



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A
PARTIR DE RESIDUOS DE NARANJA *Citrus spp.*
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

TESIS DE DOCTORADO

M.C.Q. BRENDA MARÍA CORONA VÁZQUEZ

DIRIGIDA POR:

Dra. GABRIELA ROA MORALES

Dra. REYNA NATIVIDAD RANGEL

Dra. PATRICIA BALDERAS HERNÁNDEZ



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2017

DEDICATORIAS

A Dios, que en su grandeza y bondad me permite estar,

A mi esposo e hijas por su gran amor, cariño, paciencia y apoyo,

A mis padres por su gran ayuda y amor inalterable e incondicional y

A mi familia por su interés, ideas aportadas y perspectivas de mí, aunque inmerecidas

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores por su guía y confianza, especialmente a la Dra. Gabriela Roa Morales que mucho antes del desarrollo de este trabajo me ha apoyado y considerado,

A mis compañeros por su entusiasmo y aportaciones para lograr terminar los experimentos,

A la Facultad de Química de la UAEMex, por las facilidades que me otorgó para realizar el trabajo y

A Conacyt por la beca otorgada durante todo el periodo.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE GRÁFICOS	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN.....	12
CAPITULO 1	14
ANTECEDENTES	14
1.1. Proceso de obtención.....	20
1.2. Técnicas analíticas.....	31
CAPÍTULO 2	32
2.1 HIPÓTESIS	32
2.2 OBJETIVOS.....	32
2.2.1 OBJETIVO GENERAL	32
2.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	32
CAPITULO 3	33
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS.....	33
3.2. METODOLOGÍA.....	33
3.2.1. Análisis estadístico	33
3.2.2. Recolección de biomasa	33
3.2.3. Análisis proximal.....	33
3.2.4. Cuantificación de azúcares reductores	34
3.2.5 Métodos de hidrólisis.	35
3.2.6 Fermentación	37
3.2.7 Determinación de etanol por índice de refracción y cromatografía	41
3.2.8 Determinación de subproductos por gases y gases masas.....	41
3.3 UBICACIÓN E INFRAESTRUCTURA	41
CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1 HIDRÓLISIS	42
4.1.1. Hidrólisis ácida.....	42
4.1.2. Hidrólisis catalizada heterogéneamente.	44
4.1.3. Hidrólisis térmica	45
4.2 FERMENTACIÓN.....	53
4.2.1. Efecto de la concentración de glucosa en el tiempo de fermentación y % de disminución de glucosa	53
4.2.2. Efecto de la suma de nutrientes al hidrolizado.....	54
4.2.3. Efecto del tipo de hidrólisis en el rendimiento de etanol	54
4.2.4. Ciclos de fermentación	56

CAPÍTULO 5	58
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CAPÍTULO 6 ANEXOS	70
Primer artículo	70
Thermal Hydrolysis of Orange Peel and its Fermentation with Alginate Beads to Produce Ethanol.....	
Segundo artículo.....	81
Fermentation using Saccharomyces Cerevisiae to produce bioethanol: Recent improvements	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Beneficios de los combustibles (3).....	15
Tabla 2 Composición de algunas materias primas lignocelulósicas (5).....	16
Tabla 3 Resultados de la obtención de bioetanol a partir de diferentes biomásas.....	18
Tabla 4 Composición de la naranja en comparación con algunos otros residuos (19).....	19
Tabla 5 Tecnologías de pretratamiento más prometedoras (4).....	20
Tabla 6. Temperaturas de degradación de los principales componentes del material lignocelulósico.....	27
Tabla 7 Variables estudiadas en la hidrólisis ácida	35
Tabla 8 Variables estudiadas en la hidrólisis catalizada heterogéneamente.	36
Tabla 9 Tratamientos de hidrólisis	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de a) celulosa, b) hemicelulosa y c) lignina	17
Figura 2. Principales componentes de un material lignocelulósico (10): Lignina (rosa), celulosa (café claro) y hemicelulosa (café).....	17
Figura 3. Reacción general de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa	24
Figura 4. Reacción de fermentación alcohólica	28
Figura 5 Hidrolizados de cáscara de naranja con ácido en autoclave durante 15 y 60 min.	44
Figura 6 Reacción de hidrolizados con Lugol. P 1 MPa, 30 min, T de izq a der: 120 °C, 140 °C, 160 °C y 180 °C	47
Figura 7. Espectros IR-ATR de los sólidos obtenidos al final de la hidrólisis térmica: a) CN sin tratamiento, b) a 120 °C, c) a 140 °C, d) 160 °C, e) 180 °C, f) celulosa y g) lignina	48

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Efecto de la carga del ácido en el rendimiento de AR.....	42
Gráfico 2 Efecto del tiempo de reacción durante la hidrólisis ácida en el rendimiento de AR	43
Gráfico 3. Efecto del tipo y carga de catalizador y tiempo de reacción en el rendimiento de AR	45
Gráfico 4 Efecto de la T en el rendimiento de AR durante la hidrólisis térmica	46
Gráfico 5. Concentración de glucosa, fructosa y xilosa en hidrolizados según análisis de HPLC.....	49
Gráfico 6. Presencia de derivados de furano en los hidrolizados según análisis de HPLC. 50	
Gráfico 7 Efecto De la P en el rendimiento de AR	51
Gráfico 8 Efecto del tipo de gas en el rendimiento de AR con 2.5×10^{-2} g/ mL de CN: i) 1 MPa-N ₂ , ii) 1 MPa-CO ₂ , iii) 0.6 MPa-N ₂ , iv) 0.6 MPa-CO ₂ a 160 °C, 350 rpm y 30 min..	52
Gráfico 9 Efecto de la carga de CN en el rendimiento de AR durante la reacción de hidrólisis térmica.....	53
Gráfico 10 Efecto de la concentración de glucosa en el tiempo de fermentación y % de disminución de glucosa	54
Gráfico 11 Efecto del tipo de hidrólisis en el rendimiento de etanol.....	55
Gráfico 12 Ciclos de fermentación	56

