10}O$; es un líquido incoloro, flamable, con un olor característico, su vapor irrita las membranas mucosas produciendo un efecto narcótico a altas concentraciones. El butanol es miscible en solventes orgánicos comunes y parcialmente miscible en agua (Lee *et al.*, 2008).

El butanol es un biocombustible altamente eficiente que recientemente ha merecido una atención renovada debido a su potencial como sustituto para la gasolina. El butanol se produce biológicamente mediante la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) por especies de *Clostridium* que son bacterias estrictamente anaerobias (Al-Shorgani *et al.*, 2012; Chandrasekaran y Bahkali, 2013). El butanol como combustible ofrece muchas ventajas superiores al etanol, incluido su alto contenido energético, naturaleza menos corrosiva, bajo punto de congelación, alto índice de octano, alta hidrofobicidad y el hecho de que puede mezclarse con gasolina o usarse directamente en los motores actuales sin modificaciones (Dürre, 2007).

2.2.3.1 Propiedades físicas y químicas

Punto de ebullición de 92.6°C a presión atmosférica. Es miscible con la mayoría de los disolventes orgánicos usuales, como alcoholes, cetonas, ésteres, etc. En condiciones normales de utilización es un producto estable. Con oxidantes fuertes, como sulfúrico, nítrico o peróxido de hidrógeno, la reacción puede ser peligrosa. La mayoría de los metales son insensibles a la acción del n-butanol, pero en determinadas condiciones puede reaccionar con aluminio produciendo hidrógeno (INSP, 2011).

2.2.3.2 Estabilidad, reactividad y corrosividad

El n-butanol es un compuesto estable en condiciones normales. Su calentamiento puede formar monóxido y dióxido de carbono, no representa ningún riesgo de polimerización (Sanz., 2016).

Es un compuesto altamente inflamable, liberando vapores que forman mezclas inflamables y explosivas. Estos vapores pueden viajar a una fuente de ignición y volverse explosivos con el aire. Debido a una mayor densidad que el aire, los vapores de n-butanol se dispersan a lo largo del suelo y se acumulan en áreas confinadas. Es por ello que su almacenamiento debe realizarse en sitios con buena ventilación y alejados de toda fuente de ignición.

2.2.4 Biocombustibles de primera generación

Son aquellos que utilizan como materia prima cultivos alimentarios. Actualmente, se producen y comercializan en cantidades significativas, estando en una fase de aplicación avanzada. La mejora de estos biocombustibles se centra en reducir los costos de producción, optimizar el balance energético, mejorar los rendimientos energéticos de los motores de combustión e incrementar los porcentajes de mezcla con los combustibles fósiles (Saladini *et al.*, 2016).

2.2.4.1 Materias primas

Para la producción de los biocombustibles de primera generación se han empleado productos como el maíz, la caña de azúcar, tubérculos, soya, remolacha azucarera, madera, agave, y otras materias primas ricas en carbohidratos fermentables. Sin embargo, este tipo de productos compiten directamente con la alimentación, y compiten también por el uso de suelo y del agua. Los aceites vegetales destinados a la producción de biodiesel se obtienen, en la actualidad, por procedimientos convencionales a partir de semillas oleaginosas como girasol y soya son las más utilizadas. La caña de azúcar es el cultivo azucarado más utilizado para la producción de etanol en los países de clima cálido como Brasil, mientras que en Europa se utiliza la remolacha.

El bagazo de caña de azúcar es el desecho que queda después de la molienda y cosecha de caña de azúcar. Está formado por un conjunto de partículas de diferentes tamaños cuyo promedio oscila alrededor de 2 a 2.5 mm, el resto consta de sólidos solubles e insolubles. Es utilizado normalmente como combustible en las calderas que dan energía a los ingenios. Las propiedades fisicoquímicas de la biomasa lignocelulósica de la caña de azúcar, dependen de las condiciones climáticas y del terreno donde se hayan generado. En la tabla 1, se muestran valores promedio reportados en la literatura.

Tabla 2-1. Estructura química de materiales de biomasa lignocelulósica.

Componente (%)	Maderas duras	Bagazo de caña	Paja de trigo	Paja de arroz
Celulosa	40-50	43-47	38-42	34-36
Hemicelulosa	23-33	28-32	28-32	24-30
Lignina	18-23	20-22	19-23	22-23
Extractivos	1.5-2	2.5-3	3-5	2-3
Cenizas	1.5-3.5	1.5-2.5	4-6	17-19

Fuente: Wiselogel *et al.*, (1996).

2.2.4.2 Producción de bioalcoholes primera generación

La producción de bioalcoholes es un proceso relativamente sencillo que ocurre en dos etapas. La primera etapa es la cosecha de los cultivos en la cual se somete a un proceso de lavado de la materia y posteriormente se muele para la extracción de los jugos. La segunda etapa es la fermentación de la materia prima, la cual ha dado lugar a un incremento en el interés de encontrar recursos alternativos y fuentes que sirvan como materias primas para la producción del mismo. Por ejemplo, la caña panelera es muy usada debido a su gran rendimiento en cuanto a producción de bioetanol (Orjuela *et al.*, 2011).

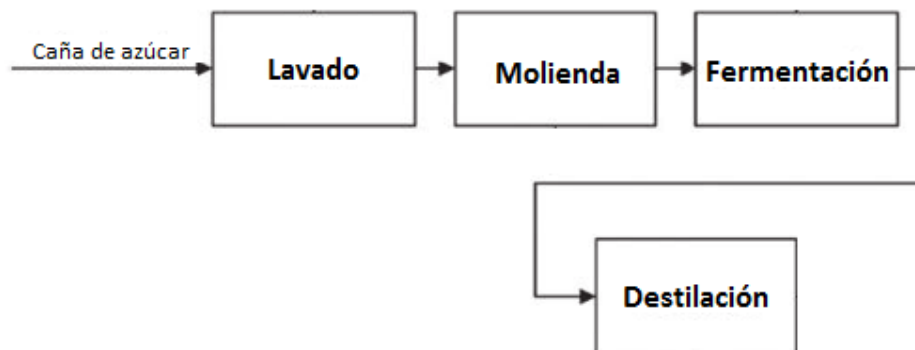


Figura 2-2. Diagrama de producción de bioalcoholes de primera generación. Fuente: Qureshi (2008).

2.2.5 Biocombustibles de segunda generación

Son aquellos biocombustibles que se obtienen a partir de biomasa lignocelulósica. A pesar de que existen ya tecnologías muy prometedoras de conversión de biomasa lignocelulósica en biocombustibles, todavía su producción no se encuentra a escala industrial y se limita a plantas de demostración. Las ventajas de estos biocombustibles son el costo nulo o muy reducido de la materia prima (hecho que puede cambiar cuando la industria este establecida), y un mayor rango de materias primas a emplear que no compiten con el mercado alimentario.

2.2.5.1 Composición de biomasa lignocelulósica

Una característica de la producción de los biocombustibles de segunda generación es el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica de las plantas. La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente por proteínas, carbohidratos, celulosa, hemicelulosa, lignina y material mineral (Medina *et al.*, 2011). Esta biomasa destinada a la producción de biocombustibles líquidos puede dividirse en seis grupos: 1) residuos agrícolas (bagazos de caña de azúcar, de maíz y de sorgo azucarado, paja de trigo, de arroz y de cebada, hueso de aceituna y pulpa); 2) maderas duras (álamo, chopo); 3) maderas blandas (pino, abeto); 4) residuos celulósicos (papel de periódico, residuos de papel de oficina, lodos de papel reciclado); 5) biomasa herbácea (alfalfa, pasto varilla, alpiste, limoncillo); y 6) residuos sólidos urbanos (RSU) (Sanchez y Cardona, 2008).

La **celulosa** es el constituyente principal de la biomasa lignocelulósica, es un polisacárido que consiste en una cadena lineal de D-glucosa unida por enlaces β - (1,4) -glicosídicos entre sí. Las cepas de celulosa se asocian para formar fibrillas de celulosa. Las fibras de celulosa están unidas por una serie de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares (Li *et al.*, 2010). Por lo tanto, la celulosa es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos (Swatloski *et al.*, 2002). Su fórmula química sumaria es (C₆H₁₀O₅). La celulosa posee dos estructuras una amorfa (baja cristalinidad) y cristalina (alta cristalinidad). La cristalinidad de la celulosa se puede caracterizar por el índice de cristalinidad, el cual es determinado por espectroscopía infrarroja, NMR (Martínez *et al.* 1990). Cuanto mayor es el índice de cristalinidad, más difícil es la biodegradación de la celulosa. Mientras tanto, las microfibrillas de celulosa también se unen entre sí por hemicelulosa y/o pectina y se cubren con lignina. Tal estructura especializada y complicada hace que la celulosa sea resistente a degradación biológica y química (Atalla y VanderHart, 1984). La celulosa consiste en “empaquetados” denominados “fibras”, estas fibras de celulosa son en su mayoría independientes y débilmente vinculados a través de uniones de hidrógeno (Laureano-Pérez *et al.*, 2005).

La **hemicelulosa** ubicada en las paredes celulares secundarias, son biopolímeros ramificados heterogéneos que contienen pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa), hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, α -D galactosa) y/o ácidos orgánicos (ácidos α -D-glucurónico, α -D-4-O-

metilgalacturónico y α D-galacturónico) (Girio *et al.*, 2010). Son relativamente fáciles de hidrolizar debido a su estructura amorfa y ramificada (con cadena lateral corta), así como a su menor peso molecular (Li *et al.*, 2010). Para aumentar la digestibilidad de la celulosa, se deben eliminar grandes cantidades de hemicelulosa, ya que cubren las fibrillas de celulosa, lo que limita su disponibilidad para la hidrólisis enzimática (Agbor *et al.*, 2011).

La **lignina** es un componente importante de las paredes celulares de las plantas debido a su función como barrera para la hidrólisis enzimática de la biomasa. Está formado por un heteropolímero amorfo que consta de tres diferentes unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferil y sinapil alcohol) que se mantienen unidos por diferentes enlaces. El heteropolímero amorfo no es soluble en agua y ópticamente inactivo; todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy complicada (Brienzo *et al.*, 2015).

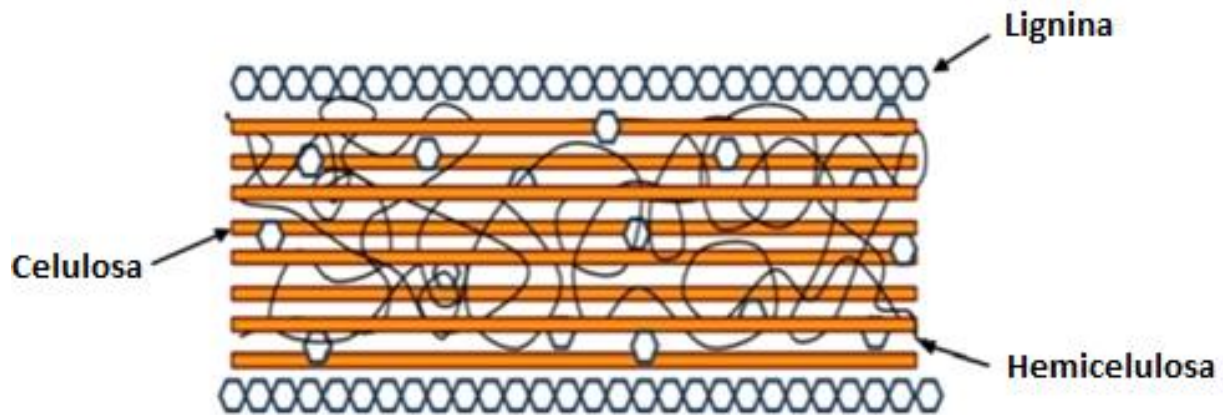


Figura 2-3. Composición general de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Mood (2013).

2.2.5.2 Producción de bioalcoholes segunda generación

La conversión de la biomasa lignocelulósica en biocombustibles se realiza en varias etapas. La primera es la molienda del sustrato, posteriormente se somete a un pretratamiento, que tiene como objetivo disociar la conformación vegetal, solubilizar total o parcialmente la lignina y la hemicelulosa y reducir la cristalinidad de la celulosa. La segunda etapa es la hidrólisis de la celulosa, dando lugar a la recuperación de azúcares fermentables. La tercera es la fermentación de los monosacáridos vía biológica y la última es la obtención de los alcoholes por destilación, ver figura 4.



Figura 2-4. Diagrama de producción de bioalcoholes de segunda generación. Fuente: Valdez-Vazquez (2015).

Pretratamiento. Es una etapa fundamental para el procesamiento de biomasa lignocelulósica que complementa la hidrólisis enzimática y posibilita la obtención de altos rendimientos. Es necesario porque la lignina en las paredes celulares de la planta forma barreras que impiden la hidrólisis enzimática. En resumen, es con la finalidad de reducir el contenido de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial (Krishna *et al.*, 2001). Para esta etapa existen diversos tipos de pretratamiento.

El de ultrasonido, técnica utilizada para extraer la lignina y la hemicelulosa (Yu *et al.*, 2009). El térmico, en este tipo de pretratamiento la materia prima es calentada en un rango de 150 a 180°C, donde la hemicelulosa y la lignina son solubilizadas (Bobleter, 1994), puede llevarse a cabo por explosión en vapor (Duff y Murray, 1996) y por agua líquida a alta temperatura (LHW, por sus siglas en inglés liquid hot water).

El pre-tratamiento físico-químico se lleva a cabo por el proceso de explosión de fibra con amonio (AFEX, por sus siglas en inglés Ammonia Fiber Explosion) (Alizadeh *et al.*, 2005) o por la explosión de CO₂, el cual incrementa el rendimiento de glucosa en 50-70% de bagazo (Zheng *et al.*, 1998).

El pretratamiento químico se lleva a cabo por medio de hidrólisis ácida, el cual utiliza diferentes ácidos (sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico) (Galbe y Zacchi, 2002), y en el cual la lignina es rápidamente condensada (Liu y Wyman, 2003).

El tratamiento de oxidación húmeda (Hon y Shiraishi, 2001), el tratamiento con ozono (Sun y Cheng, 2002), el tratamiento con hidrólisis alcalina y el tratamiento con solventes orgánicos (Sánchez y Cardona, 2005) o biosolventes orgánicos (Itoh *et al.*, 2003). Los pretratamientos biológicos tienen el objetivo de degradar la lignina y la hemicelulosa las cuales se someten a la acción de determinadas enzimas o microorganismos tales como hongos.

Hidrólisis enzimática. Es un proceso catalizado por enzimas denominadas celulasas, cuyo propósito es la degradación de la celulosa. Las enzimas del complejo celulasa y el mecanismo de la hidrólisis enzimática rompen los enlaces β -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de las moléculas de celulosa. Las enzimas se obtienen de cultivos fúngicos y bacterianos mixtos, aislados en laboratorio (Riñao *et al.*, 2010).

Fermentación. La fermentación alcohólica es un proceso biológico en ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (como pueden ser la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.). La fermentación de hexosas, tiene como principal función producir energía. Algunas de las bacterias empleadas son: *Zimomonas mobilis*, *Erwinia amilovor*a, *Spirocheta aurantia*, *Streptococcus lactis*, *Spirocheta litorales* y *Spirocheta stenostrepta*, con resultados satisfactorios en cuanto a productividad. Un gramo de cualquier hexosa produce unas 4 kilocalorías de energía. La fermentación acetobutílica, es un proceso por medio de bacterias de los géneros *Clostridium* (*Clostridium sporogenes*, *Clostridium indolicus*, *Clostridium sphnoides*, *Clostridium saccharobutyricum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum* y *Clostridium thermocellum*), que degradan grandes cantidades de celulosa y otros polisacáridos. Igualmente, se han empleado bacterias modificadas genéticamente para la degradación tanto de hexosas como de pentosas. La fermentación por levaduras generalmente es más lenta en la ejecución, aunque son los microorganismos de mayor uso en la producción de etanol, debido a su productividad, baja producción de inhibidores y facilidad de separación después de la fermentación. En dichos procesos se emplean levaduras de los géneros *Candida* (*seudotropicalis*), *Saccharomyces* (*cerevisiae*, *ellipsoideus*, *anamensisi*, *carlsbergensis*) y *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces fragilis* (Krishna *et al.*, 2001). La levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* es la más utilizada en la fermentación de los azúcares a etanol ya que de forma eficaz transforma los azúcares de seis carbonos en etanol. Pero el sustrato orgánico vegetal además de tener hexosas como la glucosa también tiene pentosas como es el caso de la xilosa. Los azúcares de cinco carbonos no son metabolizados por las levaduras y como consecuencia no son utilizados como fuentes de carbono. Esto hace disminuir el rendimiento del proceso ya que parte de los azúcares presentes en el medio de cultivo no se pueden transformar a etanol. La fermentación fúngica ofrece ventajas como reducción de costos, fácil adquisición, entre otras; que coexisten con desventajas como los largos tiempos de residencia que requieren. Dentro de ellos se encuentran

hongos como *Mucor racemosus*, del género *Rhizopus* y *Aspergillus*. El uso de co-cultivos o cultivos mixtos de microorganismos ya sean del mismo o diferente tipo también ha sido empleado, con el fin de acelerar el proceso de fermentación o de complementar la acción de los microorganismos para obtener mayores rendimientos en la tasa de conversión de azúcares a etanol.

Los factores que intervienen en la fermentación alcohólica son:

pH. Dado que los microorganismos poseen un pH óptimo de crecimiento y actividad, existe una dependencia de la velocidad de crecimiento de los microorganismos con el pH. El cambio en el pH se da por la desnaturalización de enzimas y por el intercambio de iones en la membrana celular. En la fermentación los valores de pH entre 4 y 6 generalmente favorecen el crecimiento y la fermentación acetobutílica (Bahl et al., 1982).

Temperatura. El crecimiento de los microorganismos que favorecen la fermentación alcohólica está directamente asociado con los cambios de temperatura; si la temperatura es alta (34 - 47°C) la fermentación transcurre más rápido, sin embargo, si la temperatura es más baja (<10°C) los microorganismos se inactivan (Stein et al., 2017).

Nutrientes. Un medio de cultivo debe de tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, para esto se debe tener en cuenta, además de los azúcares que representan fuentes de energía para los microorganismos, otras sustancias que favorecen su desarrollo principalmente compuestos como nitrógeno, fósforo, carbono, azufre y potasio (Park et al., 1989).

2.2.5.3 Fermentación acetobutílica

La fermentación acetobutílica o también llamada (acetona-butanol-etanol (ABE) fue el primer proceso biológico utilizado para la producción de solventes. Esta fermentación se desarrolló por primera vez para producir acetona utilizada en municiones en el Reino Unido en 1912, la cual era empleada para la producción de un tipo de pólvora sin humo (Kraemer et al., 2011). Pero perdió su competitividad en la década de 1960 debido a la depresión de la economía mundial (Zverlov et al., 2006) (Green et al., 2011). Dado que la separación de butanol de ABE cuesta aproximadamente 54% y 73% de la densidad de energía de butanol, respectivamente mediante fraccionamiento directo y destilación, algunos investigadores de la fermentación ABE especulan si ABE podría mezclarse directamente con diésel en consideración del alto requerimiento de energía de obtener butanol.