RESUMEN

La obtención de nuevos combustibles que sustituyan a los derivados del petróleo tiene gran importancia hoy en día debido a los altos precios de las gasolinas y a problemas ambientales de contaminación por emisiones de gases con efecto invernadero. Un combustible alternativo a la gasolina es el bioetanol. Éste ha resultado ser una muy buena opción ya que reduce las emisiones de gases con efecto invernadero, tiene mayor octanaje y puede tener características similares a la gasolina a un menor costo. Además, se le pueden dar otros usos como combustible de chimeneas o para producción de bebidas alcohólicas. Sin embargo, su proceso de obtención y costo depende de la selección de la materia prima, pretratamiento, tipo de hidrólisis, condiciones de fermentación y destilación.

En este trabajo se produjo bioetanol a partir de residuos de cáscara de naranja (CN) *Citrus spp.* mediante la aplicación de una hidrólisis térmica en un reactor de presión y fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*. Durante la hidrólisis se estudiaron las variables de Temperatura (T) de 110 °C a 180 °C, Presión (P) de 0.5 MPa a 1 MPa, agitación, gas, tipo de catalizador y carga de cáscara. Para el caso de la fermentación se analizó el efecto de la presencia de la levadura en forma de polvo o esfera, la presencia de nutrientes, tiempo de crecimiento y de fermentación, agitación, número de ciclos y el efecto de la concentración inicial de glucosa.

Los resultados se midieron con base en el porcentaje de azúcares reductores obtenidos al final de la hidrólisis y con base en el porcentaje de bioetanol para el caso de la fermentación.

El proceso que dio valores más altos de azúcares reductores (AR): 0.47 g g⁻¹ (por cada gramo de cáscara de naranja); y que son valores comparables con los que se obtienen al aplicar hidrólisis ácida estudiada anteriormente (0.50 g g⁻¹), resultó ser el tratamiento a 160 °C, 6 MPa, 350 rpm, N₂ y 30 min. Mientras que el rendimiento mayor de bioetanol (132 L/1000 kg) se logró al fermentar hidrolizados provenientes de un tratamiento a 120 °C y no a 160 °C, utilizando esferas de levadura y 48 h de fermentación con agitación. Estos resultados son importantes debido a que se establecen condiciones con las que se logran rendimientos altos dando la posibilidad de montar algún reactor y escalar el proceso para la obtención de bioetanol a partir de residuos de cáscara de naranja. Además, debido a que

existen otros residuos con una composición similar, da pie a seguir la investigación utilizando mezclas de residuos y a largo plazo la creación de una planta generadora de biocombustible.

ABSTRACT

Production of new fuels to replace those derived from oil has become very important today because of higher gasoline prices and environmental pollution problems caused by emissions of greenhouse gases. An alternative fuel is bioethanol. This has proven to be a very good option as it reduces emissions of greenhouse gases, has higher octane number and has similar features to gasoline at a lower cost. Also it can be used as fireplaces fuel or to production of alcoholic beverages. However, its production process and cost depends on the selection of raw materials, pretreatment, hydrolysis, conditions of fermentation and product separation method.

In this work, bioethanol was produced from waste orange peel *Citrus spp.* by applying thermal hydrolysis in a pressure reactor and fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Hydrolysis variables studied were Temperature (T) of 110 °C to 180 °C, Pressure (P) of 0.5 MPa to 1 MPa, stirring, gas and catalyst type and waste loading. In the case of fermentation, the effect of the presence of yeast in the form of powder or bead, nutrients addition, growth time, agitation, number of cycles and the effect of initial concentration of glucose were analyzed.

Results were measured based on reducing sugar percentage obtained at the end of the hydrolysis and on the percentage of ethanol in case of fermentation.

Higher yields of reducing sugars RS: 0.47 g g⁻¹ (per gram of orange peel) were obtained from thermal hydrolysis at 160 °C, 0,6 MPa, 350 rpm, N₂ and 30 min whilst best results for bioethanol production (132 L/1000 kg) were reached with the hydrolysate obtained at 120 °C and fermented with alginate beads during 48 h.

These results are important because conditions which produce high yields are established, giving the possibility of mounting a reactor or scaling the process for obtaining bioethanol from orange peel residues. In addition, due to the existence of other residues with a similar composition, it allows research to be carried out using waste mixtures and in long term the creation of biofuel plant.

INTRODUCCIÓN

En años recientes, se ha incrementado la preocupación y el interés por obtener nuevos combustibles, debido a la contaminación ambiental, al crecimiento de la población y a la inestabilidad económica en el mundo.

La generación de gases con efecto invernadero incrementa de manera acelerada cada año. Se plantean y aplican en algunos casos alternativas de solución como por ejemplo utilizar energía eléctrica o solar.

Los biocombustibles surgen como una alternativa para poder solucionar parte del problema o incluso como transición combustible-biocombustible-energía solar, debido a que no es necesario hacer grandes cambios al automóvil que lo va a utilizar, se pueden obtener con procesos baratos y se reducen emisiones de gases con efecto invernadero comparadas con las emitidas por combustibles derivados del petróleo.

El bioetanol es uno de los biocombustibles más utilizados. Sin embargo, el proceso para la obtención de éste conlleva al seguimiento de una serie de tratamientos a la materia prima y especies biológicas involucradas, por ello la importancia de seleccionar y establecer un proceso con condiciones que permitan lograr que el proceso sea tanto barato como de alto rendimiento. Además, es necesario también considerar las técnicas analíticas adecuadas para tener resultados confiables sin necesidad de gastar más en reactivos o tiempo.

Adicional al problema económico y contaminación del aire, está la acumulación de residuos sólidos de composición variable, entre ellos desechos agrícolas u orgánicos, como las cáscaras de frutas o verduras, provocando contaminación visual y posible generación de especies nocivas.

Los residuos de naranja son abundantes, México es el cuarto productor mundial, con la producción de jugo y consumo de la fruta, estos residuos están disponibles todo el año, son baratos y tienen alto contenido de azúcares, por lo que se pueden aprovechar para la obtención de bioetanol, tanto el jugo como la cáscara.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se utilizaron residuos de cáscara de naranja para la producción de bioetanol modificando el proceso, aplicando una hidrólisis catalizada con sólidos y térmica, además de una fermentación con esferas de levadura y alginato para obtener un mayor rendimiento de bioetanol comparado tanto con una hidrólisis ácida como con la fermentación con levadura en forma de polvo.

En el capítulo 1 se encuentran los antecedentes del trabajo, donde se explica un poco más acerca de los biocombustibles y su proceso de obtención.

En el capítulo 2 se menciona la hipótesis planteada y los objetivos derivados de ella para desarrollar el proyecto.

En el capítulo 3 se encuentra los materiales y reactivos utilizados y la metodología detallada utilizada en el proceso de hidrólisis y fermentación.

En el capítulo 4 se presentan los resultados y la discusión de estos. Posteriormente, en el capítulo 5 se plantean las conclusiones del trabajo y algunas recomendaciones para trabajos posteriores. Las referencias que sirvieron de base y finalmente en el capítulo 6, se adjuntan los artículos elaborados como producto del proyecto de tesis.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

Actualmente, dependemos principalmente del petróleo para tener energía eléctrica, gasolina, y otros combustibles para realizar las actividades cotidianas. Por el crecimiento acelerado de industrias, urbanización y población, se tiene un problema de abastecimiento en algunos periodos y en otros casos se presentan altos precios. El problema continúa debido a que el petróleo no es renovable, las reservas son explotadas a un nivel mayor y es necesario buscar otras, invertir en ello e incluso prever consecuencias como la contaminación de mantos acuíferos por las maniobras de excavación en nuevas reservas y hacer un gasto para el manejo de estas circunstancias. Además, la gasolina y diésel, derivados del petróleo, al consumirse aumentan los niveles de contaminación en el aire debido a la producción de gases con efecto invernadero (1).

Ahora bien, se han buscado alternativas para generar energía, principalmente de fuentes renovables como la biomasa, el viento, agua, sol o el calor geotérmico que son energías limpias y amigables para el medio ambiente.

Aquí en México, de la energía proveniente de fuentes renovables, que es un 23% del total, sólo 4.4% proviene de biomasa considerando leña o carbón y biocombustibles en un 1%. Para el caso de China, Estados Unidos o Brasil, la energía proveniente fuentes renovables se encuentra cerca de un 40% (2).

Para el caso específico de la biomasa, que es materia orgánica de diversos orígenes, con composición heterogénea y que puede dividirse de forma general en agrícola o forestal (aunque también se considera biomasa a la materia orgánica proveniente de las aguas residuales y de los residuos sólidos urbanos), cabe mencionar que de ella es posible obtener energía en forma de biocombustibles como biodiesel, biogás, biohidrógeno, bioetanol y otros que presentan varios beneficios con impacto económico, ambiental y social (**Tabla 1**).

Tabla 1 Beneficios de los combustibles (3).	
Impactos económicos.	Sustentabilidad
	Diversidad de combustibles
	Mayores empleos
	Incrementan inversiones en plantas y equipos
	Desarrollo Agrícola
	Competitividad internacional
	Reducción de la dependencia del petróleo
Impactos ambientales	Reducción de gases con efecto invernadero
	Biodegradabilidad
	Mayor eficiencia de combustión
	Mejora del uso de la tierra y agua
Seguridad energética	Confiable de la fuente
	Reducción de uso de combustibles fósiles
	Disponibilidad
	Renovabilidad

Por esto, es interesante e importante la generación de energía y biocombustibles a partir de la biomasa. Si se usan residuos no, los costos de producción se reducen, no habría competencia entre alimento y fuente de energía y además se estaría disminuyendo la cantidad de residuos que van a la basura para generar otros gases y sustancias o fauna nociva.

Diversos materiales se han estudiado para lograr obtener biocombustibles. Sin embargo, no es fácil porque se deben considerar diversos factores y lograr disminuir costos para una producción a gran escala. Brasil y Estados Unidos son los mayores productores de etanol. Principalmente lo obtienen de la caña de azúcar y del maíz (4). Sin embargo, para prevenir la competencia entre alimento y fuente de energía, se buscan otras fuentes, como materiales ricos en almidón y los residuos lignocelulósicos que son de bajo costo y abundantes. Estos incluyen por ejemplo madera, residuos agrícolas, residuos municipales, papel usado y grasas.

La composición química del material lignocelulósico es un factor muy importante ya que afecta la eficiencia de producción del biocombustible. Principalmente consisten de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Tabla 2 Composición de algunas materias primas lignocelulósicas (5).