La fermentación ABE es un proceso bacteriano, empleado para la producción de acetona, butanol, etanol a partir de un flujo de carbohidratos. Es un proceso estrictamente anaerobio, donde el n-butanol es el producto con mayor valor. La fermentación biológica y la purificación de la solución mixta de acetona-butanol-etanol (ABE) de biomasa es el método principal para producir

bioalcoholes, este utiliza bacterias del género *Clostridium* para metabolizar los azúcares, ácidos orgánicos y polialcohol en el ambiente anaerobio (Lee *et al.*, 2008). La proporción típica de acetona, butanol y etanol es 3:6:1 durante el proceso de fermentación, con concentraciones de n-butanol de hasta 12 g/L y rendimientos de alrededor de 30% sobre la glucosa consumida (Kujawski *et al.*, 2014).

Nithyanandan *et al.* (2014) probaron las características de combustión de las mezclas de ABE-gasolina en el motor, y descubrieron que no había un cambio perceptible para la relación de mezcla inferior al 40 % en volumen, pero se incrementó su eficiencia de combustión.

Los microorganismos empleados para realizar la fermentación ABE generalmente son clostridia sacarolíticos solventogénicos, entre los que destacan *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum* y *Clostridium saccharobutylaceticum*. La especie más empleada es la *Clostridium acetobutylicum* cuyo genoma fue liberado en 2001. Esta cepa tiene la ventaja de que es capaz de metabolizar una gran cantidad de sustratos: glucosa, galactosa, celobiosa, manosa, xilosa y arabinosa. Además, libera una gran cantidad de enzimas distintas al medio, entre las que se incluyen las α y β -amilasas, α y β -glucosidasas, pululanasa y amilopululanasa (Lee *et al.*, 2008).

La fermentación ABE transcurre en dos fases consecutivas. Durante la primera fase de crecimiento activo, denominada acidogénesis, la glucosa es metabolizada a través de la glucólisis para formar ácido pirúvico y acetyl-CoA (con liberación de dióxido de carbono e hidrógeno), que son finalmente convertidos en ácido butírico y acético (Figura 5). En la segunda fase, que no es de crecimiento sino una fase estacionaria denominada solventogénesis, los ácidos son convertidos en una mezcla de disolventes acetona-butanol-etanol, cuya composición final es aproximadamente 3:6:1. Algunas cepas modificadas muestran una capacidad más favorable hasta la formación de n-butanol, con una relación de estos compuestos de 3:16:1, y con concentraciones de n-butanol de hasta 26 g/L y rendimientos del 40-50% sobre la glucosa consumida (Kujawski *et al.*, 2014).

Actualmente, la separación de los solventes producidos en el proceso ABE se lleva a cabo mediante destilación. Sin embargo, se están haciendo grandes esfuerzos para encontrar vías alternativas para las operaciones posteriores de transformación, como son la separación por membranas, arrastre con gas, etc.

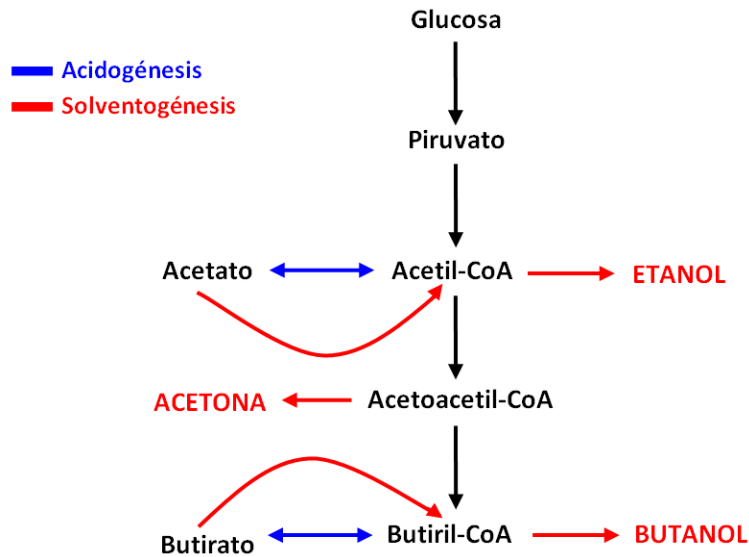


Figura 2-5. Acidogénesis y solventogénesis. Modificado de Gheshlaghi *et al.*, 2009.

2.3 Impactos ambientales en la producción de biocombustibles 2G

La producción de biocombustibles debe abordarse desde una perspectiva multidimensional. La evaluación de dichos impactos hace necesario utilizar valores claros, objetivos y generales llamados indicadores. Un indicador es una variable seleccionada y cuantificada que nos permite ver una tendencia o cambio que de otra forma no es fácilmente detectable. A pesar de que existe una gran variabilidad en el tipo de indicadores, algunas características que estos deben reunir son: estar estrechamente relacionados con los requisitos a evaluar, ser adecuados al objetivo perseguido, ser sensibles a un amplio rango de condiciones, tener habilidad predictiva, ser expresados en unidades equivalentes por medio de transformaciones apropiadas (Escala cualitativa), ser de fácil recolección y uso, deben de ser confiables, no deben de ser sesgados, ser sencillos de interpretar y no ambiguos, Ser robustos e integradores (brindar y sintetizar buena información) y de características universales, pero adaptados a cada condición en particular. (Sarandón, 2011)

2.3.1 Agua

Según estimación de la FAO, el sector agrícola ocupa el 70% de la extracción total a nivel mundial. Este indicador se encarga de medir en porcentaje, la disponibilidad y reúso de agua para el subsistema agrícola y de transformación (Tabla 2).

Tabla 2-2. Usos agrupados del agua por sector.

Uso agrupado	Origen		Volumen total (miles de millones de m3)	Extracción (%)
	Superficial (miles de millones de m3)	Subterráneo (miles de millones de m3)		
Agrícola	41.04	20.78	61.82	75.72
Abastecimiento público	4.74	7.22	11.96	14.65
Industria autoabastecida	1.41	1.93	3.34	4.09
Energía eléctrica excluyendo hidroelectricidad	4.09	0.44	4.53	5.55
Total	51.28	30.37	81.65	100

Fuente: Estadística del Agua en México (CONAGUA, 2014).

Es por esta razón que resulta prioridad hacer una evaluación del consumo de agua en los agrosistemas de caña de azúcar que brindan los residuos lignocelulósicos para la producción de bioalcoholes, a fin de determinar el grado de impacto.

2.3.2 Emisiones

Este indicador se encarga de medir emisiones de gases efecto invernadero de los vehículos automotores utilizados en el subsistema agrícola, de transformación y emisiones por el uso de biocombustibles. Los GEI, definidos en el protocolo de Kioto el año 1997, forman una capa permanente en la parte media de la atmósfera que impide que toda la radiación solar que es devuelta por la tierra pueda salir, provocando con ello que la temperatura bajo la capa aumente.

De acuerdo al Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero 2015 se emitieron 683 millones de toneladas de bióxido de carbono equivalente (MtCO₂e) de GEI. El gas más relevante que emite nuestro país es el bióxido de carbono con 71% de las emisiones, seguido del metano con 21%. Del total de las emisiones, 64% correspondieron al consumo de combustibles fósiles; 10% se originaron por los sistemas de producción pecuaria; 8% provinieron de los procesos industriales; 7% se emitieron por el manejo de residuos; 6% por las emisiones fugitivas por extracción de petróleo, gas y minerías y 5% se generaron por actividades agrícolas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la producción de bioalcoholes a partir de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar con un enfoque multidimensional.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la carga orgánica y pH sobre la producción de ácidos grasos volátiles a partir de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar en reactores de pretratamiento biológico.
- Maximizar la producción de acetona-butanol-etanol a partir de hidrolizados biológicos de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar.
- Determinar los costos y los impactos ambientales de la producción de acetona-butanol-etanol a partir de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar.

4 METODOLOGÍA

El presente trabajo es un estudio multidimensional de la producción de bioalcoholes a partir de biomasa lignocelulósica residual de caña de azúcar. Las actividades realizadas se dividieron en dos etapas: 1) producción de bioalcoholes a partir de bagazo de caña de azúcar, y 2) determinación indicadores económicos y ambientales (Figura 6).

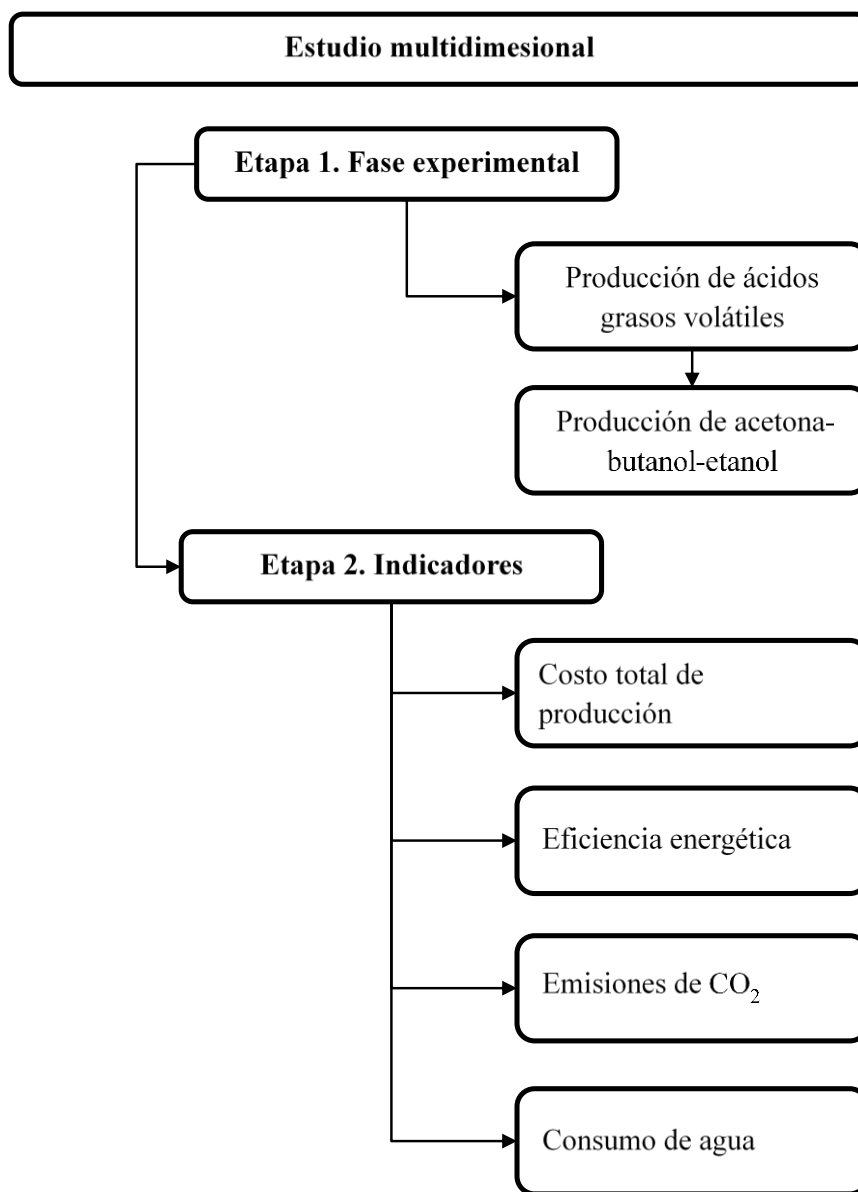


Figura 4-1. Metodología propuesta para el estudio multidimensional de la producción de bioalcoholes a partir de biomasa residual de caña de azúcar.

4.1 Etapa 1. Etapa experimental

La etapa 1 consistió en trabajo experimental enfocado en desarrollar un bioproceso consolidado en dos fases (Figura 7): el reactor R1, produce ácidos grasos volátiles (AGV) a partir de bagazo de caña de azúcar; el reactor R2, se alimenta con bagazo gastado y AGV generados en el R1, los cuales sirven como precursores de acetona y butanol en la fermentación acetobutílica. En ambos reactores, actúan consorcios microbianos que llevan a cabo de forma simultánea la hidrólisis y fermentación de carbohidratos, por lo que tanto el R1 como R2 se consideran un bioproceso consolidado.

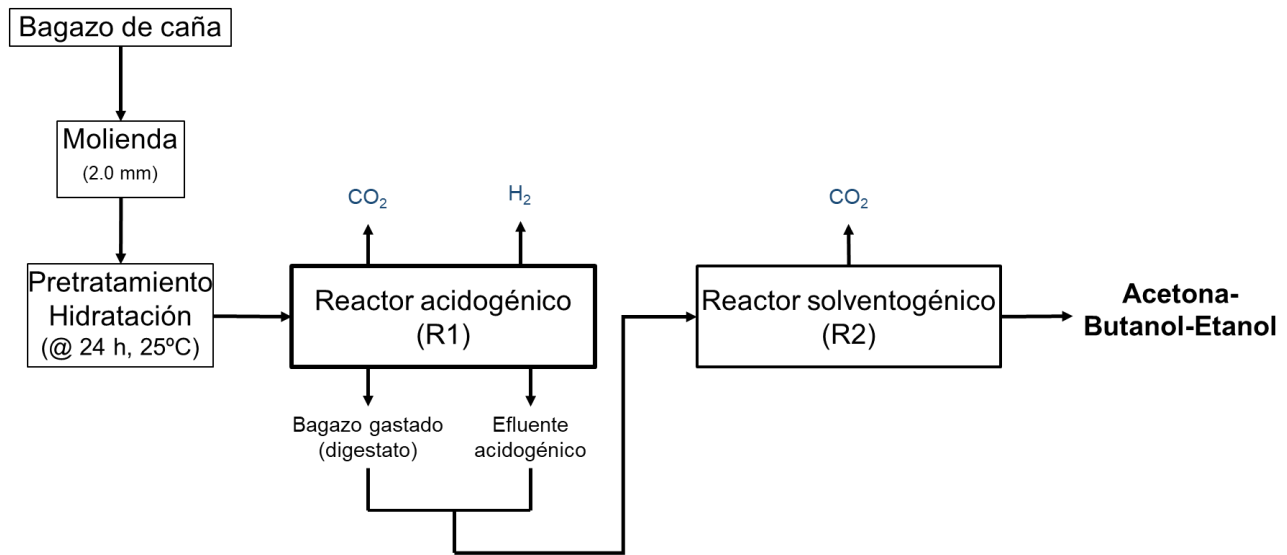


Figura 4-2. Bioproceso consolidado en dos fases para producción de acetona-butanol-etanol.

4.1.1 Producción de ácidos grasos volátiles en reactores acidogénicos

4.1.1.1 Sustrato

El sustrato consistió de bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) recolectado en 2017 proveniente de la industria azucarera (Ingenio San Cristóbal), localizado en el estado de Veracruz, México (latitud $18^{\circ} 22.291'N$, longitud $95^{\circ} 44.457'O$ a una elevación de 13 m), las cuales fueron almacenadas y transportadas en bolsas plásticas a temperatura ambiente (temperatura promedio de $25^{\circ}C$ y humedad relativa de 23 %). El bagazo fue molido previamente por el proceso de producción de azúcar y posteriormente en el laboratorio con una licuadora industrial. Este bagazo se pasó por un tamiz de malla de 2.0 mm, se recuperaron las partículas que pasaron por dicho tamiz las cuales fueron almacenadas en bolsas plásticas a temperatura ambiente (temperatura promedio de $25^{\circ}C$ y humedad relativa de 23 %).

La composición del bagazo de caña de azúcar por kilogramo de masa seca se determinó utilizando un analizador de fibras Ankom A2000 (New York, USA) de acuerdo a protocolos previamente publicados (van Soest *et al.*, 1963; APHA 1998; Sluiter *et al.*, 2008): sólidos totales (ST) 938 g, sólidos volátiles (SV) 912 g, celulosa 391 g, hemicelulosa 274 g, lignina 163 g, extractivos 84 g, y cenizas 26 g.

4.1.1.2 Inóculo

El inóculo consistió del consorcio microbiano nativo presente en el bagazo de caña de azúcar. Este consorcio microbiano nativo posee microorganismos con capacidad hidrolítica y fermentativa para sustratos lignocelulósicos (Pérez-Rangel *et al.*, 2015; Valdez-Vázquez *et al.*, 2017).

4.1.1.3 Procedimiento y diseño experimental

Los reactores consistieron de botellas anaerobias (Bellco Glass, Vineland, NJ, USA) de 1 L con un volumen de trabajo de 0.66 L. La operación se realizó en condiciones mesofílicas (37 °C) con un tiempo de retención de sólidos (TRS) de 6.6 días. Se utilizó un medio de cultivo para ajustar la carga orgánica de los reactores, y cuya composición por litro fue: urea 0.3 g, KH₂PO₄ 2.4 g, y K₂HPO₄ 0.46 g. Los reactores se operaron en modo semi-continuo, por lo que, a intervalos de tiempo definidos, los reactores fueron purgados con una masa conocida (definida por el tiempo de residencia, eq. 1), y cargados con alimentación fresca (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005). Posterior a cada alimentación los reactores se cerraron herméticamente con aire en la fase gaseosa.

$$\text{alimentación (g/día)} = \frac{\text{masa del reactor (g)}}{\text{tiempo de retención de sólidos (día)}} \quad (1)$$



Figura 4-3. Reactores semi-continuo para la producción de ácidos grasos volátiles.

Se utilizó un diseño factorial 2^2 para estudiar el efecto del pH y la carga orgánica sobre la producción de ácido acético y ácido butírico. De este modo, se tuvieron los periodos de operación I y II (Tabla 3). Cada condición de operación se realizó por duplicado.

Tabla 4-1. Diseño factorial 2^2 para estudiar el efecto del pH y carga orgánica sobre la producción de ácido acético y butírico a partir de bagazo de caña.

Periodo	Carga orgánica (g ST/L·d)	Tiempo de residencia (d)	pH inicial	Frecuencia de alimentación
Periodo I	15	6.6	6.5	Dos veces a la semana
	20			
Periodo II	15	6.6	4.5	Dos veces a la semana
	20			

4.1.2 Producción de bioalcoholes en reactores solventogénicos

En esta fase se operaron reactores en lote para establecer condiciones que favorecen la solventogénesis para la producción de acetona-butanol-etanol (Figura 7) con consorcios microbianos. Se utilizaron dos diseños experimentales: 1) un diseño factorial 2^2 donde los factores estudiados fueron tipo de inóculo y adición de un aceptor de electrones, 2) un diseño Plackett-Burman donde se estudió el efecto de once factores sobre la producción de bioalcoholes.

4.1.2.1.1 Sustrato

El sustrato consistió en un efluente acidogénico obtenido durante la operación de los reactores acidogénicos (sección 4.1.1). Se colectó un lote de 10 L del efluente acidogénico el cual se conservó a un pH de 3 adicionando H₂SO₄ y se almacenó a una temperatura de 4 °C en recipientes de vidrio hasta su uso. Los efluentes fueron caracterizados utilizando métodos previamente publicados, cuya composición se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4-2. Composición del efluente acidogénico utilizado como sustrato.

Componente	Valor	Método	Referencia
Acetona (mg/L)	29		
Etanol (mg/L)	173		
Butanol (mg/L)	5	Cromatografía de líquidos (HPLC)	Carrillo-Reyes & Buitron (2016)
Ác. acético (g/L)	7		
Ác. butírico (g/L)	0.4		
Ác. propiónico (g/L)	0.8		
Otros ácidos (g/L)	0.2		
Demanda química de oxígeno (DQO, g/L)	32	Colorimétrico reflujo cerrado	Metcalf <i>et al.</i> , (2003)
Carbohidratos totales (g/L)	9	Fenol-ácido sulfúrico	Dubois <i>et al.</i> , (1956)

4.1.2.1.2 Inóculo

Se utilizaron dos tipos de inóculo. El primer inóculo consistió de un lodo granular anaerobio tratado a 105 °C/24 h (Muñoz-Paéz *et al.*, 2019). La composición promedio del lodo granular tratado por gramo de masa seca se determinó de acuerdo a protocolos previamente publicados (APHA 1998): sólidos totales 0.9 g, y sólidos volátiles 0.6 g. El segundo inóculo consistió de un digestato de un reactor acidogénico en lote que fue cargado con bagazo de agave, a un pH inicial de 6.5, un contenido de sólidos totales de 12%, el cual fue incubado durante 7 días. Este digestato también fue tratado a 105 °C/24 h. La composición promedio del digestato tratado por gramo de masa seca fueron los siguientes: sólidos totales 0.8 g y sólidos volátiles 0.7 g.

4.1.2.1.3 Procedimiento y diseño experimental

Los reactores consistieron en botellas serológicas de 125 mL con un volumen de trabajo de 87.5 mL. Se cargaron con 83.13 mL de efluente acidogénico, con 3.43 g de lodo granular (de acuerdo al diseño factorial, Tabla 4) ó 4.38 g de digestato (de acuerdo al diseño factorial, Tabla 4). La relación sustrato/inóculo (S_0/X_0) fue de 0.9 g DQO/g SV para el inóculo de lodos, y de 0.8 g DQO/g SV para el inóculo del digestato. El volumen de trabajo se completó con un medio de cultivo cuya composición por litro fue: urea 0.3 g, KH₂PO₄ 2.4 g y K₂HPO₄ 0.46 g.

Se utilizó un diseño factorial 2² para estudiar el efecto del tipo de inóculo y la adición de un aceptor de electrones (CaSO₄ 2 g/L, Ding *et al.*, 2018) sobre la producción de bioalcoholes

(Tabla 5). Se tuvieron dos tipos de controles: el control endógeno para cada tipo de inóculo y el sustrato sin adición de inóculo. Las botellas se incubaron durante 25 días con agitación orbital de 120 rpm en condiciones mesofílicas de $37\text{ °C} \pm 1$, el pH se ajustó a 5.5 (Bahl *et al.*, 1982). Cada tratamiento se realizó por duplicado. Durante el ensayo se tomaron muestras para analizar los ácidos grasos volátiles (AGV) y solventes producidos.

Tabla 4-3. Diseño factorial 2^2 para estudiar el efecto del tipo de inóculo y adición de aceptor de electrones sobre producción de bioalcoholes.

Factor	Nivel
A. CaSO₄	Sin
	Con (2 g/L)
B. Inóculo	Lodo granular
	Digestato acidogénico

4.1.2.2 Ensayo Plackett-Burman

Se utilizó un diseño experimental que permitiera estudiar una gran parte de los factores que han sido reportados como significativos sobre la fermentación acetobutílica. El diseño Plackett-Burman permite estudiar un gran número de factores con un número limitado de corridas con las cuales es posible obtener información de los efectos principales para maximizar la variable de respuesta (Douglas, 2002).

4.1.2.2.1 Preparación de inóculo

En este ensayo algunos de los tratamientos fueron inoculados con cepas puras de *Clostridium acetobutylicum* CDBB-B-1496 (obtenida de la colección de microorganismos del CINVESTAV México), *Clostridium botulinum* (obtenida de la colección de microorganismos del CINVESTAV México), *Clostridium pasteurianum* (obtenida de la colección de microorganismos del CINVESTAV México), y *Clostridium beijerinckii* (aislada de paja de trigo, Pérez-Rangel *et al.*, 2019). Los inóculos se prepararon en botellas serológicas de 150 mL con 120 mL de medio PYG y dextrosa anhidra (10 g/L) como fuente de carbono. Las botellas fueron gaseadas con N₂, para intercambiar atmósfera y asegurar condiciones anaerobias. Los inóculos se incubaron a 37 °C ± 1 por 48 horas sin agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm en el rango de 0.8 a 1.0.

4.1.2.2.2 Procedimiento y diseño experimental

El ensayo se realizó en botellas serológicas de 125 mL con un volumen de trabajo de 87.5 mL. Los reactores fueron cargados con sustrato e inóculo de acuerdo al diseño Plackett-Burman. En todas las botellas se realizó intercambio del espacio gaseoso con nitrógeno durante 30 segundos. Las botellas se incubaron a 37 °C ± 1 por 11 días con agitación a 120 rpm. Se utilizó un diseño Plackett-Burman para evaluar el efecto de 11 factores sobre la producción de bioalcoholes (Tabla 6). Los factores estudiados fueron la adición de una fuente de carbono de fácil asimilación como la glucosa donde estudios previos han encontrado que, a mayores concentraciones de glucosa es posible tener fermentaciones con mayores rendimientos y productividades (Ezeji *et al.*, 2003). Otro de los factores estudiados fue la adición de un digestato tratado térmicamente (105 °C/24 h), el cual pudo servir como fuente de inóculo y sustrato de forma simultánea (Valdez-Vázquez *et al.*, 2015). El siguiente factor fue la adición de un efluente acidogénico el cual también pudo tener la función de servir como fuente de inóculo (debido a que no fue esterilizado), y como fuente de precursores de acetona-butanol (Stein *et al.*, 2017). El siguiente factor fue el pH ya que en diversos estudios se ha demostrado que el inicio de la producción de bioalcoholes ocurre solo después de que el pH en el medio disminuye alrededor de 4.5 a 5.0 (Wu *et al.*, 2017), mientras que otros estudios han demostrado que existe una mayor producción de bioalcoholes cuando el pH inicial es mayor (7.0) (Sheng *et al.*, 2019). Los siguientes factores fueron la adición de zinc y hierro como

micronutrientes los cuales se ha probado que pueden tener mecanismos reguladores para el transporte y metabolismo de azúcares en el medio (Wu *et al.*, 2016). El siguiente factor fue la adición de un aceptor de electrones como NaSO₄ (4 g/L) para suplementar portadores de electrones y crear un ambiente enriquecido con NADH para mejorar la síntesis de butanol, inhibiendo la actividad de la hidrogenasa (Ding *et al.*, 2018). Finalmente se utilizó el factor de bioaumentación con cuatro cepas de *Clostridium* (*C. beijerinckii*, *C. butylicum*, *C. pasteurianum* y *C. beijerinckii*), método que ha demostrado mayor rendimiento en la producción de bioalcoholes, ya que convierte de manera más eficiente el sustrato en bioetanol o biobutanol (Shanmugam *et al.*, 2019).

Tabla 4-4. Diseño Plackett-Burman para estudiar el efecto de once factores sobre producción de bioalcoholes.

Factor	Variable	Concentración mínima	Concentración máxima
A	Glucosa (g/L)	0	30
B	Digestato (%ST)	0	5
C	Hidrolizado (g DQO/L)	16	32
D	pH	5.5	7.5
E	Zn (mg/L)	0	2
F	Fe (mg/L)	0	2
G	NaSO ₄	0	4
H	<i>C. acetobutylicum</i>	-	+
J	<i>C. botulinum</i>	-	+
K	<i>C. pasteurianum</i>	-	+
L	<i>C. beijerinckii</i>	-	+

4.1.2.3 Métodos analíticos

4.1.2.3.1 Determinación de composición de bagazo de caña de azúcar

El análisis se realizó según la metodología de Van Soest propuesta en 1963. Se pesaron 0.5 g de muestra en bolsas filtro y posteriormente se trataron con solución detergente neutra (EDTA, Sulfito de sodio, amilasa) a pH 7 y 100 °C durante 1 hora, posteriormente las bolsas filtro fueron secadas y pesadas. Los residuos se sometieron a tratamiento con solución ácida detergente (ácido sulfúrico 0.5 M y Cetiltrimetil amonio) a 100 °C durante 1 hora, las muestras se secaron y pesaron para a su vez tratar los residuos en un proceso de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico 72% a temperatura ambiente por 3 horas. Finalmente, las muestras secadas y pesadas fueron calcinadas en crisoles a peso constante durante 1.5 horas a 580 °C.

4.1.2.3.2 Sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas

Se siguió la metodología de Sluiter et al. (2008) del National Renewable Energy Laboratory para determinar el contenido de los sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas en el bagazo. Para ello, se tomó 1g de muestra de biomasa y se pesó en crisoles puestos previamente a peso constante. Las muestras se colocaron en la estufa a 105 °C ± 3 durante cuatro horas, después se enfriaron en un desecador y se registró el peso. Para determinar sólidos volátiles y cenizas, las muestras se colocaron a 580 °C durante dos horas, transcurrido el tiempo se pasaron a la estufa durante 30 min, y finalmente se enfriaron en un desecador por 20 min. Se tomaron los pesos de la muestra después del tratamiento en estufa y mufla.

4.1.2.4 Volumen y composición de biogás

El volumen de biogás se midió con la técnica de probeta invertida en una solución líquida ajustada a un pH de 2, saturada con sal para evitar la disolución de CO₂.

Dicha composición se determinó en un cromatógrafo de gases SRI 8610C equipado con un detector de conductividad térmica y dos columnas de acero inoxidable empacadas con sílica gel (1.83 m x 0.32 cm y columna de tamiz molecular 13 x de 1.82 m x 3.175 mm). La temperatura de la columna fue de 40 °C por cuatro minutos y una rampa de 20 °C cada minuto hasta alcanzar 110 °C. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 90 y 150 °C, respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 20 mL/min. Con este equipo se determina la presencia de hidrogeno, oxígeno, metano y dióxido de carbono.

El volumen de biogás fue normalizado a condiciones estándar de 273 °K y 1 atm de presión atmosférica.

4.1.2.5 Ácidos grasos volátiles (AGV)

Para la determinación de la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) en la parte experimental (acidó acético, propiónico, butírico) y los solventes (etanol y butanol), se tomó 1 mL de muestra, se centrifugó por diez minutos a 3500 rpm, posteriormente fue filtrada con nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 mm y acidificada con HCl (4M) para su conservación

a un pH menor de dos. La muestra se inyectó en un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de flama (FID) marca Agilent Technologies 7890B GC, equipado con una columna DB-FFAP Agilent de 530 mm, 15 m de largo y 1 mm de espesor de película. La temperatura inicial es de 60 °C y posteriormente se utilizó una rampa de 15 °C por minuto hasta llegar a 170 °C. La temperatura del inyector es de 150 °C y del detector de 210 °C. Se utilizó nitrógeno e hidrógeno como gases acarreadores con un flujo de 300 mL por minuto y 30 mL por minuto, respectivamente.

El ácido láctico se calculó en un cromatógrafo de iones marca Dionex ICS-1500, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) equipado con una columna REIC IonPac AS23 de 250mm y 4 mm de espesor (Ramos *et al.*, 2012).

4.1.2.6 Demanda química de oxígeno (DQO)

La DQO está definida como la cantidad de oxidantes específicos que reaccionan con la muestra bajo condiciones controladas. La cantidad de oxidante consumido es expresada en términos de equivalentes de oxígeno. El ion dicromato de potasio ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), al oxidar la materia orgánica cambia de cromo en estado hexavalente (VI) al estado trivalente (III). Estas especies adquieren un color y se absorben en la región visible del espectro, así que se leen a 600 nm en el espectrofotómetro para su determinación. Se digieren 2 mL de la muestra durante dos horas a una dilución de 1:10 mL en los tubos HACH®, que están preparados para muestras que contengan entre 1 y 15 g/L de DQO (Hach, 2008).

4.1.2.7 Carbohidratos totales

Para su cuantificación se mezcló 1 mL de muestra con 1 mL de fenol a 5% (p/V). Posteriormente, se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitó lentamente por inversión. Los tubos se enfriaron en un baño de agua y se leyó la absorbancia a 490 nm. El blanco fue agua desionizada y la curva de calibración se realizó empleando D-glucosa como estándar (Dubois *et al.*, 1956).

4.1.2.8 Análisis estadísticos y cálculos

En este trabajo, se empleó un diseño experimental factorial, el cual es un método para planificar experimentos en los que los resultados se someten a un análisis estadístico para evaluar la importancia de los efectos principales y de interacción (Douglas, 2002). Este método se utilizó para generar los modelos matemáticos predictivos que describen el comportamiento del sistema y para determinar la configuración operativa óptima (Sheridan *et al.*, 2002).

En este trabajo, se aplicó el diseño de Plackett-Burman (PBD) para detectar las variables significativas y mejorar la detección de variables a optimizar (Douglas, 2002). PBD supone que cada factor es independiente y puede describirse mediante el modelo de primer orden:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i + X_i \quad (2)$$

Donde:

- Y: Es la respuesta objetivo predicha.
- β_0 : Es el modelo de intersección.
- β_i : Es el coeficiente de regresión.
- X_i : es un parámetro independiente.

Un total de 12 experimentos con cinco parámetros independientes (ác. acético, ác. butírico, acetona, butanol y etanol) fueron diseñados por el software Design Expert v11(Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE. UU.), cada parámetro en dos niveles: alto (+1) y bajo (-1). Los factores que muestran efectos mayores se identificaron mediante la prueba F.

Cálculo de la concentración total de AGV se expresó en términos de ácido acético equivalente (aa).

Los principales ácidos producidos en la fermentación acidogénica son ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico y ácido láctico. Estos se convirtieron en equivalentes de ácido acético para reportar un total de AGV. Los cálculos son los siguientes:

$$\begin{aligned} \text{Total AGVs} = & (\text{Concentración de ácido acético}) + \\ & \left(\text{Concentración de ácido propiónico} * \left(\frac{112}{64} \right) * \left(\frac{60.05}{74.08} \right) \right) + \\ & \left(\text{Concentración de ácido butírico} * \left(\frac{176}{64} \right) * \left(\frac{60.05}{88.11} \right) \right) + \\ & \left(\text{Concentración de ácido láctico} * \left(\frac{96}{64} \right) * \left(\frac{60.05}{90.08} \right) \right) \end{aligned} \quad (3)$$

Donde:

- Masa molar de ácido acético= 60.05.
- Masa molar de ácido propiónico=74.08.
- Masa molar de ácido butírico=88.11.

Finalmente, la masa molar de los ácidos se multiplica por el número de gramos de oxígeno requeridos para descomponer completamente los ácidos en dióxido de carbono para obtener un total de AGV en equivalentes de ácido acético (Murali *et al.*, 2017).

4.2 Etapa 2. Indicadores ambientales y económicos

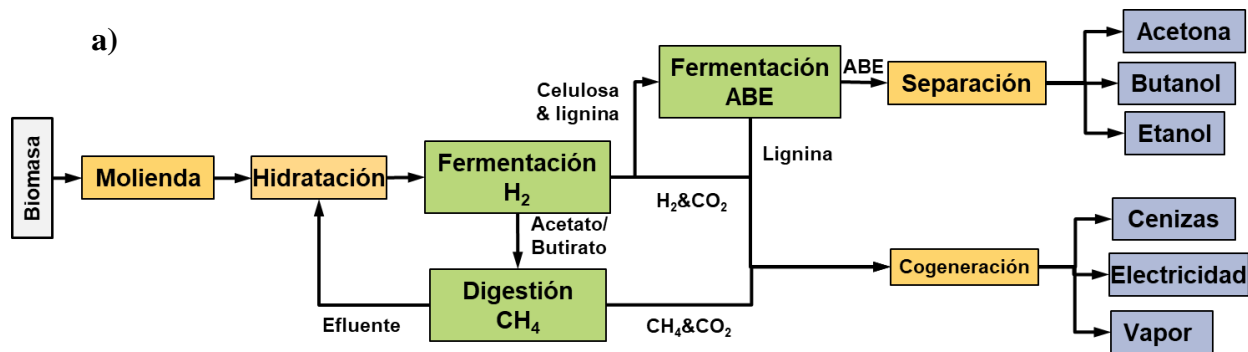
El presente trabajo es un estudio con enfoque multidimensional de la producción de bioalcoholes a partir de biomasa residual de caña de azúcar que considerará los impactos generados durante la producción industrial de acetona-butanol-etanol (ABE). Por lo que, se realizó el cálculo de los impactos ambientales (emisiones de CO₂ y consumo de agua) y económicos (eficiencia energética y costos de producción).

4.2.1 Delimitación del sistema

Para el presente trabajo se establecieron como límites del sistema de la cadena de producción de bioalcoholes en la fase industrial, una biorrefinería donde el bagazo se convierte en bioalcoholes mediante un proceso bioquímico. En esta fase se consideró las etapas de pretratamiento mediante hidratación de la materia prima, una fermentación acetobutílica (en dos etapas) mediante consorcios microbianos (incluye tres bioprocesos en paralelo) y la cogeneración (Valdez-Vazquez y Sanchez, 2018).

4.2.2 Planteamiento de escenarios

Este estudio comparó dos escenarios, el primero es un escenario de referencia propuesto por Valdez-Vazquez y Sánchez (2018), que presentan un diseño de biorrefinería donde las emisiones de CO₂ y consumo total de agua dulce se calcularon a través del software SuperPro Designer v 9.0 (Figura 9). El segundo escenario es una propuesta donde se utilizó el mismo modelo de biorrefinería, pero modificando las etapas de fermentación oscura de producción de hidrógeno, fermentación ABE y reactor de metanogénesis a partir de AGV. Después, con el modelo modificado se estimaron los indicadores ambientales y económicos para realizar una comparación entre escenarios que servirán en la toma de decisiones.



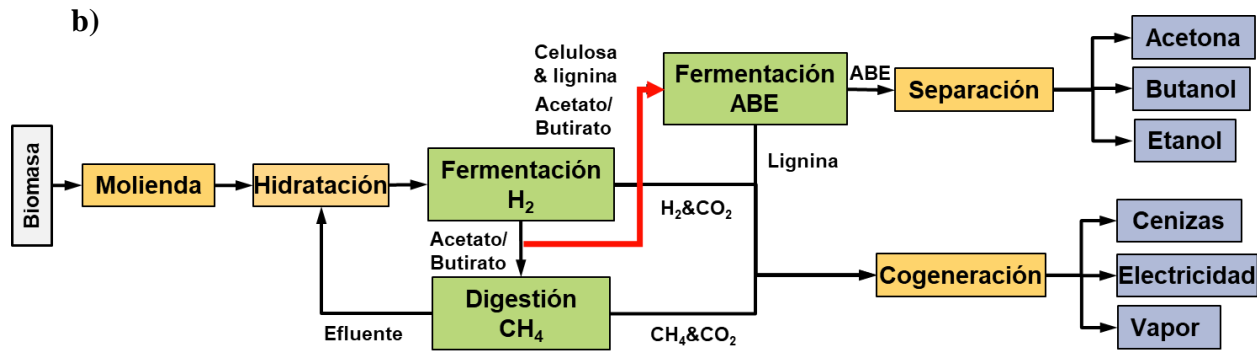


Figura 4-4. Modelos de biorrefinería con tres bioprocesos: a) propuesta base y b) propuesta modificada (Valdez-Vázquez y Sánchez, 2018).