Materia Prima	Composición de carbohidratos (% peso seco)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Paja de cebada	36-43	24-33	6.3-9.8
Bambú	49-50	18-20	23
Residuo de plátano	13	15	14
Mazorca de maíz	32.3-45.6	39.8	6.7-13.9
Algodón	85-95	5-15	0
Tallo del algodón	31	11	30
Pulpa de café	33.7-36.9	44.2-47.5	15.6-19.1
Abeto	35-48	20-22	15-21
Eucalipto	45-51	11-18	29
Vástago de madera dura	40-55	24-40	18-25
Paja de arroz	29.2-34.7	23-25.9	17-19
Cáscara de arroz	28.7-35.6	11.96-29.3	15.4-20
Paja de trigo	35-39	22-30	12-16
Salvado de trigo	10.5-14.8	35.5-39.2	8.3-12.5
Hierbas	25-40	25-50	10-30
Periódico	40-55	24-39	18-30
Bagazo de la caña de azúcar	25-45	28-32	15-25
Pino	42-49	13-25	23-29
Madera del álamo	45-51	25-28	10-21
Biomasa del olivo	25.2	15.8	19.1
Fibra de yute	45-53	18-21	21-26
Centeno	29-30	22-26	16.1
Vástago de madera blanda	45-50	24-40	18-25
Paja de avena	31-35	20-26	10-15
Paja de nuez	25-30	22-28	30-40
Polvo de tamarindo	10-15	55-65	-
Cáscara de naranja	37.1	11	7.5

La celulosa es un polímero de glucosa y la hemicelulosa de azúcares pentosas y hexosas como xilosa, arabinosa, glucosa, entre otras (6). Al ser hidrolizados se producen polisacáridos con un número menor de unidades de azúcar como oligosacáridos,

disacáridos o hasta monosacáridos, dependiendo de la intensidad del tratamiento. Estos posteriormente al ser fermentados son transformados a bioetanol (7). El rendimiento del proceso entonces depende de la concentración de estos polisacáridos.

La lignina, por su parte, es un polímero complejo con unidades de fenilpropano que hace resistente al material frente a la biodegradación ya que su función es similar a la de un cemento para unir la celulosa y hemicelulosa, por lo que un contenido alto de ésta afectaría el rendimiento en el proceso hidrólisis (8, 9) (

Figura 1 y Figura 2).

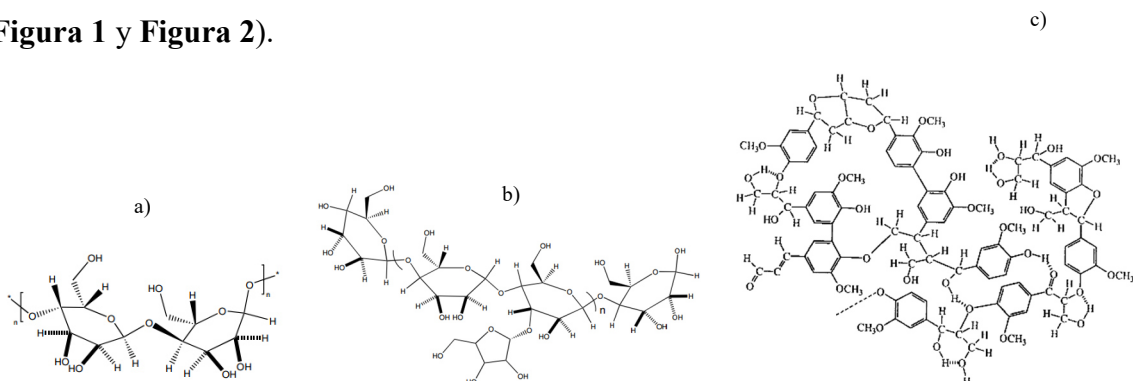


Figura 1. Estructura química de a) celulosa, b) hemicelulosa y c) lignina

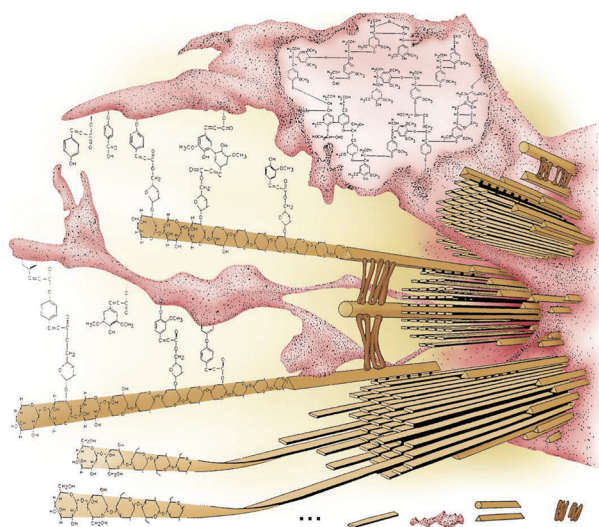


Figura 2. Principales componentes de un material lignocelulósico (10): Lignina (rosa), celulosa (café claro) y hemicelulosa (café)

Se han estudiado ya diversos materiales para la obtención de bioetanol además de la caña de azúcar y el maíz. Por mencionar algunos, se tiene al arroz (11), trigo (12), tubérculos (13), melaza de soya (14), tallo de planta de algodón (15), bagazo de la caña de azúcar (16),

madera (17), flor de Mahula (18), cáscara de mandarina (19), uvas, betabel (20), piña (21), café, manzana (22), plátano (23), algas (24), hongos (25) y papel (26). En cada estudio se reportan los rendimientos de azúcares y etanol según el proceso aplicado al material lignocelulósico.