4.2.2.1 Indicadores ambientales

Para la fase industrial, se utilizó como modelo la biorrefinería de plataforma bioquímica que incluye una hidratación, tres bioprocesos basados en consorcios microbianos, la destilación y la cogeneración previamente reportada (Sanchez, *et al.*, 2017; Valdez-Vazquez y Sanchez, 2018;). La capacidad mínima establecida para la biorrefinería fue de 1,000 t de biomasa residual al día, la cual es la capacidad mínima para que la planta sea rentable.

4.2.2.1.1 Emisiones de CO₂

Se utilizaron los balances de masa y energía calculados para cada operación unitaria, para extraer los datos de emisiones de CO₂. Se modificaron algunas características de operación del proceso, tales como valores de conversión de las reacciones y concentraciones de AGV iniciales en los reactores, en base a los datos obtenidos en la parte experimental. Finalmente, de cada operación unitaria se tomó el valor de emisiones de CO₂ total como resultado y se sumaron.

En el reactor acidogénico (primera fermentación, Figura 9) se establecieron las siguientes condiciones de operación: volumen de trabajo del reactor fue de 75%, el TRH se fijó de 5 días a una temperatura de 37 °C, las reacciones bioquímicas que tienen lugar en este reactor y sus porcentajes de conversión se muestran en la Tabla 7.

Este reactor tiene una salida con AGV cuya concentración es: 4.4 g/L de ácido acético, 2.6 g/L de ácido butírico y 1.4 g/L de ácido propiónico.

Tabla 4-5. Reacciones bioquímicas y conversión en el reactor acidogénico.

Reacciones	% de conversión
1.00 otros sólidos + 1.00 H ₂ O → 1.00 C ₆ H ₁₂ O ₆	100
1.00 C ₆ H ₁₂ O ₆ + 2.00 H ₂ O → 2.00 CH ₃ COOH + 2.00 CO ₂ + 4.00 H ₂	100
1.00 C ₆ H ₁₂ O ₆ + 2.00 H ₂ O → 1.00 C ₄ H ₈ O ₂ + 2.82 CO ₂ + 2.00 H ₂	100
1.00 C ₆ H ₁₂ O ₆ → 6.00 células + 1.80 H ₂ O	100
1.00 H ₂ O + 1.00 Xilano → 1.00 C ₅ H ₁₀ O ₅	0
1.69 H ₂ O + 1.00 C ₅ H ₁₀ O ₅ → 1.67 CH ₃ COOH + 1.67 CO ₂ + 3.33 H ₂	0
1.00 C ₅ H ₁₀ O ₅ → 0.83 C ₄ H ₈ O ₂ + 1.62 CO ₂ + 1.67 H ₂	0
1.00 C ₅ H ₁₀ O ₅ → 5.00 células + 1.50 H ₂ O	0

En el reactor solventogénico se establecieron las siguientes condiciones de operación: volumen de trabajo del reactor fue del 75%, el TRH se mantuvo de 5 días a una temperatura de 37 °C, las reacciones bioquímicas que tienen lugar en reactor ABE y sus porcentajes (%) de conversión se muestran en la Tabla 8.

Este reactor recibe una corriente de AGV proveniente del reactor de fermentación oscura, por lo que, tienen lugar reacciones bioquímicas de conversión de AGV en solventes (Decker *et al.*, 1970).

Tabla 4-6. Reacciones bioquímicas y conversión en el reactor solventogénico.

Reacciones	% de Conversión	Concentración final (g/L)
1.00 celulosa + 1.00 H ₂ O → 1.00 C ₆ H ₁₂ O ₆	100	-
1.00 C ₆ H ₁₂ O ₆ → 6.00 células + 1.80 H ₂ O	2	-
1.00 C ₂ H ₄ O ₂ + H ⁺ + 2.00 H ₂ → 1.00 C ₂ H ₆ O + 1.00 H ₂ O	10	-
1.00 C ₂ H ₄ O ₂ + H ⁺ → 1.00 C ₃ H ₆ O + 1.00 HCO ₃	30	-
2.00 C ₄ H ₈ O ₂ + H ⁺ + 2.00 H ₂ → 1.00 C ₄ H ₁₀ O + 1.00 H ₂ O	95	-
1.00 C ₆ H ₁₂ O ₆ + 1.00 H ₂ O → 1.00 C ₃ H ₆ O + 3.00 CO ₂ + 4.00 H ₂	-	0.10
1.00 C ₆ H ₁₂ O ₆ → 2.00 CO ₂ + 2.00 C ₂ H ₆ O	-	0.46
1.00 C ₆ H ₁₂ O ₆ → 1.00 C ₄ H ₁₀ O + 2.00 CO ₂ + 1.00 H ₂ O	-	2.10

El resto de operaciones unitarias y sus condiciones se mantuvieron como las previamente reportadas por Valdez-Vazquez y Sánchez (2018).

4.2.2.1.2 Consumo de agua

El consumo de agua dulce contabilizada en esta fase, fueron las entradas de agua en: el reactor acidogénico, el reactor solventogénico, la generación de vapor y las torres de destilación. El consumo de agua se tomó por el procesamiento de una tonelada de bagazo de caña de azúcar.

Para identificar los consumos de agua se consideraron algunas características de operación del proceso, tales como volúmenes de trabajo, tiempos de retención hidráulica (TRH), además de identificar los caudales de salida que eran recirculados para alguna otra operación unitaria. Posteriormente se realizó la suma total del consumo de agua de las operaciones unitarias, siendo esto el valor total de agua utilizada. Las condiciones de operación finales establecidas para cada operación unitaria del proceso fueron las siguientes:

Para el proceso de hidratación se establecieron las siguientes condiciones de operación: volumen de trabajo del reactor será de 75%, el TRH se mantuvo en 4 h y se trabajó a una temperatura de 31° C, se cargaron los reactores a 10% de sólidos totales (ST).

El reactor solventogénico presentó también entrada de agua, empleando las siguientes condiciones de operación: el volumen de trabajo del reactor fue de 75%, el TRH se mantuvo de 6.6 días y se trabajó a una temperatura de 37° C. El valor de consumo de agua superficial se calculó en base a un porcentaje de trabajo de ST del 10%. De los balances de masa del simulador, se obtuvo el rendimiento del bagazo de caña de azúcar de entrada al reactor solventogénico, posteriormente se calculó el consumo de agua en esta operación unitaria.

El reactor metanogénico presentó las condiciones de operación siguientes: volumen de trabajo del reactor fue del 75%, el TRH se mantuvo de 10 h y se trabajó a una temperatura de 36 °C.

4.2.2.2 Indicadores económicos

Se tomaron los datos de eficiencia energética y los costos totales de producción de butanol de acuerdo a las condiciones de operación de la planta (Valdez-Vazquez y Sanchez, 2018).

4.2.2.2.1 Eficiencia energética

Mediante los resultados de la simulación del proceso de la biorrefinería previamente reportados, se estimó la energía producida después de los cambios introducidos, medidos como producción de hidrógeno, metano y butanol. Se consideró que la energía de entrada no sufrió cambios. La eficiencia energética se calculó con la ecuación 4.

$$\textit{Eficiencia energética (EER)} = \textit{energía de salida/energía de entrada.} \quad (4)$$

La energía de salida está integrada por la electricidad producida (por la quema de hidrógeno, metano y sólidos -lignina-) más la energía de combustión del butanol (expresado como MW). Mientras que la energía de entrada es la electricidad consumida (aprox. 80% por la molienda), energía de enfriamiento y calentamiento (expresado en MW).

4.2.2.2.2 Costos de producción

En el trabajo mencionado, se reportan los costos totales de producción para diferentes escenarios de concentración de butanol (10, 15 y 20 g/L). Con las modificaciones añadidas al modelo, se utilizó el costo total de producción que más se acercó a la nueva concentración de butanol lograda.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Reactores acidogénicos

Los residuos agrícolas como el bagazo de caña de azúcar tienen un contenido de hemicelulosa y celulosa de más del 70%, lo que los hace susceptibles de conversión en biocombustibles. La producción de bioalcoholes tipo butanol-etanol se lleva a cabo a través de la fermentación solventogénica que se caracteriza por desarrollarse en dos etapas, la etapa acidogénica y la etapa solventogénica. Durante la etapa acidogénica, las células crecen y producen ácidos principalmente acético y butírico. Esta producción de ácidos provoca una disminución del pH y las condiciones del medio se vuelven desfavorables para el crecimiento de los microorganismos. Por su parte, las especies de *Clostridium* responden a esta nueva condición con un cambio metabólico y morfológico, donde las células se convierten en endosporas, y reasimilan los ácidos para producir los bioalcoholes (acetona-butanol-etanol) en una proporción molar típica de 3: 6: 1 (Procentese *et al.*, 2015).

Los reactores donde se llevó a cabo la fermentación acidogénica fueron operados a dos cargas orgánicas (15 y 20 g ST/kg·d) y valores de pH iniciales (4.5 y 6.5) para determinar su efecto sobre la producción de ácidos grasos volátiles (AGV). Los reactores con un pH inicial de 4.5 y una carga orgánica de 15 g ST/kg·d se operaron un total de 84 días, sin considerar la producción de ácido láctico (Figura 10a). A partir del día 70, la concentración total de AGV aumentó de 2.3 ± 0.6 g aa/L a un promedio de 5.5 ± 1.2 g aa/L. La distribución de los AGV fue de un 67 % de ácido láctico, 16% de ácido butírico, 14% de ácido acético y 3% de ácido propiónico. Al incrementar la carga orgánica de 15 a 20 g ST/kg·d, se observó que en términos generales, la concentración total de AGV disminuyó a 4.0 ± 0.7 g aa/L, lo que podría deberse a una inhibición por sustrato. Por otro lado, los reactores con un pH inicial de 6.5 y carga orgánica de 15 g ST/kg·d se operaron un total de 40 días, sin considerar la producción de ácido láctico (Figura 10b). Se observó que a partir del día 18, la concentración total de AGV aumentó hasta alcanzar en promedio 10.8 ± 1.7 g aa/L, los cuales correspondieron a un 47% de ácido acético, 37% de ácido butírico y 16% de ácido propiónico. Cuando se incrementó la carga orgánica, se observó el mismo fenómeno que a pH de 4.5, donde la concentración total de AGV disminuyó un 65% con un valor promedio de 3.8 ± 0.6 g aa/L.

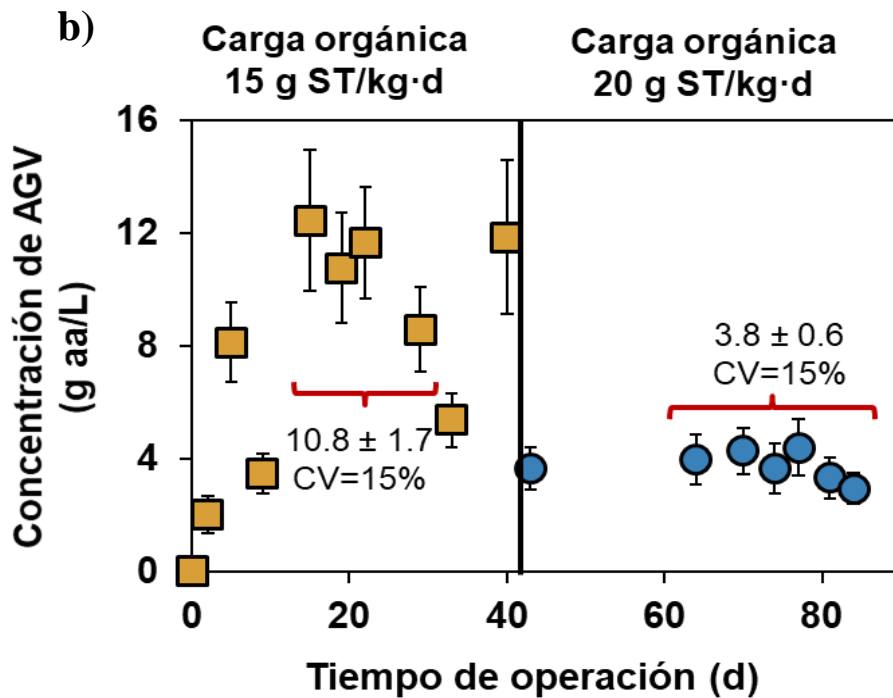
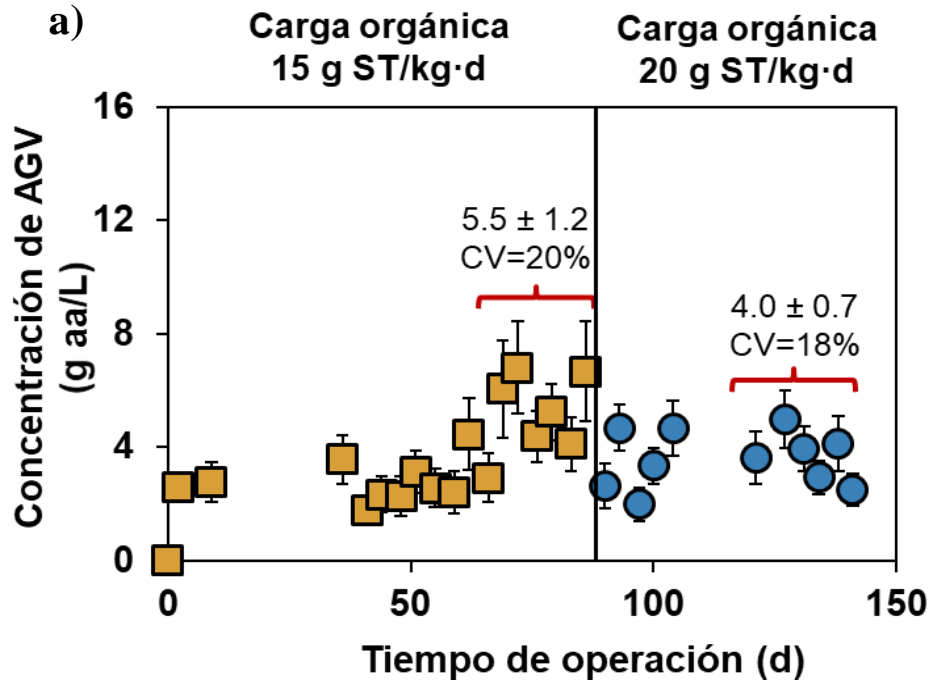


Figura 5-1. Desempeño de los reactores para fermentación acidogénica operados en modo semi-continuo. **a)** pH inicial de 4.5 y cargas orgánicas de 15 y 20 g ST/kg·d. **b)** pH inicial de 6.5 y cargas orgánicas de 15 y 20 g ST/kg·d.

Los valores promedio obtenidos en el periodo estable (C.V. < 20%), se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si los factores de pH y carga orgánica tuvieron un efecto significativo sobre la concentración total de AGV, así como de cada metabolito. Se encontró que la carga orgánica tuvo un efecto significativo sobre la concentración total de AGV y la producción de ácido acético, butírico y láctico. Mientras que el pH solo tuvo un efecto significativo sobre la producción de ácido propiónico ($p < 0.05$, Tabla 9).

Tabla 5-1. Análisis de varianza (ANOVA) para la producción de AGV, ácido acético, butírico, propiónico y láctico.

Factor	Total AGV		Acético		Butírico		Propiónico		Láctico	
	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p
pH	0.3803	0.5708	3.58	0.1316	0.26	0.6346	28.16	0.0061	50.06	0.0021
Carga orgánica	28.17	0.0061	598.66	<0.0001	170.15	0.0002	1.47e ⁻⁴	0.9909	44.65	0.0026

De esta forma, la mayor concentración de AGV se alcanzó a la menor carga orgánica de 15 g ST/kg·d con un valor máximo de 13.9 ± 2.1 g aa/L (Figura 13a). Lo mismo se observó para cada metabolito donde las máximas producciones para ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico y ácido láctico fueron de 4.6 ± 0.5 g/L, 4.1 ± 0.0 g/L, 1.9 ± 0.3 y 7.8 ± 0.1 g/L, respectivamente, a la menor carga orgánica de 15 g ST/kg·d (Figura 11b,c,d).

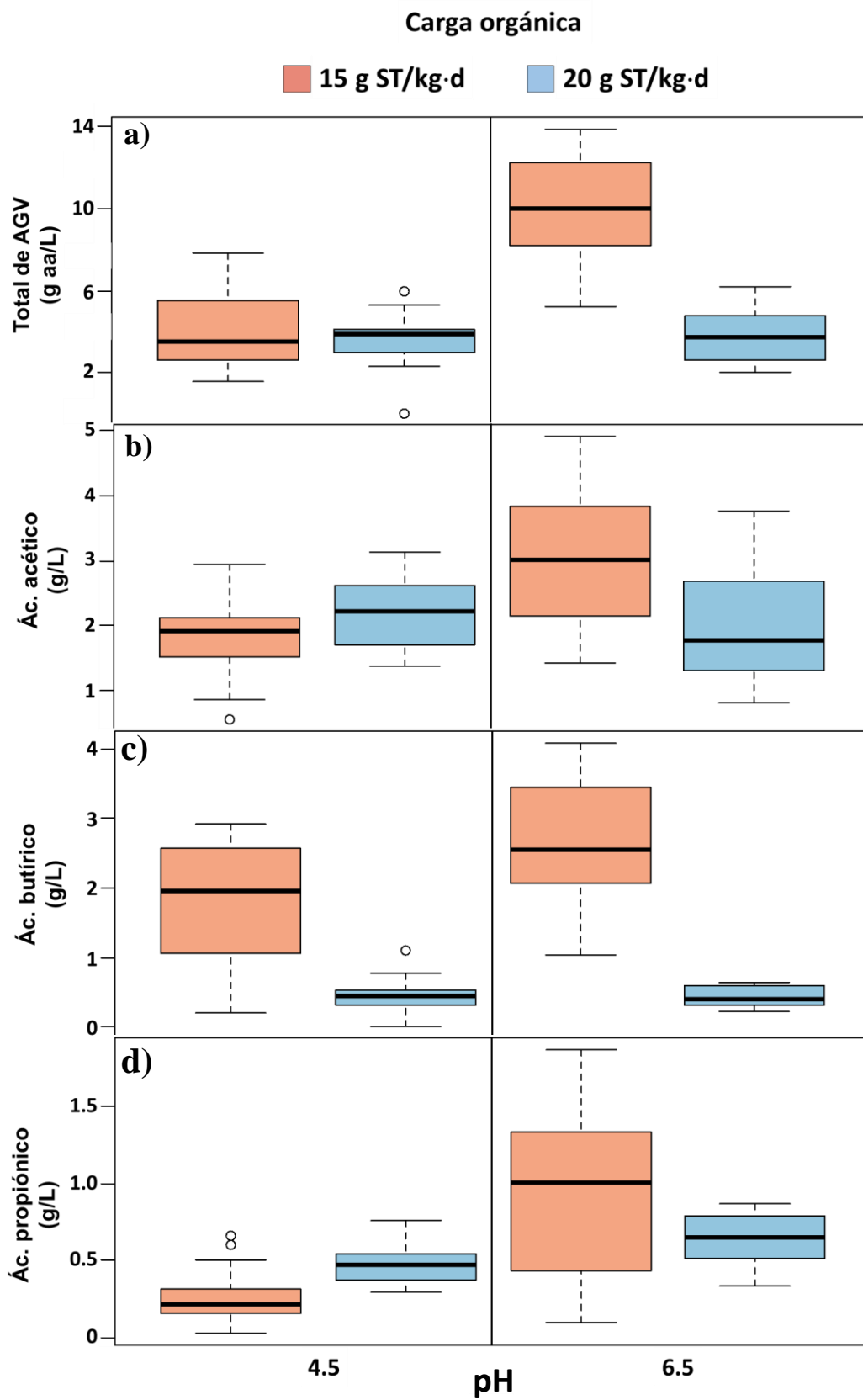


Figura 5-2. Gráfico de producción total de: (a) AGV, (b) ácido acético, (c) ácido butírico y (d) ácido propiónico.

En literatura existen pocos estudios sobre producción de AGV a partir de residuos agrícolas utilizando consorcios microbianos como inóculo. Entre los estudios encontrados se observó que la producción total de AGV varía desde 2.6 a 18.8 g/L (Tabla 11), lo cual depende de varios factores como el tipo de sustrato (van Aarle *et al.*, 2015; Agematu *et al.*, 2017), pretratamiento del sustrato (Wang *et al.*, 2019), inóculo (van Aarle *et al.*, 2015), pH (Fangkum y Reungsang, 2011; Chi *et al.*, 2018; Kumar y Mohan 2018), carga orgánica (Aboudi *et al.*, 2015; Murali *et al.*, 2017; Patinvoh *et al.*, 2017), y modo de operación del reactor.

En reactores en lote, el ácido acético es el metabolito predominante siendo entre el 48% al 83% del total de AGV producidos (Tabla 11). Esta tendencia también se cumplió en este estudio, ya que en la condición con mayor AGV (pH 6.5 y carga orgánica de 15 g ST/ kg·d), el ácido acético representó el 53% del total. El segundo metabolito con mayor acumulación puede ser el ácido butírico (van Aarle *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017), o bien, el ácido propiónico (Agematu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019). En la condición de operación mencionada, el ácido butírico fue el segundo metabolito representando el 35% y finalmente el ácido propiónico con un 10%.

Tabla 5-2. Producción de ácidos grasos volátiles a partir de residuos orgánicos en lote.

Sustrato	Inóculo	Condiciones de operación	Total AGV ^a (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido butírico (g/L)	Ácido propiónico (g/L)	Ref.
Remolacha, salvado trigo de y granos	Lodo anaerobio, lodo granular y efluente acidogénico	pH 6.5, 35 °C	12.7	4.5	2.7	2.2	Van Aarle <i>et al.</i> , 2015
Paja de trigo	Rumen	pH 6.5, 39 °C	5.9	2.3	0.4	2.0	Agematu <i>et al.</i> , 2017
Paja de arroz	Lodo secundario	pH 8.0, 37 °C	18.8	10.3	3.0	2.0	Zhou <i>et al.</i> , 2017
Pasto tratado con CaOH-ultrasonido	Lodo anaerobio	pH 7.0, 35 °C	2.6	2.0	0.1	0.3	Wang <i>et al.</i> , 2019

Nota: ^a, expresado en términos de ácido acético equivalente.

El perfil de metabolitos obtenido depende de diversos factores, donde el pH de operación está entre los más importantes (Stein *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2018). Es por ello, que en este trabajo se estudiaron dos condiciones de pH (4.5 y 6.5) en los reactores para fermentación acidogénica. De manera general, la producción total de AGV fue mayor a pH de 6.5, donde la producción de ácido acético y butírico fue 30% mayor que a pH de 4.5. Mientras que la producción de ácido propiónico fue 50% mayor que a pH de 4.5. Caso contrario, la mayor producción de ácido láctico de 7.7 g/L (48% del total) fue a pH de 4.5. Esta misma tendencia se observó en otros estudios, que han determinado el efecto del pH desde un rango ácido a neutro (Antonopoulou *et al.*, 2010; Chi *et al.*, 2018), y de un rango ácido hasta básico (Fangkum y Reungsang, 2011; Stein *et al.*, 2017; Kumar y Mohan 2018). La Figura 14 muestra la producción de AGV en función del pH a partir de sustratos orgánicos, como son la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), lodos de purga de plantas de tratamiento de aguas (PTAR), y residuos agrícolas. En términos de concentración total de AGV, todos tienen la mayor producción que va de 3.5 g aa/L hasta 20 g aa/L, en un rango de pH entre 4.5 a 6.5, independientemente del tipo de sustrato, debido a que estas condiciones favorecen la actividad de enzimas hidrolíticas, que se encargan de la síntesis de los diferentes sustratos para la producción de AGV (Jiang *et al.*, 2013). Mientras que a un pH bajo (< 4.0) las bacterias fermentativas no pueden sobrevivir y los AGV no disociados que entrar en células microbianas e inhiben su metabolismo (Feng *et al.*, 2018). A un pH alto (> 7.0) los microorganismos cambian sus rutas metabólicas, disminuyendo las concentraciones de AGV para producir otros productos, como puede ser el metano en una ruta metanogénica (Zhao *et al.*, 2017). El trabajo de Stein *et al.* (2017) tuvo una tendencia diferente, debido a que con el aumento del pH la solubilización del sustrato aumentó, lo que proporcionó a los microorganismos sustratos más aprovechables para la producción de los ácidos.

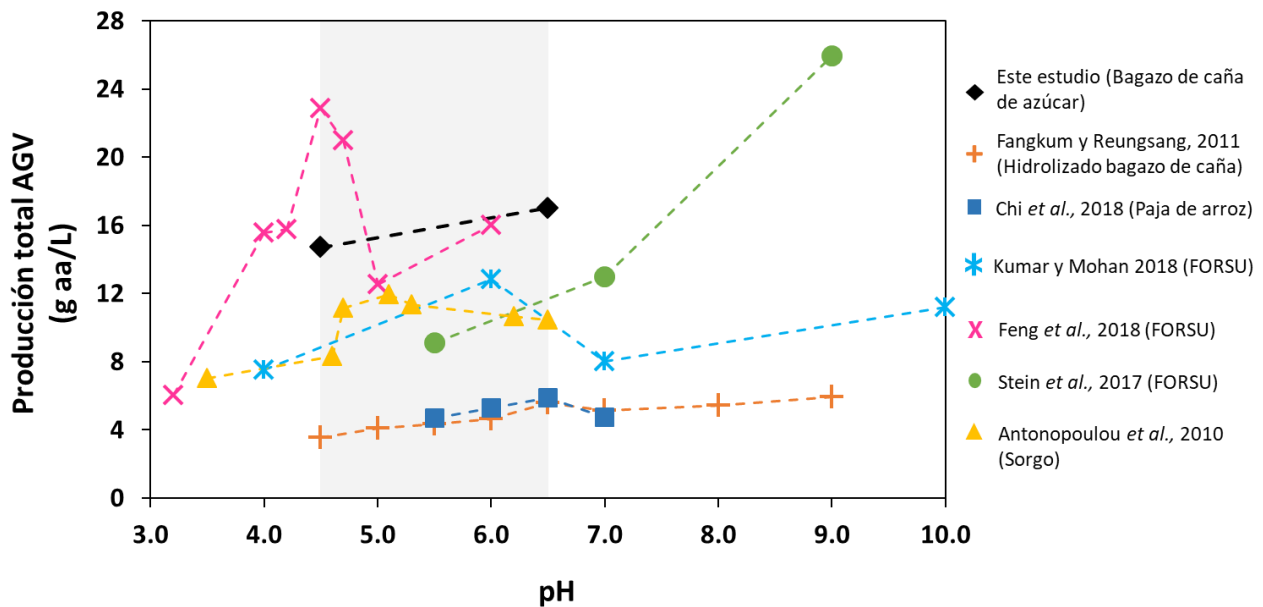


Figura 5-3. Producción total de AGV en función del pH.

Otro factor que influye en la producción de AGV es la carga orgánica en reactores operados en modo continuo (Murali *et al.*, 2017; Slezak *et al.*, 2017). Es por ello, que para este trabajo se estudiaron dos cargas orgánicas (15 g ST/kg·d y 20 g ST/kg·d), donde la producción de ácido acético y butírico fue 80% y 32% mayor, respectivamente a la menor carga orgánica, siendo estadísticamente significativo en ambos casos.

En literatura, las cargas orgánicas estudiadas varían desde rangos bajos < 10 g ST/kg·d (Lim *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2013; Murali *et al.*, 2017; Patinvoh *et al.*, 2017; Stein *et al.*, 2017), rangos medios que van de 10 a 20 g ST/kg·d (Lim *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2013; Aboudi *et al.*, 2015) y rangos altos > 20 g ST/kg·d (Stein *et al.*, 2017; Tapia-Perez, 2019). Las mayores concentraciones de AGV se observan en el rango medio, que van de 7 a 27 g aa/L (Figura 15). La concentración de AGV logradas en este trabajo a la carga orgánicas medias están un 70% superior al trabajo de Tapia-Pérez (2019) quien utilizó paja de trigo como sustrato lignocelulósico y consorcios microbianos nativos como inóculo, lo cual lo hace el trabajo más apropiado para realizar una comparación con este estudio. Mientras que, cuando se compara con otros sustratos como paja de trigo tratada o residuos alimenticios, la concentración de AGV lograda en este trabajo fueron un 36 y 56% inferiores a los trabajos de Jiang *et al.* (2013) y Murali *et al.* (2017), respectivamente. Esto se debe a que Murali *et al.* (2017) hace un pretratamiento al sustrato lo que incrementa su biodegradabilidad, mientras que Jiang *et al.* (2013) utiliza residuos alimenticios como sustrato, los cuales son más biodegradables que los sustratos lignocelulósicos como el bagazo de caña de azúcar. De manera general, se observa que a bajas cargas orgánicas (< 10 g ST/kg·d), el sustrato resulta ser limitante para el crecimiento de los microorganismos y por lo tanto no cuentan con los azúcares suficientes para una alta producción de AGV. En contraste, altas cargas orgánicas (> 20 g ST/kg·d), pueden presentar inhibición por sustrato al causar un desequilibrio entre las actividades metabólicas de los diferentes microorganismos, debido al exceso en la disponibilidad del sustrato rico en azúcares (Stein *et al.*, 2017) o bien, inhibición por producto, ya que pueden presentarse altas concentraciones de productos fenólicos y AGV, los cuales son tóxicos para los microorganismos y detienen su crecimiento (Díaz y Tost 2018).

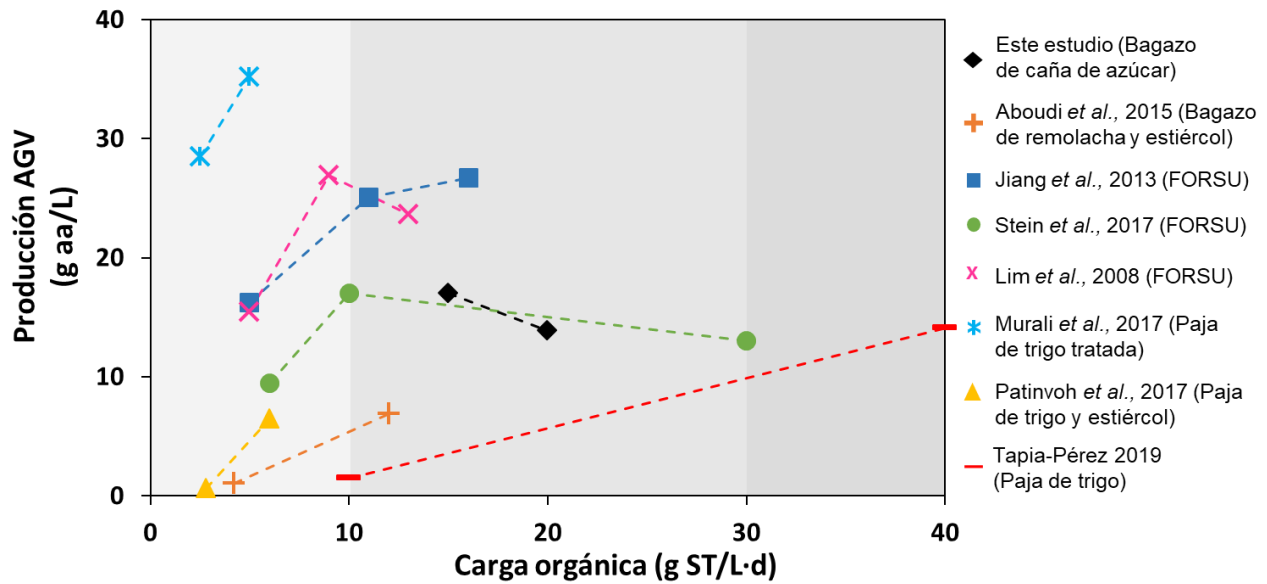


Figura 5-4. Producción de AGV en función de la carga orgánica.

Durante este experimento también se produjeron bioalcoholes (butanol y etanol), la concentración promedio de butanol y etanol se analizó mediante un análisis de varianza para determinar si los factores de pH y carga orgánica tuvieron un efecto significativo sobre su producción, donde ambos factores tuvieron un efecto significativo ($p > 0.05$, Tabla 12).

Tabla 5-3. ANOVA del efecto del pH y carga orgánica sobre la producción de bioalcoholes.

Factor	Butanol		Etanol	
	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p
pH	345.17	< 0.0001	235.37	0.0001
Carga orgánica	606.44	< 0.0001	339.72	< 0.0001

En ambos casos, la máxima producción se observó a la menor carga orgánica de 15 g ST/kg·d, con una concentración máxima de butanol de 43.2 ± 4.4 mg/L y de etanol de 220.8 ± 77.5 mg/L. Para el butanol la máxima concentración se observó a un pH de 6.5, caso contrario para el etanol, donde la mayor concentración se observó a un pH de 4.5 (Figura 16).

Existen pocos trabajos reportados que utilicen sustratos lignocelulósicos y consorcios microbianos como inóculo para la producción de bioalcoholes. Entre los trabajos encontrados se observó que la producción total de etanol varía desde 0.2 a 2.5 g/L (Kiyoshi *et al.*, 2015; Van Aarle *et al.*, 2015). En este estudio, se alcanzó una concentración máxima de etanol de 0.7 ± 0.02 g/L. Mientras que para el butanol según lo reportado por otros autores las concentraciones van desde 2.1 a 13.8 g/L (Cheng *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018). En este estudio la máxima concentración de butanol fue 0.01 ± 0.004 g/L. La diferencia en la concentración de butanol se debe a que en los trabajos mencionados el sustrato recibió un pretratamiento antes de la fermentación además de utilizar cultivos puros.

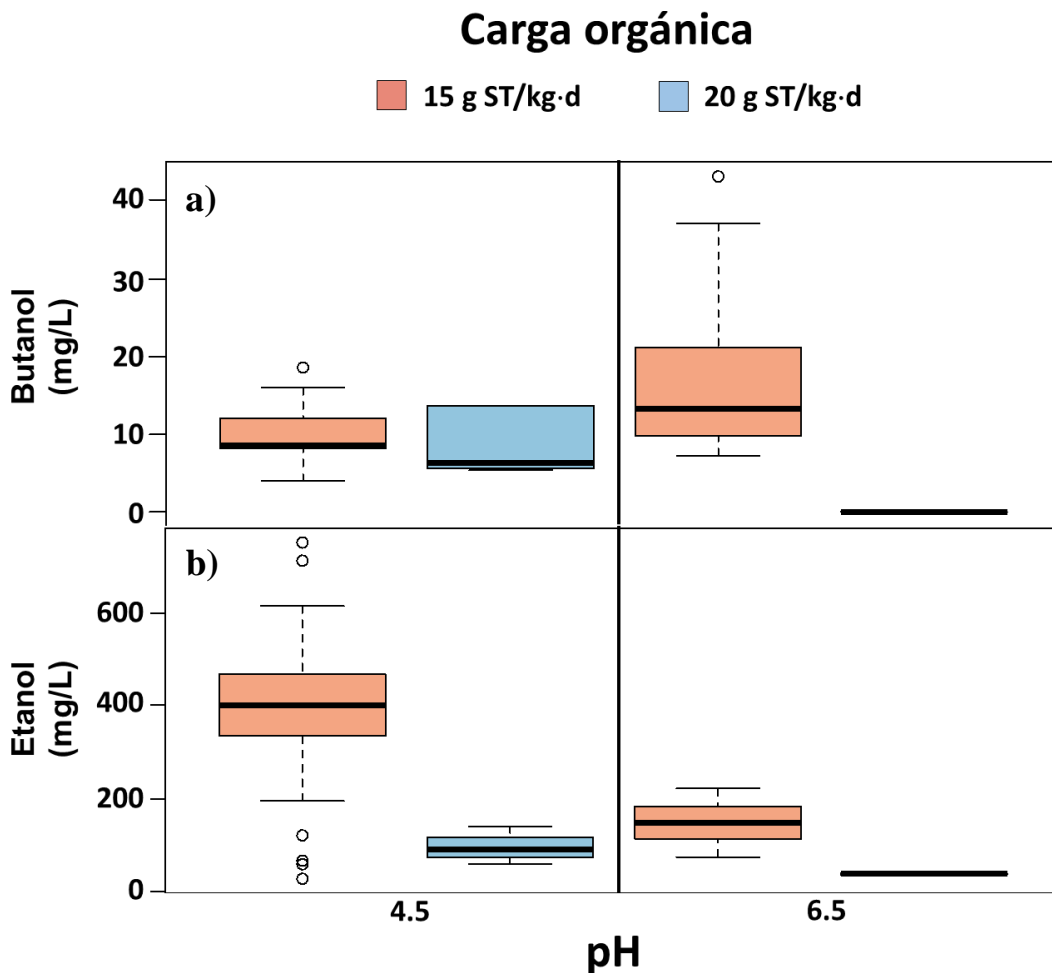


Figura 5-5. Gráfico de producción total de: (a) butanol y (b) etanol.

5.2 Reactores solventogénicos

5.2.1 Diseño factorial 2²

En este trabajo se propone un proceso de fermentación en dos etapas, la primera fermentación denominada acidogénica produce principalmente ácidos acético y butírico, los cuales son utilizados como precursores de acetona y butanol, respectivamente, en una segunda etapa de fermentación denominada solventogénica.

Siguiendo con la fermentación solventogénica en una primera fase, se utilizó un diseño factorial de dos factores a dos niveles para estudiar el efecto del tipo de inóculo (digestato y lodo anaerobio) y adición de un aceptor de electrones (CaSO₄) sobre la producción de acetona-butanol-etanol en una fermentación acetobutílica, para ello, se montaron reactores en lote incubados durante 25 días (Tabla 13).

Tabla 5-4. Producción de bioalcoholes en diseño factorial 2².

Tratamiento	Factor A	Factor B	Respuesta 1	Respuesta 2
	Tipo de inóculo	CaSO ₄ (g/L)	Butanol mg/L	Etanol g/L
1	Lodo anaerobio	0	37.8	0.8
2		4	41.8	1.0
3	Digestato	0	72.7	1.1
4		4	45.7	1.2
5	Controles	0	40.2	1.2
6		4	25.4	1.2

Por análisis de varianza se determinó que el tipo de inóculo y adición de aceptor de electrones tuvieron un efecto significativo solo sobre la producción de butanol, pero no sobre la producción de etanol ($p < 0.05$, Tabla 14).

Tabla 5-5. ANOVA del efecto del tipo de inóculo sobre la producción de butanol.