Tabla 3 Resultados de la obtención de bioetanol a partir de diferentes biomásas

Biomasa	Rendimiento o azúcares	Rendimiento de bioetanol	Conversión de azúcares	Organismo	Condiciones	Ref.
Melaza de soya	62 %. 1:4 melaza de soya:medio de hidrólisis	54 % ó 155.2 g bioetanol/L hidrolizado		<i>S. Cerevisiae</i>	Hidrólisis: ac. nítrico, pH 4, 0.1519 MPa, 20 min Fermentación: 35 °C, pH 4.5, 14 h, 230 rpm	(14)
Residuos de café		11.7 g/L		<i>S. Cerevisiae</i>	pret. ac. sulfúrico 163 °C	(27)
Maíz dañado por insectos	36.38 %	470.7 L/1000 kg	86.10 %	<i>S. Cerevisiae, Bacillus, Aspergillus</i>	SSF	(28)
Pulpa de madera, papel usado		71.8%, 51.1%		hongo <i>Phlebia</i> MG-60	Fermentación: pH 6, 28 °C	(29)
Desechos de cocina		506.97 L/1000 kg		<i>S. Cerevisiae</i>	Hidrólisis enzimática α -amilasa. Fermentación: pH 4.5, 30 °C, 150 rpm,	(30)
Pulpa de plátano	56 %	98.86 L/ 1000kg	90 %	<i>S. Cerevisiae</i>	Hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática. Fermentación: pH	(31)

					4.1, 28 °C	
Corteza de álamo	83.10 %				Ac. sulfúrico, radiación gama, hidrólisis enzimática	(32)
Pulpa de betabel		583.02 L/1000 kg	97.52 %	<i>S. Cerevisiae</i>	Cepa inmovilizada	(33)
Pulpa de manzana del anacardo	2.2 g/100 mL hidrolizado	46 %		<i>S. Cerevisiae</i>	Hidrolisis ácida	(22)

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y Alimentación FAO, 2007, México se encuentra dentro de los 10 principales países productores de naranja ocupando el cuarto lugar con una producción de 4.16 millones de toneladas al año, precedido por Estados Unidos, Brasil, y China (34, 35).

El principal aprovechamiento de la naranja, es mediante la conversión de esta a jugo; se tienen datos de que aproximadamente 9.5 millones de toneladas métricas de naranjas fueron procesadas para la obtención de jugos entre los años 2000 y 2005; de las cuales aproximadamente el 50 – 60% de ese procesamiento se convierte en residuos, que consisten en cáscaras, semillas y membranas (36). Una parte de estos residuos, son secados, y usados como alimento de ganado, y una gran parte de estos son desechados (34) o quemados para producción de energía eléctrica. Por lo tanto, estos se vuelven una materia prima interesante para la producción de bioetanol, además, la naranja tiene alto contenido de azúcares como se muestra en la siguiente **Tabla 4**, en la que además se compara con algunos otros residuos.

Tabla 4 Composición de la naranja en comparación con algunos otros residuos (19).

	Cenizas	Azúcares	Grasas	Proteínas	Pectinas	Lignina	Celulosa	Hemicelulosa
Cáscara de mandarina	5	10.1	1.6	7.5	16	8.6	22.5	6
Cáscara de naranja	2.6	9.6	4	9.1	23	7.5	37.1	11
Cáscara de uva	8.1	8.1	0.5	12.5	8.5	11.6	26.57	5.6
Tallo de maíz	4-8	nd	nd	4-9	0	16-23	31-41	20-34

Paja de trigo	1-10	nd	nd	2-6	0	5-19	32-49	23-39
Composición seca % materia seca. Nd: no dato								

1.1. Proceso de obtención

1.1.1. Pretratamiento

Son diferentes pasos a seguir para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. El primero y crucial es el **pretratamiento** del material. Incluye métodos mecánicos, químicos, térmicos, biológicos o su combinación. Su efectividad depende del tamaño al que se reduzca el material y de la modificación estructural de las fracciones de hemicelulosa y celulosa. Se debe considerar la producción de inhibidores, la energía aplicada y la posibilidad de recuperación de coproductos como la lignina que puede ser utilizada como combustible y otros como aceites esenciales o aromas (37). En la siguiente tabla se presenta la comparación de algunos pretratamientos.

Tecnologías de pretratamiento más prometedoras									
Método	Rendimiento de azúcares	Formación de inhibidores	Generación de otros productos	Reuso de reactivos	Aplicable a diferentes materias primas	Costo de equipo	Éxito a escala piloto	Ventajas	Desventajas y Limitaciones
Mecánico	Bajo	-	No	no	Si	Alto	si	Reduce cristalinidad de la celulosa	Alto consumo de energía
Ácidos minerales	Alto	Alto	Alto	si	Si	Alto	si	Hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, altera la estructura de la lignina	Tóxico, dañino y corrosivo
Álcali	Alto	Bajo	Alto	si	Si	-	si	Remueve lignina y	Largo tiempo de residencia,

								hemicelulo sa, incrementa la superficie de área	sales formadas irrecuperables
Agua caliente	Alto	Alto	Bajo	no	-	-	si	Remueve hemicelulo sa, haciendo a las enzimas accesibles a la hemicelulo sa	Largo tiempo de residencia, menos remoción de lignina
Organosolv	Alto	Alto	Alto	si	Si	alto	si	Hidroliza lignina y hemicelulo sa	Los solventes necesitan ser drenados, evaporados, condensados y reutilizados
Oxidación húmeda	alto o bajo	-	Baja	no	-	alto	-	Remueve lignina, disuelve hemicelulo sa y causa descristaliz ación de la celulosa	-
Ozonólisis	Alto	Bajo	Alto	no	-	alto	no	Reduce el contenido de lignina, no hay residuos tóxicos	Gran cantidad de ozono requerida

Explosión CO₂	Alto	Bajo	Bajo	no	-	alto	-	Remueve hemicelulosa, descristalización de celulosa, costo-efectivo	No modifica a la lignina
Explosión con vapor	Alto	Alto	Bajo	-	Si	alto	si	Remueve hemicelulosa y altera la estructura de la lignina	Dstrucción incompleta de lignina
AFXE	Alto	Bajo	-	si	-	alto	-	Remueve lignina y hemicelulosa	No es eficiente para biomasas con algo contenido de lignina
líquidos iónicos	alto o bajo	Bajo	-	si	Si	-	-	Disuelve la celulosa, Vuelve a la celulosa más dócil	Todavía en estudio

La oxidación húmeda resulta ser muy eficaz. Tiene altos rendimientos de azúcar, no hay producción de inhibidores, remueve lignina, disuelve hemicelulosa y causa descristalización de la celulosa. La explosión con vapor también tiene altos rendimientos, es aplicable a diversas materias primas y remueve hemicelulosa alterando la lignina. (5). En un estudio, en 2011, se compararon costos de 5 pretratamientos y se concluyó que la explosión con vapor tiene menor costo que el tratamiento con agua caliente, hidrólisis con ácido diluido, explosión con fibra de amoníaco y que el tratamiento con hidróxido de calcio (38).