Factor	Butanol		Etanol	
	Valor F	Valor <i>p</i>	Valor F	Valor <i>p</i>
Tipo de inóculo	9.07	0.0395	0.2909	0.6183
CaSO₄	8.15	0.0462	0.0545	0.8269

Se observó que los reactores inoculados con digestato tuvieron mayores concentraciones de butanol y etanol. Sin embargo, la adición del aceptor de electrones tuvo un efecto negativo, ya que la concentración de butanol en ausencia de CaSO₄ fue mayor con 72.7 mg/L contra los 45.7 mg/L producidos con la adición de CaSO₄. Para el etanol no se observó una diferencia importante en cuanto a las concentraciones entre los dos factores y sus dos niveles.

La concentración lograda en este trabajo, utilizando digestato como inóculo, para etanol fue de 1.2 g/L, mientras que para butanol fue de 0.07 g/L, mismas que representan un 25 y 42% de incremento en la producción de los bioalcoholes comparado con las obtenidas utilizando como inóculo los lodos anaerobios. No existen trabajos en literatura que utilicen digestatos lignocelulósicos como inóculo contra los cuales comparar estos resultados.

En cuanto a los trabajos que utilizan lodos anaerobios como inóculo para la producción de etanol varía desde 0.8 a 2.9 g/L (Lin *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013; van Aarle *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2018) y los trabajos que utilizan sustrato lignocelulósico como sustrato y cultivos mixtos para la producción de butanol varía desde 0.9 a 2.3 g/L (Lin *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2012 a; Cheng *et al.*, 2012 b). Las concentraciones logradas en este trabajo fueron de 1.0 g/L de etanol y 0.006 g/L de butanol. Nuevamente concentraciones que se encuentran entre un 38 y 83% por debajo de lo reportado por dichos autores. Debido a que las condiciones de operación en cada trabajo fueron diferentes, y de manera general todos utilizaron un pH más neutro, lo que, según otros autores, aumenta la solubilización de los residuos y por lo tanto se convierten en sustancias fácilmente aprovechables por los microorganismos (Stein *et al.*, 2017).

En literatura existen pocos estudios sobre la manipulación del flujo de electrones para la producción de bioalcoholes. Entre los trabajos encontrados, se observó que la adición de mediadores REDOX (Du *et al.*, 2016) o aceptores de electrones como KNO₃, NaSO₄, CaSO₄ y FeSO₄ (Cheng *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2018) logró incrementar la producción de solventes entre 12 y 30% (Tabla 15). En este estudio, la adición del aceptor de electrones solo tuvo un efecto positivo en la producción de bioalcoholes (etanol y lodos) cuando se utilizaron los lodos anaerobios como inóculo, logrando incrementar la concentración un 19% comparado con el control.

Tabla 5-6. Producción de bioalcoholes utilizando aceptores de electrones en el medio.

Sustrato	Tipo de inóculo	Aceptor de electrones	Total solventes (g/L)	Aumento (%)	Referencia
Glucosa	Lodo anaerobio	Control FeSO ₄	5.2 7.4	30	Cheng <i>et al.</i> , 2012
Glucosa	<i>C. acetobutylicum</i> 55025	Control Rojo Neutral	21.3 24.2	12	Du <i>et al.</i> , 2016
Glucosa	<i>C. beijerinckii</i> IB4	Control FeSO ₄	10.8 12.5	14	Wu <i>et al.</i> , 2017
Glucosa	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Control NaSO ₄ CaSO ₄	16.1 21.3 21.4	24 25	Ding <i>et al.</i> , 2018
Efluente acidogénico	Digestato	Control CaSO ₄	0.84 1.04	19	Este estudio

5.2.2 Diseño Plackett-Burman

Siguiendo con la fermentación solventogénica en la segunda etapa y una vez seleccionado el tipo de inóculo a utilizar, se diseñó un experimento para estudiar el efecto de once factores sobre la producción de AGV y solventes. La figura 23 compara las cinéticas de producción de AGV y solventes para los tratamientos con mayor producción bioalcoholes (tratamientos 4 y 7), y el control. Se observó que la producción máxima de ácido acético fue de 11.7 g/L en el día 9 de operación con el tratamiento 4, mientras que para el ácido butírico fue de 6 g/L en el día 11 de operación con el mismo tratamiento. El mismo tratamiento 4 resultó con mayores producciones de butanol (100 mg/L promedio) y acetona (400 mg/L promedio) los días 11 y 9, respectivamente, sin embargo, para el etanol se observó que las concentraciones máximas (1.2 g/L) se presentaron en el tratamiento 7. Los resultados de la producción de ABE se muestran en la Tabla 15.

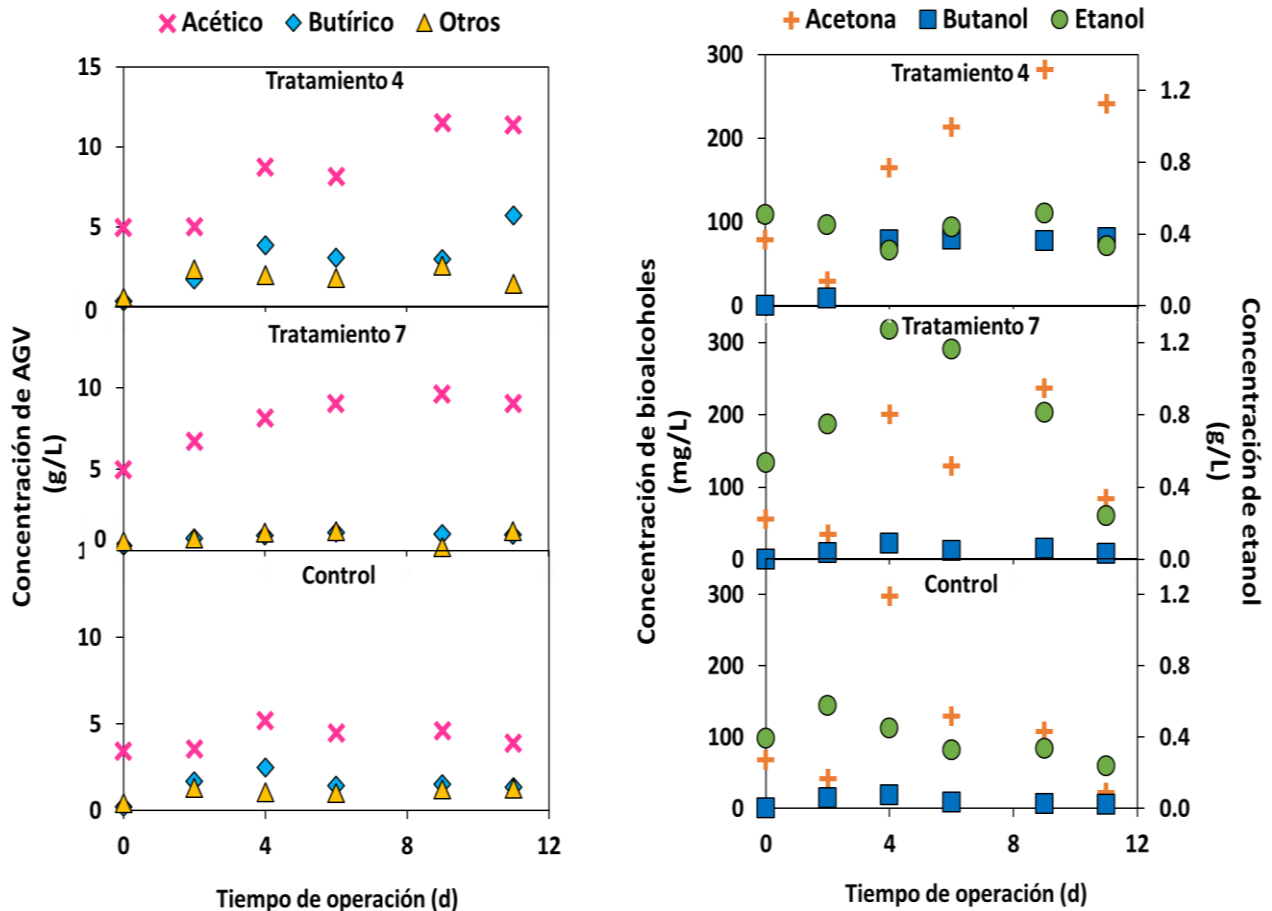


Figura 5-6. Cinéticas de producción de ácidos grasos volátiles y solventes (acetona-butanol-etanol) durante 11 días de incubación en los tratamientos 4, 7 y control del diseño Plackett-Burman.

Tabla 5-7. Producción de solventes (acetona-butanol-etanol) en el diseño Plackett-Burman.

Factor	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	Butanol mg/L	Etanol mg/L	Acetona mg/L
	Glucosa g/L	pH	Zn mg/L	Fe mg/L	NaSO ₄ g/L	Digestato % ST	Efluente acidogénico g DQO/L	<i>C.</i> <i>beijerinckii</i>	<i>C.</i> <i>botulinum</i>	<i>C.</i> <i>pasteurianum</i>	<i>C.</i> <i>aurantiabyticum</i>			
1	30	7.5	0	2	4	5	16	-	-	+	-	10.2	864.1	29.2
2	0	7.5	2	0	4	5	32	-	-	-	+	32.3	291.4	69.6
3	30	5.5	2	2	0	5	32	+	-	-	-	13.1	783.6	94.6
4	0	7.5	2	0	4	0	32	+	+	-	-	78.8	516.6	164.9
5	0	5.5	0	2	4	5	16	+	+	+	-	9.7	102.1	156.4
6	0	5.5	0	2	0	5	32	-	+	+	+	75.6	132.2	207.8
7	30	5.5	0	0	4	0	32	+	-	+	+	22.3	1269.5	201
8	30	7.5	0	0	0	5	16	+	+	-	+	14.4	1169.6	189.1
9	30	7.5	2	0	0	0	32	-	+	+	-	21.2	773.3	208.6
10	0	7.5	2	2	0	0	16	+	-	+	+	52.3	337.2	253.8
11	30	5.5	2	2	4	0	16	-	+	-	+	16.2	529.6	289.9
Control	0	5.5	0	0	0	0	16	-	-	-	-	19.2	335.7	297.2

Tabla 5-8. Análisis de varianza (ANOVA) para la producción de ABE.

Factor	Acetona		Butanol		Etanol	
	Valor F	Valor <i>p</i>	Valor F	Valor <i>p</i>	Valor F	Valor <i>p</i>
A-Glucosa	2.60	0.1822	26.80	0.0140	81.61	0.0008
B-Digestato	27.56	0.0063	18.72	0.0228	8.69	0.0420
C-Efluente acidogénico	0.56	0.4972	26.64	0.0141	1.80	0.2506
D-pH	8.95	0.0403	14.89	0.0308	21.25	0.0100
E-Zn	-	-	8.36	0.0629	3.85	0.1213
F-Fe	-	-	11.93	0.0408	-	-
G-NaSO ₄	10.21	0.0330	-	-	-	-
H- <i>C. beijerinckii</i>	5.75	0.0746	8.77	0.0595	-	-
K- <i>C. botulinum</i>	10.87	0.0300	-	-	4.72	0.0955
K- <i>C. pasteurianum</i>	-	-	6.75	0.0805	12.14	0.0253
L- <i>C. aurantiabutylicum</i>	-	-	-	-	-	-

Las concentraciones obtenidas durante el ensayo de Plackett-Burman se analizaron mediante un análisis de varianza para determinar qué factores tuvieron un efecto significativo sobre la producción de bioalcoholes ($p < 0.05$, Tabla 16).

Los factores que tuvieron un efecto significativo sobre la producción de acetona fueron: a) el pH, con un efecto positivo, b) la adición del aceptor de electrones (NaSO₄), con un efecto negativo, c) el digestato como inóculo, con un efecto negativo y d) la bioaumentación con *C. botulinum*, con un efecto positivo.

En la producción de acetona se observó que a pH de 5.5 se obtuvieron mayores producciones con 146 mg/L a las alcanzadas a pH de 7.5 de 60 mg/L. También, se observó un efecto negativo en la adición del aceptor de electrones, ya que los reactores en ausencia del NaSO₄ tuvieron mayores producciones alcanzando 140 mg/L, contra los que tuvieron adición de el NaSO₄ con concentraciones de 70 mg/L. La adición del digestato, tuvo un efecto negativo cuando se adicionó 5% de sólidos totales. Por último, se observó que la presencia de la cepa *C. botulinum* tuvo un efecto significativo positivo alcanzando concentraciones de 165 mg/L, mientras que los reactores a los cuales no se les adicionó la cepa obtuvieron concentraciones de 100 mg/L.

Los factores que tuvieron un efecto significativo sobre la producción de etanol fueron: a) glucosa, con un efecto positivo, b) el pH, con un efecto positivo, c) el digestato como inóculo, con un efecto negativo y d) la bioaumentación con *C. pasteurianum*, con un efecto negativo.

Para la producción de etanol se observó que la adición de 30 g/L de glucosa aumentó tres veces la concentración hasta alcanzar 1200 mg/L. Con pH de 7.5 se observó una mayor producción del bioalcohol alcanzando una producción de 900 mg/L comparado con los 450 mg/L producidos a pH de 5.5. La adición del digestato, tuvo un efecto negativo cuando se adicionó 5% de sólidos totales, disminuyendo casi 300 mg/L la concentración de etanol. Finalmente, la bioaumentación con la cepa *C. pasteurianum* resultó en un efecto negativo, ya que en ausencia de esta cepa se alcanzaron concentraciones máximas de 650 mg/L contra 400 mg/L producidos con presencia de esta cepa, lo que pudo deberse a la baja adaptación de la cepa en el medio.

Los factores que tuvieron un efecto significativo sobre la producción de butanol fueron: a) glucosa, con un efecto negativo, b) el pH, con un efecto positivo, c) la adición de Fe, con un efecto positivo, d) el digestato como inóculo, con un efecto negativo y e) el efluente acidogénico, con un efecto positivo. La adición de glucosa tuvo un efecto negativo en la producción, ya que aquellos reactores a los cuales no se les adicionó glucosa tuvieron concentraciones máximas de butanol de 40 mg/L, comparado con los reactores a los cuales se les agregó la glucosa, obteniendo concentraciones inferiores (19 mg/L). A un pH de 7.5 se observó una mayor producción (42 mg/L) contra aquellos reactores que se operaron a un pH de 5.5 que tuvieron concentraciones máximas de 17 mg/L. También adición del micronutriente Fe duplicó producción de butanol. La adición del digestato, tuvo un efecto negativo cuando se adicionó 5% de sólidos totales, ya que el digestato funciona como fuente de carbono y sustrato en el medio, lo cual podría ser inhibitorio al crear competencia entre los microorganismos. Finalmente se observó que la adición del efluente acidogénico a una concentración de 32 g DQO/L incrementó la producción alcanzando concentraciones de butanol de 50 mg/L comparado con los 18 mg/L alcanzados a concentraciones de 16 g DQO/L del efluente.

De acuerdo a los efectos que resultaron significativos de manera positiva para la producción de butanol, se realizó una búsqueda de trabajos reportados con condiciones similares a las empleadas en este ensayo Plackett-Burman (Tabla 17). Podemos observar que los trabajos que utilizaron efluentes acidogénicos como sustratos (Qureshi *et al.*, 2008; Al-Shorgani *et al.*, 2012; Linggang *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2017) reportan valores que van de 0.2 a 4.7 g/L, mismos que al operar bajo dos condiciones presentan incrementos en la producción de butanol que van del 20 al 40%. Esta tendencia se observa en los resultados obtenidos en el ensayo, ya que el incremento en la producción de butanol al usar la concentración del 100% del efluente acidogénico fue de 43%.

En cuanto a los trabajos que evalúan el efecto del pH sobre la producción de butanol (Jiang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; Al-Shorgani *et al.*, 2018) los valores van de 5.2 a 12.9 g/L, con porcentajes de incremento que van del 12 al 21%. Las concentraciones tan altas reportadas en estos trabajos pueden deberse al tipo de sustrato que utilizaron, como Jiang *et al.* (2014) y Al-Shorgani *et al.* (2018) que usaron glucosa en su medio, sustrato que es fácilmente metabolizado por las bacterias fermentativas, mientras que Wu *et al.* (2015), utiliza bagazo de caña de azúcar, mismo que puede servir como fuente de carbono y fuente de microorganismos para el medio, como inmovilizador

celular, que prohíbe la inhibición por concentración de células de las cepas de Clostridium y de esta manera obtener mayores concentraciones del bioalcohol.

Finalmente, para el factor de Fe, los trabajos encontrados tienen valores que van de 0.02 a 12.6 g/L de butanol. Estos trabajos difieren mucho en sus resultados debido a la comunidad microbiana presente en los rectores, ya que mientras Lee et al. (2001) utiliza lodos anaerobios para la producción del bioalcohol, Junelles et al. (1988) y Wu et al. (2017) utilizan mono cultivos de cepas de clostridium, lo cual garantizan la presencia de estas bacterias fermentativas en el medio, obteniendo así producciones importantes de butanol.

Tabla 5-9. Comparación de trabajos con los factores significativos sobre la producción de butanol.

Factor	Sustrato	Inóculo	Condiciones de operación		Producción butanol (g/L)		Incremento (%)	Autores
			Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo		
Efluente acidogénico (%)	Hidrolizado de fibra de maíz	<i>C. beijerinckii</i> BA101	30	75	0.9	1.4	36%	Qureshi et al., 2008
	Hidrolizado de palma	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	0	3	0.4	0.5	21%	Al-Shorgani et al., 2012
	Hidrolizado de residuos de Sago	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	30	70	2.2	3.5	37%	Linggang et al., 2013
pH	Glucosa	<i>C. beijerinckii</i> IB4	4.9	6	10.5	12.1	13%	Jiang et al., 2014
	Bagazo de caña de azúcar	<i>C. acetobutylicum</i> XY16	4.9	5.5	10.2	12.9	21%	Wu et al., 2015
	Glucosa	<i>C. acetobutylicum</i> YM1	4.8	5.5	5.2	5.9	12%	Al-Shorgani et al., 2018
Fe (g/L)	Glucosa	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	0.0002	0.01	9.4	12.6	25%	Junelles et al., 1988
	Sacarosa	Lodos anaerobios	0	0.2	0.02	0.1	80%	Lee et al., 2001
	Glucosa	<i>C. beijerinckii</i> IB4	0.01	0.25	10.2	12.1	16%	Wu et al., 2017
Efluente acidogénico (gDQO/L)	<i>C. beijerinckii</i> ; <i>C. botulinum</i>		16	32	0.02	0.08	43%	Este estudio
pH			5.5	7.5				
Fe (mg/L)			0	2				

5.3 Indicadores ambientales

La medición de impactos ambientales en la fase industrial se realizó por medio de dos indicadores: consumo de agua y emisiones de CO₂. La biorrefinería propuesta para producción de butanol tiene una capacidad de 1,000 toneladas de bagazo de caña de azúcar diarias y comprende un diseño con proceso de hidratación con tres bioprocesos basados en consorcios microbianos, la cogeneración de energía por medio de la quema de biogás (hidrógeno y metano) y residuos sólidos (lignina) y finalmente la destilación de bioalcoholes (denominado como propuesta base, Valdez-Vazquez y Sanchez, 2018).

En esta nueva propuesta se hicieron dos cambios importantes, con respecto a la propuesta base de Valdez-Vazquez y Sanchez (2018). Primero, se modificó el desempeño del reactor de H₂, de acuerdo a los resultados experimentales obtenidos con los reactores acidogénicos alimentados con bagazo de caña. De esta manera, la concentración de ácidos disminuye contra la propuesta base y con esto la producción de H₂ disminuye de 28.4 a 3.7 ton/d, así también como la producción de CH₄ que pasa de 112.3 a 19.6 ton/d contra la propuesta base. La otra gran modificación fue la fermentación ABE, donde la propuesta base solo considera la conversión de carbohidratos generando 10 g/L de butanol. En este trabajo se propone usar los efluentes del reactor acidogénico que contiene ácidos acético y butírico, los cuales incrementan la producción de acetona y butanol, respectivamente. Con esto, la producción total de acetona pasa de 10.7 a 17.6 ton/d, la producción de butanol pasa de 30.3 a 48.4 ton/d y la producción de etanol pasa de 1.2 a 9.1 ton/d (Tabla 18).

Tabla 5-10. Productos en biorrefinería base vs. propuesta.

Salidas (ton/d)	Base	Propuesta
H₂	28.4	3.7
CH₄	112.3	19.6
Butanol	30.3	48.4

5.3.1 Consumo de agua

El cálculo del consumo de agua de la biorrefinería para la transformación del bagazo de caña de azúcar en butanol, consistió en las entradas de agua dulce que ingresa a los reactores de hidratación, reactores acidogénicos, reactores solventogénicos, digestión para producción de metano, la generación de vapor y la generación de agua residual del proceso de destilación (vinazas). Se observó que en el escenario de la nueva propuesta la etapa de mayor consumo de agua fue el reactor de CH₄ con un 81%, esto debido a las modificaciones que se le hicieron al reactor de H₂, donde se estableció que las concentraciones de entrada de AGV fueran de 3.62 g/L de ácido acético y 2.91 g/L para ácido butírico. Al realizar este cambio en el modelo de refinería, el xilano no se degrada y por lo tanto se encuentra presente en los efluentes que ingresan al reactor de producción de metano. Debido a este cambio, para el reactor de CH₄ fue necesario hacer una dilución con agua para que el reactor pudiera ser operado, ya que, según diversos autores, la concentración máxima de DQO en el medio no debe de ser superior a los 5 g DQO/L para no tener efectos inhibitorios en la producción de metano (Buitrón *et al.*, 2019). Por lo que, tuvo que hacerse la adición de 43,520 ton/d de agua para llegar a esta concentración de DQO. Las otras etapas del proceso también requirieron de agua, el reactor de H₂ contribuyó con un 17% en el consumo de agua y finalmente la generación de vapor tuvo la menor contribución con un 2% del consumo de agua.

Al comparar entre escenarios, se observó que el escenario base presenta un consumo total de 19,687 ton/d de agua, y que la nueva propuesta es casi 3 veces más con 53,436 ton/d. (Figura 16).

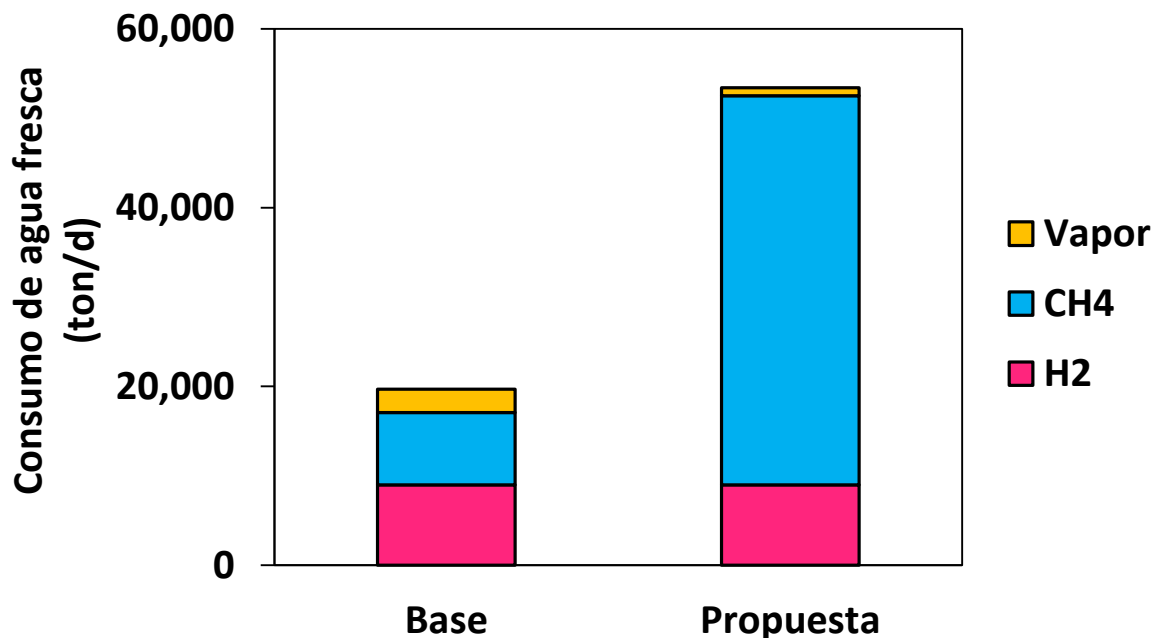


Figura 5-7. Consumo de agua por tonelada de caña de azúcar procesada para cada escenario.

5.3.2 Emisiones de CO₂

Se contabilizaron las emisiones de CO₂ de la biorrefinería para la transformación del bagazo de caña de azúcar en butanol, provenientes del reactor de H₂, el reactor ABE, el reactor de digestión anaerobia donde se produce CH₄ y la cogeneración. Se observó que, en el escenario propuesto, la etapa de mayor contribución de emisiones de CO₂ fue la combustión para generación de electricidad donde se quema el hidrógeno, metano y sólidos de la planta, seguido de los reactores ABE, de H₂ y CH₄ que emiten CO₂ por la respiración microbiana.

Al comparar entre escenarios, se observó que se reduce a menos de la mitad las emisiones, esto debido a que el desempeño del reactor de H₂ es menor en la biorrefinería propuesta, lo que reduce las emisiones de CO₂, y posteriormente una corriente menos concentrada en AGV al digestor anaerobio, también se ve reducida la producción de CH₄, junto con CO₂ (Figura 17).

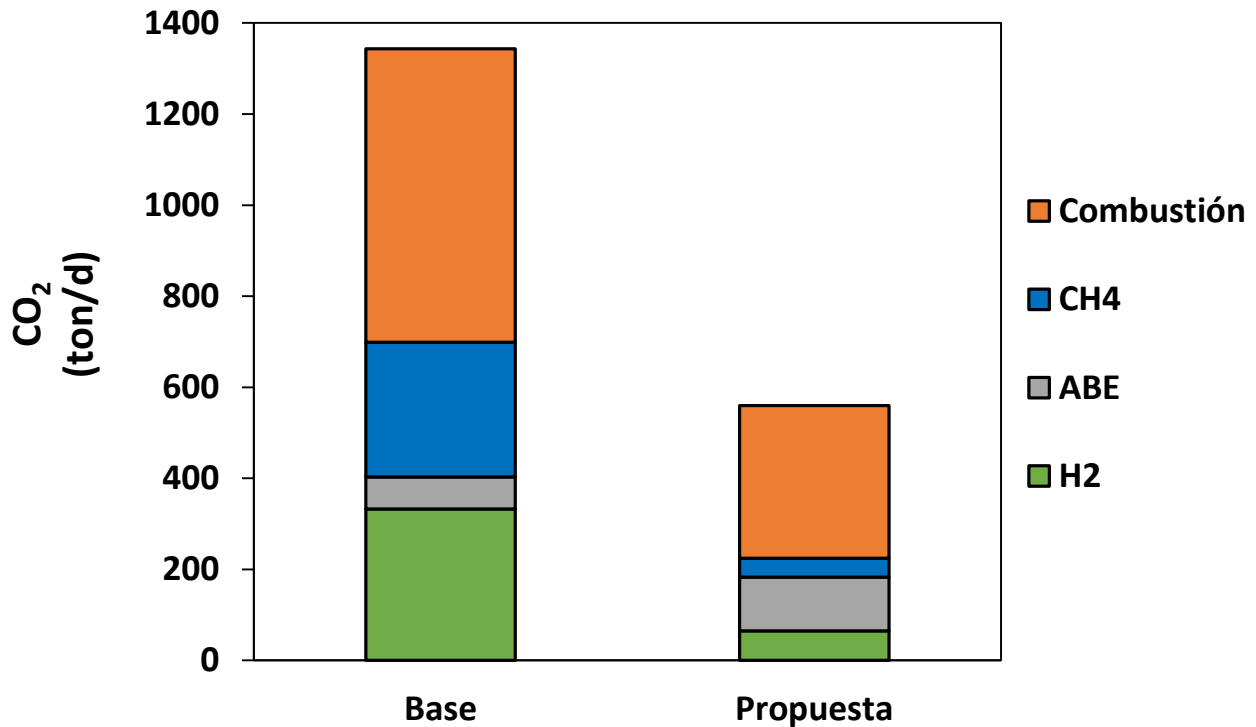


Figura 5-8. Emisiones de CO₂ por tonelada de caña de azúcar procesada para cada escenario.

5.4 Indicadores económicos

5.4.1 Eficiencia energética (EE)

La eficiencia energética es un indicador importante, donde la salida de energía generada en la biorrefinería es dividida entre la energía de entrada. La variable que define esta diferencia en la energía de cada escenario, es la salida de energía en forma del biocombustible, en este caso, butanol. Por lo que, está dada en gran medida por el rendimiento final del producto. Para esta nueva propuesta en el modelo de biorrefinería se obtuvieron flujos ABE correspondientes a 17,560 kg/d de acetona, 48,367 kg/d de butanol y 9,085 kg/d de etanol. Con rendimientos en consumo de agua de 650 ton H₂O/ton ButOH y en emisiones de 12 ton CO₂/ton ButOH. Se observó que el escenario propuesto el rendimiento es 21% mayor que en el escenario base.

Donde a pesar de producir menos H₂ y CH₄, éstos solo representan el 23% de la energía producida en el escenario base, por lo que su reducción no afecta la eficiencia energética en la propuesta de biorrefinería. Contrario a esto, al aumentar 21% el rendimiento de butanol, la eficiencia energética aumenta debido a la energía contenida en el butanol (Tabla 19).

5.4.2 Costos de producción

Para el cálculo del costo total de producción del butanol se contemplaron los costos de equipo, costo de la materia prima (bagazo de caña de azúcar) y costos totales de producción. Se observó que el escenario propuesto tuvo un costo 29% menor en comparación con la biorrefinería base, esto debido al aumento del rendimiento de butanol. Resultando así que al ser un producto con costos más bajos lo vuelve más accesible para el consumo (Tabla 19).

Tabla 5-11. Indicadores económicos en biorrefinería base vs. propuesta.

Salidas	Base	Propuesta
Costos (USD/L)	2.01	1.43
EER	1.28	1.63

6 CONCLUSIONES

De los reactores de pretratamiento biológico:

La carga orgánica tuvo un efecto significativo sobre la concentración total de AGV, donde la mayor producción de 13.9 g/L (expresado como ácido acético equivalente) se logró a la menor carga de 15 g ST/kg·d.

El pH no tuvo un efecto sobre la concentración total de AGV, pero sí sobre el perfil de los ácidos. Donde a un pH de 4.5 el ácido láctico fue el metabolito predominante mientras que a pH de 6.5 el metabolito predominante fue el ácido acético.

De la producción ABE con consorcios microbianos:

El tipo de inóculo tuvo un efecto significativo sobre la producción de bioalcoholes, donde el inóculo del digestato lignocelulósico logró la mayor producción de butanol de 55.7 mg/L, mientras que el inóculo de lodos anaerobios logró la mayor producción de etanol de 1,102.6 mg/L.

Los factores que tuvieron un efecto positivo sobre la producción de butanol fueron el pH de 7.5, efluente acidogénico de 32 g DQO/L y adición de Fe (2 mg/L) logrando la máxima concentración de 80.6 mg/L. Los factores que tuvieron un efecto positivo sobre la producción de etanol fueron la glucosa (30g/L) y un pH de 7.5 logrando una concentración máxima de 1,269.5 mg/L.

De los indicadores ambientales y económicos:

El consumo de agua dulce en la biorrefinería se incrementó al modificar el desempeño del reactor productor de H₂, por lo que el consumo total de la planta aumentó hasta 53,436 ton/d. Las emisiones de CO₂ en la propuesta de biorrefinería disminuyó debido a la baja producción de biogás (H₂ y CH₄), por lo que hubo una menor quema de CH₄ en la etapa de co-generación.

Derivar una parte de los efluentes acidogénicos para la producción de butanol resulta en un mayor rendimiento, por lo tanto, se reduce el costo de producción y se incrementa la eficiencia energética.

7 REFERENCIAS

- Aboudi, K., Álvarez-Gallego, C. J., & Romero-García, L. I. (2015). Semi-continuous anaerobic co-digestion of sugar beet byproduct and pig manure: effect of the organic loading rate (OLR) on process performance. *Bioresource technology*, 194, 283-290.
- Agarwal, A.K. (2007) Biofuels (alcohols and biodiesel) Applications as Fuels for Internal Combustion Engines en *Progress in Energy and Combustion Science*, 33, 233–271.
- Agbor, V.B. N. Cicek , R. Sparling , A. Berlín , DB Levin (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29, 675 - 685.
- Agematu, H., Takahashi, T., & Hamano, Y. (2017). Continuous volatile fatty acid production from lignocellulosic biomass by a novel rumen-mimetic bioprocess. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(5), 528-533.
- Al-Shorgani, N. K. N., Kalil, M. S., & Yusoff, W. M. W. (2012). Biobutanol production from rice bran and de-oiled rice bran by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Bioprocess Biosyst Eng*, 35(5), 817-826.
- Al-Shorgani, N. K. N., Kalil, M. S., Yusoff, W. M. W., & Hamid, A. A. (2018). Impact of pH and butyric acid on butanol production during batch fermentation using a new local isolate of *Clostridium acetobutylicum* YM1. *Saudi journal of biological sciences*, 25(2), 339-348.
- Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., y Dale, B.E., (2005). Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 121- 124,1133-41.
- Álvarez-Maciel, C. (2009) “Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional” en *Economía Informa*. 359, julio-agosto 2009, 63-89
- Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., & Lyberatos, G. (2010). Influence of pH on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(5), 1921-1928.
- Apha, A. (1998). Wef. Standard methods for the examination of water and wastewater.
- Atalla, R.H. , DL VanderHart Celulosa(1984). Un compuesto de dos formas cristalinas distintas. *Science*, 223, 283-285.
- Azar C.H., J. Holmberg y K. Lindgren (1996), Socio-ecological indicators for sustentability. *Ecological Economics*, 18, 89-112.
- Bahl, H., Andersch, W., Braun, K., & Gottschalk, G. (1982). Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 14(1), 17-20.

- Bhatia, S. K., Kim, S. H., Yoon, J. J., & Yang, Y. H. (2017). Current status and strategies for second generation biofuel production using microbial systems. *Energy Conversion and Management*, 148, 1142-1156.
- Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci.* 19, 797-841.
- Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in polymer science*, 19(5), 797-841.
- Boshoff, S., Gottumukkala, L. D., van Rensburg, E., & Görgens, J. (2016). Paper sludge (PS) to bioethanol: Evaluation of virgin and recycle mill sludge for low enzyme, high-solids fermentation. *Bioresource technology*, 203, 103-111.
- Brienzo, M., Tyhoda, L., Benjamin, Y., & Görgens, J. (2015). Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. *New biotechnology*, 32(2), 253-262.
- Buitrón, G., Hernández-Juárez, A., Hernández-Ramírez, M. D., & Sánchez, A. (2019). Biochemical methane potential from lignocellulosic wastes hydrothermally pretreated. *Industrial Crops and Products*, 139, 111555.
- Carrillo-Reyes, J., & Buitrón, G. (2016). Biohydrogen and methane production via a two-step process using an acid pretreated native microalgae consortium. *Bioresource technology*, 221, 324-330.
- Chandrasekaran, M., & Bahkali, A. H. (2013). Valorization of date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit processing by-products and wastes using bioprocess technology—Review. *Saudi journal of biological sciences*, 20(2), 105-120.
- Cheng, C. L., Che, P. Y., Chen, B. Y., Lee, W. J., Lin, C. Y., & Chang, J. S. (2012). Biobutanol production from agricultural waste by an acclimated mixed bacterial microflora. *Applied Energy*, 100, 3-9.
- Cheng, C. L., Che, P. Y., Chen, B. Y., Lee, W. J., Chien, L. J., & Chang, J. S. (2012). High yield bio-butanol production by solvent-producing bacterial microflora. *Bioresource Technology*, 113, 58-64.
- Chi, X., Li, J., Wang, X., Zhang, Y., & Antwi, P. (2018). Hyper-production of butyric acid from delignified rice straw by a novel consolidated bioprocess. *Bioresource technology*, 254, 115-120.
- Chisti, Y., & Yan, J. (2011). Energy from algae: current status and future trends: algal biofuels—a status report. *Applied Energy*, 88, 3277–3279.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, (2014). Estadísticas del agua en México.
- De la Cruz, J. L., & Chao, M. (2011). Manual de cálculo y reducción de huella de carbono en el sector hotelero, 70.
- Decker, K., Jungermann, K., & Thauer, R. K. (1970). Energy production in anaerobic organisms.

- Díaz, V. H. G., & Tost, G. O. (2018). Economic optimization of in situ extraction of inhibitors in acetone-ethanol-butanol (ABE) fermentation from lignocellulose. *Process biochemistry*, 70, 1-8.
- Ding, J., Luo, H., Xie, F., Wang, H., Xu, M., & Shi, Z. (2018). Electron receptor addition enhances butanol synthesis in ABE fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Bioresource technology*, 247, 1201-1205.
- Douglas, M. (2002). *Diseño y análisis de experimentos*. Limusa Wiley, Segunda Edición, México.
- Du, G. Q., Xue, C., Zhao, Q. Q., Xu, J., Liu, T., Chen, L. J., ... & Bai, F. W. (2016). Design of online off-gas analysis system for anaerobic ABE fermentation and the strategy for improving biobutanol production. *Process Biochemistry*, 51(5), 555-560.
- DuBois, M. Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal.Chem.* 28, 350-356.
- Duff, S.J.B., y Murray, W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 55 (1): 1-33.
- Dürre, P. (2007). Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2(12), 1525-1534.
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2003). Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(6), 595-603.
- Fangkum, A., & Reungsang, A. (2011). Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: effects of initial pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14), 8687-8696.
- Farrell, A. E., Plevin, R. J., Turner, B. T., Jones, A. D., O'hare, M., & Kammen, D. M. (2006). Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science*, 311(5760), 506-508.
- Feng, K., Li, H., & Zheng, C. (2018). Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresource technology*, 270, 180-188.
- Fingerman, KR, Torn, MS, O'Hare, MH, y Kammen, DM (2010). Contabilización de los impactos hídricos de la producción de etanol. *Cartas de investigación ambiental*, 5 (1), 014020.).
- Galbe, M., y Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 618- 628.
- García, C. A., Fuentes, A., Hennecke, A., Riegelhaupt, E., Manzini, F., & Masera, O. (2011). Life-cycle greenhouse gas emissions and energy balances of sugarcane ethanol production in Mexico. *Applied Energy*, 88(6), 2088-2097.