En los últimos años se han utilizado otros métodos como irradiación con microondas o radiación gamma para mejorar los rendimientos (32), o la combinación de diversos métodos (39). Sin embargo es importante considerar que el rendimiento depende de la materia prima (40). Para el caso específico de la naranja, los procesos que se han utilizado para mejorar los rendimientos van desde pretratamientos de filtración u homogeneización (41) hasta inyección de vapor (42), tratamientos con hidróxido de sodio y agentes quelantes (42, 43) ó ácidos (37).

1.1.2. Hidrólisis

El siguiente paso en el proceso de obtención de bioetanol es la **hidrólisis**. En el que los carbohidratos complejos se convierten a monómeros simples mediante el mecanismo general de la **Figura 3**.

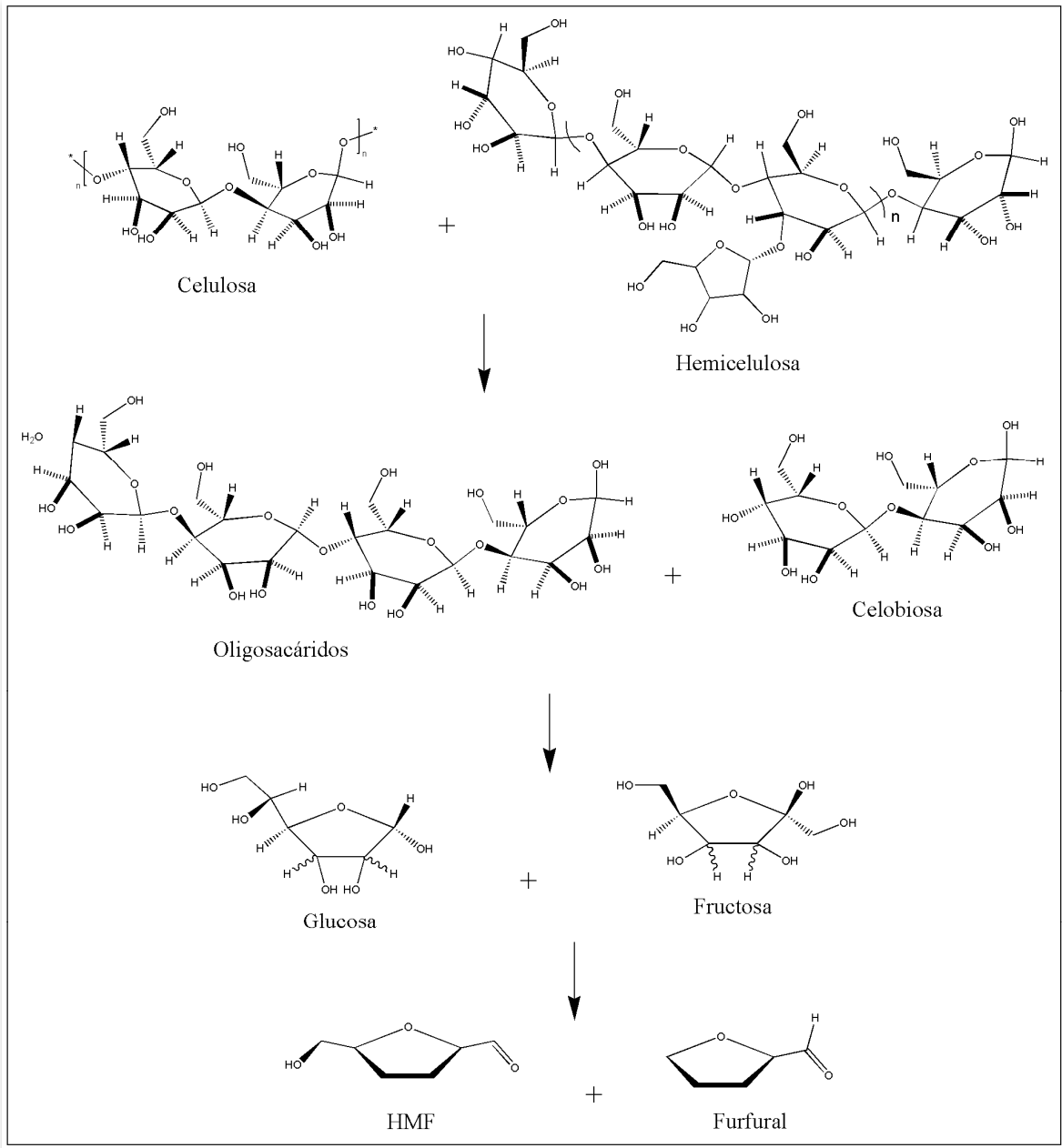


Figura 3. Reacción general de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa

Se han analizado diversas variables para mejorar la hidrólisis ácida, básica y enzimática de residuos lignocelulósicos. Cada una con sus ventajas y desventajas.

Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida ha resultado ser la que produce rendimientos más altos de azúcares, sin embargo, se trabaja con ácido sulfúrico concentrado o diluido por lo que para disminuir la

toxicidad y corrosión de la hidrólisis, se ha propuesto por ejemplo utilizar un ácido débil como el ácido láctico (44, 45).

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática requiere menos energía, es menos tóxica y provoca menos corrosión, además de que no se forman productos de inhibición. Sin embargo, las enzimas son sustrato – específicas por lo que la desventaja es que son muy caras. Constituye el 40% del costo del proceso. Hay diversos organismos que producen las enzimas que ayudan en este paso, como *Trichoderma*, *Aspergillus* y otros, que pueden ayudar a mejorar el proceso. Para disminuir el costo del proceso es posible aplicar una Sacarificación y Fermentación Simultánea, SSF por sus siglas en inglés, que consiste en hacer una hidrólisis enzimática y fermentación al mismo tiempo logrando mantener temperaturas favorables tanto para la enzima (por ejemplo, celulasa) y la levadura (46-48).

También se ha comprobado que la hidrólisis enzimática se ve favorecida con la adición de nanopartículas de TiO_2 (49).

Catálisis heterogénea

No se ha publicado lo relacionado a hidrólisis de cáscara de naranja con catalizadores sólidos, sin embargo, sí para otros materiales o para el caso específico de la celulosa, que es parte del material lignocelulósico pero que es muy resistente a la hidrólisis debido a su estructura cristalina.

Con el fin de mejorar el proceso la catálisis heterogénea actúa de la siguiente manera: un catalizador sólido actúa sobre la materia prima en fase líquida, aproximándose a su campo de fuerzas superficiales y afectando en ella su velocidad (actividad) y dirección (selectividad) de transformación en los diferentes productos viables termodinámicamente, en este caso en azúcares reductores. El catalizador modifica la velocidad de una reacción que avanza hacia el equilibrio, sin ser consumido en el proceso (50). En una reacción que involucra procesos cíclicos, el catalizador tiene un sitio activo donde se forma un complejo entre reactantes y productos intermedios. Posteriormente, a partir de éste complejo se desprenden los productos, se restaura el sitio activo original y continúa el ciclo.

El catalizador no puede cambiar la conversión al equilibrio, determinada por la termodinámica química, pero sí cambia la velocidad de una determinada reacción o se presenta la inhibición de reacciones no deseadas.

Existen diversos catalizadores sólidos que se pueden aplicar para favorecer la hidrólisis debido a su carácter ácido o básico. Por ejemplo están las zeolitas, arcillas, alúmina o dióxido de silicio (51).

Los catalizadores metálicos (como óxido de silicio o de aluminio), son principalmente metales que pueden formar óxidos, por ejemplo, la alúmina es un óxido de aluminio, barato, estable y con alta área superficial. Otro caso son los aluminosilicatos, entre los que se encuentran las zeolitas y las arcillas. Tienen un carácter ácido, deseable en la hidrólisis de azúcares, están contruidos por tetraedros de SiO_4^{4-} , con un oxígeno compartido por dos tetraedros. La sustitución del Al por el Si da el ión AlO_4^{5-} , y por tanto, por cada átomo de Al introducido habrá un exceso de carga negativa que necesita ser balanceada, si esto es hecho por un protón, el material es fuertemente ácido (52).

La aplicación de la hidrólisis catalizada heterogéneamente ha dado como resultado por ejemplo un trabajo de hidrólisis de algas utilizando como catalizador una resina (53). Hidrólisis de celulosa con zeolitas (54, 55), resinas (56), catalizadores de carbono ácidos utilizando ácido sulfúrico a 50 °C a 120 °C (57, 58) o fosfórico a 170 °C (59), alúmina (60) arcillas ácidas a 200 °C (51) y la monomorilonita pilareada con hierro, cromo o aluminio en la deshidratación parcial de la glucosa a ácidos orgánicos, presentando la de hierro un 100% de conversión a ácido fórmico en 12 h a 150 °C, debido a que presentó un mayor tamaño de poro (61).

El término arcilla se usa para definir un tamaño de partícula menor a 2 μm . Identifica a un material heterogéneo compuesto de minerales, incluyendo fragmentos de roca, óxidos hidratados, geles y sustancias orgánicas. Tienen una composición variable, incluyendo Si, Al, Fe, elementos alcalinos y alcalino terrosos (62).

Al modificar su estructura intercambiando los iones presentes en ella, es posible preparar una arcilla pilareada con diferentes propiedades, por ejemplo con mayor acidez.

En este trabajo se plantea la catálisis heterogénea de la hidrólisis del proceso, con una arcilla pilareada con Cu y con alúmina.

Hidrólisis térmica o autohidrólisis

Se le llama hidrólisis térmica o autohidrólisis a aquella que se lleva a cabo sólo con calentamiento del residuo en presencia de agua o no.

Las temperaturas de descomposición de la celulosa, hemicelulosa y lignina se encuentran en la **Tabla 6**. Debido a estos valores, al tratar el material lignocelulósico con calentamiento entre 120 °C y 300 °C, se produce un rompimiento o degradación de los polímeros obteniendo azúcares más simples. El mecanismo de hidrólisis ocurre gracias a que, a altas temperaturas, el agua tiene cierto carácter ácido y los iones hidronio se involucran para el rompimiento de los enlaces glucosídicos del polímero (63, 64).

Tabla 6. Temperaturas de degradación de los principales componentes del material lignocelulósico	
Componente	T de degradación (°C)
Hemicelulosa	125-250 °C
Celulosa	260-380 °C
Lignina	150-550 °C

Dependiendo de la intensidad del tratamiento y el tiempo de reacción, se provocará una hidrólisis hasta el punto producción de monosacáridos o más allá, hasta el rompimiento de monosacáridos para producir ácidos carboxílicos, glicerol, aldehídos o alcoholes (65, 66).