- Gerbens-Leenes, W., Hoekstra, A. Y., & van der Meer, T. H. (2009). The water footprint of bioenergy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10219-10223.
- Gheshlaghi, R. E. Z. A., Scharer, J. M., Moo-Young, M., & Chou, C. P. (2009). Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnology advances*, 27(6), 764-781.
- Girio, F.M., C. Fonseca, F. Carvalheiro, LC Duarte, S. Marques, R. Bogel-Lukasik (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101, 4775-4800.
- Green E.M. (2011). Fermentative production of butanol—the industrial perspective, *Curr Opin Biotechnol*, 22, 337-343.
- Hach. (2008). Oxygen Demand, Chemical, in: *Water Analysis Handbook*. HACH COMPANY, Loveland, Colorado, USA., pp. 901-912.
- Hayes, C. J., Burgess Jr, D. R., & Manion, J. A. (2015). Combustion pathways of biofuel model compounds: A review of recent research and current challenges pertaining to first-, second-, and third-generation biofuels. In *Advances in Physical Organic Chemistry* (Vol. 49, pp. 103-187). Academic Press.
- Hernández, C., Escamilla-Alvarado, C., Sánchez, A., Alarcón, E., Ziarelli, F., Musule, R., & Valdez-Vazquez, I. (2019). Wheat straw, corn stover, sugarcane, and Agave biomasses: chemical properties, availability, and cellulosic-bioethanol production potential in Mexico. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*.
- Hertwich, E. y G. P. Peters. (2009). Carbon Footprint of Nations: A Global, Trade-Linked Analysis. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 6414-6420.
- Hoekstra, A. Y. (2003). Virtual water: An introduction. In *Virtual water trade: Proceedings of the international expert meeting on virtual water trade*. Value of water research report series, 11, 13-23.
- Hon, D. N. S., & Shiraishi, N. W. (2001). *Cellulosic chemistry*. New York: Marcel Dekker.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, (2016). Efectos del cambio climático. Fecha de publicación 10 de noviembre.
- IPCC, (2007). Summary for Policymakers. Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. 36.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS), (1994). Environmental Health Criteria No. 170: Assessing human health risks of chemicals: Derivation of guidance values for health-based exposure limits. World Health Organization, Geneva.
- Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., & Watanabe, T. (2003). Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology*. 103, 273-280.
- Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C., & Li, M. (2013). Volatile fatty acids production

- from food waste: effects of pH, temperature, and organic loading rate. *Bioresource technology*, 143, 525-530.
- Jiang, M., Chen, J. N., He, A. Y., Wu, H., Kong, X. P., Liu, J. L., & Chen, P. (2014). Enhanced acetone/butanol/ethanol production by *Clostridium beijerinckii* IB4 using pH control strategy. *Process Biochemistry*, 49(8), 1238-1244.
- Junelles, A. M., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H., & Gay, R. (1988). Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Current Microbiology*, 17(5), 299-303.
- Karlapudi, A. P., Krupanidhi, S., Reddy, R., Indira, M., Md, N. B., & Venkateswarulu, T. C. (2018). Plackett-Burman design for screening of process components and their effects on production of lactase by newly isolated *Bacillus* sp. VUVD101 strain from Dairy effluent. *Beni-Suef University journal of basic and applied sciences*, 7(4), 543-546.
- Karue, J., Kinyua, A. M., & El-Busaidy, A. H. S. (1992). Measured components in total suspended particulate matter in a Kenyan urban area. *Atmospheric Environment. Part B. Urban Atmosphere*, 26 (4), 505-511.
- Kim, B. H., Bellows, P., Datta, R., & Zeikus, J. G. (1984). Control of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentations: utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(4), 764-770.
- Kiyoshi, K., Furukawa, M., Seyama, T., Kadokura, T., Nakazato, A., & Nakayama, S. (2015). Butanol production from alkali-pretreated rice straw by co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Bioresource technology*, 186, 325-328.
- Kraemer, K., Harwardt, A., Bronneberg, R., Marquardt, W. (2011). Separation of butanol from acetone-butanol-ethanol fermentation by a hybrid extraction-distillation process, *Comput Chem Eng*, 35, 949-963.
- Krishna, S.H., T. Reddy, J., y Chowdary, G.V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*. 77, 193-196.
- Kujawski, J., Rozicka, M. Bryjak, A., Kujawski, W. (2014). Pervaporative removal of acetone, butanol and ethanol from binary and multicomponent aqueous mixtures, *Sep Purif Technol*, 132, 422-429.
- Kumar, A. N., & Mohan, S. V. (2018). Acidogenic valorization of vegetable waste for short chain carboxylic acids and biohydrogen production: Influence of pretreatment and pH. *Journal of cleaner production*, 203, 1055-1066.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., & Dale, B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124.
- Lee, Y. J., Miyahara, T., & Noike, T. (2001). Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 80(3), 227-231.

- Lee S.Y., Park J.H., Jang S.H., Nielsen L.K., Kim J. & Jung K.S. (2008) Fermentative butanol, production by Clostridia. *Biotechnol. Bioeng.*, 101, 209-228.
- Lenz, H. P., S. Prüller, y D. Gruden (2003), “Means of Transportation and Their Effect on the Environment”, en D. Gruden (comp.), *The Handbook of Environmental Chemistry*, parte T, “Traffic and Environment”, Vol. 3, pp. 107-173.
- Ley de Promoción y Desarrollo de los bioenergéticos, Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos, México, Distrito Federal, 1° de febrero de 2008.
- Li, M. F., Fan, Y. M., Xu, F., Sun, R. C., & Zhang, X. L. (2010). Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: Characterization of the cellulose rich fraction. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 551-559.
- Li, J., Chi, X., Zhang, Y., & Wang, X. (2018). Enhanced coproduction of hydrogen and butanol from rice straw by a novel two-stage fermentation process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 127, 62-68.
- Lim, S. J., Kim, B. J., Jeong, C. M., Ahn, Y. H., & Chang, H. N. (2008). Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. *Bioresource Technology*, 99(16), 7866-7874.
- Lin, C. W., Wu, C. H., Tran, D. T., Shih, M. C., Li, W. H., & Wu, C. F. (2011). Mixed culture fermentation from lignocellulosic materials using thermophilic lignocellulose-degrading anaerobes. *Process Biochemistry*, 46(2), 489-493.
- Linggang, S., Phang, L. Y., Wasoh, H., & Abd-Aziz, S. (2013). Acetone–butanol–ethanol production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using sago pith residues hydrolysate. *BioEnergy Research*, 6(1), 321-328.
- Liu, C., y Wyman, C.E. (2003). The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 5409–5416.
- Lopes, M. L., de Lima Paulillo, S. C., Godoy, A., Cherubin, R. A., Lorenzi, M. S., Giometti, F. H. C., & de Amorim, H. V. (2016). Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 64-76.
- Martínez, A.T., Barrasa, J.m., Almendros, G., Gonzalez A.E., (1990). Fungal transportation of lignocellulosics as revealed by chemical and ultrastructural analyses. *Advances in biological treatment of lignocellulosic materials*, 129-147.
- Medina, M., Lara, L., & de la Garza, H. (2011). Aprovechamiento de materiales lignocelulosicos para la producción de etanol como carburante. *Acta Química Mexicana*, 35-41.
- Metcalf, I. N. C. (2003). *Wastewater engineering; treatment and reuse*. McGraw-Hill.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93.

- Muñoz-Páez, K. M., Alvarado-Michi, E. L., Buitrón, G., & Valdez-Vazquez, I. (2019). Distinct effects of furfural, hydroxymethylfurfural and its mixtures on dark fermentation hydrogen production and microbial structure of a mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(4), 2289-2297.
- Murali, N., Fernandez, S., & Ahring, B. K. (2017). Fermentation of wet-exploded corn stover for the production of volatile fatty acids. *Bioresource technology*, 227, 197-204.
- Nithyanandan K, Wu H, Huo M, Lee C-F. A (2014). Preliminary investigation of the performance and emissions of a port-fuel injected SI engine fueled with acetone-butanol-ethanol (ABE) and Gasoline. SAE Technical Paper, 2014-01-1459.
- Orjuela, Javier.A; Huertas, Isaac; Figueroa, Juan.C; Kalenatic, Dusko. & Kadena, Katerine. (2011). Potencial de producción de Bioetanol a partir de Caña Panelera: dinámica entre contaminación, seguridad alimentaria y uso del suelo. *Ingeniería*, 16(1), 6-26.
- Padgett, J.P., Steinemann, A.C., Clarke, J.H., & Vandenberg, M.P. (2008). A comparison of carbon calculators. *Environmental Impact Assessment Review*, 28, 106-115.
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B.(2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxication. *Bioresource Technology*, 74, 17-24.
- Pandey, D., Agrawal, M., & Pandey, J. S. (2011). Carbon footprint: current methods of estimation. *Environ Monit Assess*, 178(1), 135-160.
- Park, CH, Okos, MR, y Wankat, PC (1989). Fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) en un reactor de lecho de células inmovilizadas. *Biotecnología y bioingeniería* , 34 (1), 18-29.
- Patinvoh, R. J., Mehrjerdi, A. K., Horváth, I. S., & Taherzadeh, M. J. (2017). Dry fermentation of manure with straw in continuous plug flow reactor: Reactor development and process stability at different loading rates. *Bioresource technology*, 224, 197-205.
- Pérez Rangel, Marisol, Idania Valdez Vázquez y Jaquelina González Castañeda. *Diseño De Un Consorcio Microbiano Artificial Para La Conversión De Sustratos Lignocelulosicos En Biohidrogeno* . Irapuato, Guanajuato .: La Autora, 2014.
- Pérez-Rangel, M., Quiroz-Figueroa, F. R., González-Castañeda, J., & Valdez-Vazquez, I. (2015). Microscopic analysis of wheat straw cell wall degradation by microbial consortia for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(1), 151-160.
- Procentese, A., Raganati, F., Olivieri, G., Russo, M. E., Salatino, P., & Marzocchella, A. (2015). Continuous xylose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*—Assessment of solventogenic kinetics. *Bioresource technology*, 192, 142-148.
- Qureshi, N., Ezeji, T. C., Ebener, J., Dien, B. S., Cotta, M. A., & Blaschek, H. P. (2008). Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresource technology*, 99(13), 5915-5922.
- Ramos, C., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., & Chamy, R. (2012). Effect of the initial total solids

- concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(18), 13288-13295.
- Randelli, F. (2009). An integrated analysis of production costs and net energy balance of biofuels. *Reg Environ Change*, 9(3), 221-229.
- Renderos, R. (2016). Huella hídrica del cultivo de caña de azúcar, (Julio 2014).
- Riaño, A. M., Gutiérrez Morales, A. I., Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, C. A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *RevistaTumbaga*, 1(5).
- Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F. M., Marchettini, N., & Bastianoni, S. (2016). Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 221-227.
- Salvador, A. R. (2010). Aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.(Esp)*, 104, 331-345.
- Sanchez, A., Magaña, G., Gomez, D., Solís, M., & Banares-Alcantara, R. (2014). Bidimensional sustainability analysis of lignocellulosic ethanol production processes. Method and case study. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(5), 670-685.
- Sanchez, A., Magaña, G., Partida, M. I., & Sanchez, S. (2016). Bi-dimensional sustainability analysis of a multi-feed biorefinery design for biofuels co-production from lignocellulosic residues and agro-industrial wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 107, 195-217.
- Sanchez, A., Valdez-Vazquez, I., Soto, A., Sánchez, S., & Tavarez, D. (2017). Lignocellulosic n-butanol co-production in an advanced biorefinery using mixed cultures. *Biomass and Bioenergy*, 102, 1–12.
- Sánchez, Ó.J., y Cardona, C.A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 30 (11), 671-678.
- Sanchez, O.J. & Cardona, C.A. (2008) Trends in Biotechnological Production of Fuel Ethanol from Different Feedstocks. *Bioresource Technology*, 99, 5270-5295.
- Sanz Ferreruela, J. (2016). Análisis tecno-económico del proceso de producción de butanol a partir de biomasa lignocelulósica por la vía termoquímica.
- Sarandón, S. J. (2011). La agricultura como actividad transformadora del ambiente. El impacto de la agricultura intensiva de la Revolución Verde. *Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable*, 1, 23-47.
- Schafer, A. y Victor, D. G. (1999) 'Global passenger travel: Implications for carbon dioxide emissions', *Energy*, 24(8), 657–679.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2015). Base de datos de producción agrícola anual.

- Secretaría de Energía (2014), “Balance Nacional de Energía”. Periodo 2004-2014, https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/44353/Balance_Nacional_de_Energ_a_2014.pdf
- Secretaría de Energía (2015), “Balance Nacional de Energía”. Periodo 2007-2017, https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/414843/Balance_Nacional_de_Energ_a_2017.pdf
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Cambio climático (2015), Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave, de Desempeño Ambiental y de Crecimiento Verde. Edición 2015.
- Sentíes-Herrera, H. E., Gómez-Merino, F. C., Valdez-Balero, A., Silva-Rojas, H. V., & Trejo-Téllez, L. I. (2014). The agro-Industrial sugarcane system in Mexico: Current status, challenges and opportunities. *Journal of Agricultural Science*, 6(4), 26.
- Shanmugam, S., Sun, C., Chen, Z., & Wu, Y. R. (2019). Enhanced bioconversion of hemicellulosic biomass by microbial consortium for biobutanol production with bioaugmentation strategy. *Bioresource technology*.
- Sheng, Y., Wu, J., Zhao, L., Wu, C., Qi, Z., & Cao, G. (2019). Optimization of Culture Conditions for Enhanced Butanol Production by a High Butanol Tolerant *Clostridium Beijerinckii* F-6. *Energy Procedia*, 158, 471-476.
- Sheridan, T. B. (2002). Humans and automation: System design and research issues. *Human Factors and Ergonomics Society*.
- Slezak, R., Grzelak, J., Krzystek, L., & Ledakowicz, S. (2017). The effect of initial organic load of the kitchen waste on the production of VFA and H₂ in dark fermentation. *Waste Management*, 68, 610-617.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure, 1617, 1-16.
- Stein, U. H., Wimmer, B., Ortner, M., Fuchs, W., & Bochmann, G. (2017). Maximizing the production of butyric acid from food waste as a precursor for ABE-fermentation. *Science of The Total Environment*, 598, 993-1000.
- Sun, Y., y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83 (1), 1-11.
- Swatloski, R.P., SK Spear, JD Holbrey, RD Rogers (2002). Disolución de líquidos celídicos celíacos, *JACS*, 124(18), 4974 - 4975.
- Tai, M., y Stephanopoulos, G. (2013). Ingeniería del empuje y arrastre de la biosíntesis de lípidos en la levadura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* para la producción de biocombustibles. *Ingeniería metabólica*, 15, 1-9.

- Timilsina, G. R., & Mevel, S. (2013). Biofuels and climate change mitigation: a CGE analysis incorporating land-use change. *Environ Resource Econ*, 55(1), 1-19.
- Tsai, T. Y., Lo, Y. C., & Chang, J. S. (2014). Effect of medium composition and pH control strategies on butanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum*. *Energy Procedia*, 61, 1691-1694.
- Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparza-Garcia, F., Cecchi, F., & Poggi-Varaldo, H. M. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(13-14), 1383-1391.
- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J. A., & Hernández-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 2147-2153.
- Valdez-Vazquez, I., Pérez-Rangel, M., Tapia, A., Buitrón, G., Molina, C., Hernández, G., & Amaya-Delgado, L. (2015). Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of *Enterococcus* and *Clostridium*. *Fuel*, 159, 214-222.
- Valdez-Vazquez, I., & Sanchez, A. (2018). Proposal for biorefineries based on mixed cultures for lignocellulosic biofuel production: a techno-economic analysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(1), 56-67.
- Van Aarle, I. M., Perimenis, A., Lima-Ramos, J., de Hults, E., George, I. F., & Gerin, P. A. (2015). Mixed inoculum origin and lignocellulosic substrate type both influence the production of volatile fatty acids during acidogenic fermentation. *Biochemical engineering journal*, 103, 242-249.
- Van Soest, P. J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 46, 829-835.
- Wang, S., Tao, X., Zhang, G., Zhang, P., Wang, H., Ye, J., & Nabi, M. (2019). Benefit of solid-liquid separation on volatile fatty acid production from grass clipping with ultrasound-calcium hydroxide pretreatment. *Bioresource technology*, 274, 97-104.
- Wiedmann, T. (2009). A review of recent multi-region input–output models used for consumption-based emission and resource accounting. *Ecological Economics*, 69(2), 211-222.
- Wiselogle, A. E., Agblevor, F. A., Johnson, D. K., Deutch, S., Fennell, J. A., & Sanderson, M. A. (1996). Compositional changes during storage of large round switchgrass bales. *Bioresource technology*, 56(1), 103-109.
- Wu, H., He, A. Y., Kong, X. P., Jiang, M., Chen, X. P., Zhu, D. W., ... & Jin, W. Q. (2015). Acetone–butanol–ethanol production using pH control strategy and immobilized cells in an integrated fermentation–pervaporation process. *Process biochemistry*, 50(4), 614-622.

- Wu, Y. D., Xue, C., Chen, L. J., & Bai, F. W. (2016). Impact of zinc supplementation on the improved fructose/xylose utilization and butanol production during acetone–butanol–ethanol fermentation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 121(1), 66-72.
- Wu, Y., Wang, C., Zheng, M., Zuo, J., Wu, J., Wang, K., & Yang, B. (2017). Effect of pH on ethanol-type acidogenic fermentation of fruit and vegetable waste. *Waste Management*, 60, 158-163.
- Wu, H., Wang, C., Chen, P., He, A. Y., Xing, F. X., Kong, X. P., & Jiang, M. (2017). Effects of pH and ferrous iron on the coproduction of butanol and hydrogen by *Clostridium beijerinckii* IB4. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(10), 6547-6555.
- Yıldız, İ. (2018). 1.12 Fossil Fuels. *Comprehensive Energy Systems*, 521–567.
- Yu, J., Zhang, J., He, J., Liu, Z. y Yu, Z. (2009). Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource Technology*, 100, 903–908.
- Zhao, Y., Wu, J., Yuan, X., Zhu, W., Wang, X., Cheng, X., & Cui, Z. (2017). The effect of mixing intensity on the performance and microbial dynamics of a single vertical reactor integrating acidogenic and methanogenic phases in lignocellulosic biomass digestion. *Bioresource technology*, 238, 542-551.
- Zheng, Y-Z., Lin, H-M y Tsao, G.T. (1998). Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnology Progress*. 14 (6): 890-896.
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42, 35-53.
- Zheng, J., Tashiro, Y., Zhao, T., Wang, Q., Sakai, K., & Sonomoto, K. (2017). Enhancement of acetone-butanol-ethanol fermentation from eucalyptus hydrolysate with optimized nutrient supplementation through statistical experimental designs. *Renewable Energy*, 113, 580-586.
- Zhou, Y., Li, C., Nges, I. A., & Liu, J. (2017). The effects of pre-aeration and inoculation on solid-state anaerobic digestion of rice straw. *Bioresource technology*, 224, 78-86.
- Zverlov, V. ,O. Berezina, G. Velikodvorskaya, W. Schwarz (2006). Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery, *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, 587-597.