Por ejemplo se ha utilizado con paja a temperaturas mayores de 195 °C (67), pulpa de bagazo y piel de caña de azúcar a 12 MPa, 14 MPa y 16 MPa a 60 °C (68), semillas de aceitunas a 200 °C a 236 °C por 2 min a 4 min (69) ó de 150 °C a 225 °C por 0 min a 10 min (70), residuos agrícolas a 179 °C por 23 min (71), bagazo de caña de azúcar a 190 °C por 10 min (72), paja de maíz y pasto a 150 °C por 60 min y 24.13 MPa (64) ó la paja del maíz a 210 °C (73), trigo a 180 °C, 0 MPa, 2 MPa, 3.5 MPa y 5 MPa de 0 a 45 min (74), pasto *Miscanthus giganteus* a 200 °C (75), cáscara de limón y mandarina durante 5 min a 160 °C y 0.6 MPa (19, 76), directamente la celulosa (6, 77, 78), entre otros.

1.1.3. Fermentación

En este paso, los azúcares producidos en la hidrólisis son convertidos a alcohol mediante el uso de un microorganismo, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* a través de la reacción de fermentación anaerobia de la **Figura 4**.

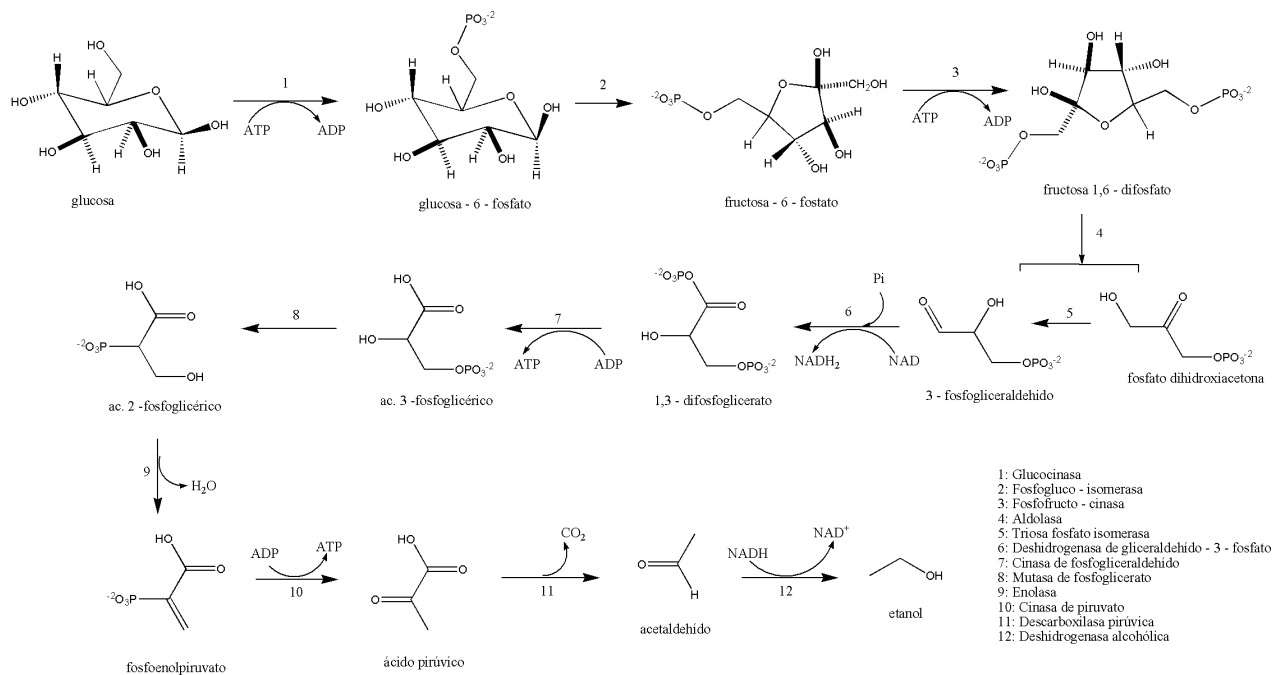


Figura 4. Reacción de fermentación alcohólica

El proceso es posible gracias a una serie de enzimas que provee el microorganismo. La levadura *S. cerevisiae* tiene muy buenos rendimientos para fermentar hexosas pero no puede utilizar azúcares pentosas del hidrolizado, de ahí que se hagan cocultivos. Por ejemplo en el 2008, se trabajó con un cocultivo de *Pichia stipitis* con *S. cerevisiae* y otro con *E. Coli*, para poder fermentar tanto pentosas como hexosas obteniendo buenos resultados (79).

Otras propuestas de microorganismos, son para el caso de glucosa a etanol, bacterias como la *Zymomonas mobilis*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobium brockii*, *Sarcina Ventriculi*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* y *Rominococcus albus*; hongos como *Aspergillus* spp; *Fusarium* spp. o *Penicillium* spp. y levaduras como *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida Iusitanieae* y *Kluyveromyces marxianus* y para el caso de xilosa a etanol bacterias como *Bacillus macerans*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Aerobacter aerogenes*,

Aeromonas hydrophila, *Bacillus polymixa*, *Aerobacter indologenes*; hongos como *Fusarium oxysporum*, *Monilia* spp; *Mucos* spp; *Neurospora* spp; *Pacilomyces* spp; *Polyporus* spp; *Rhizopus* spp. y levaduras como *Brettanomyces* spp; *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* y *Pichia stipitis* (80).

Convencionalmente el proceso de fermentación más utilizado es el llamado SHF (hidrólisis y fermentación separadas) donde es necesario tener 2 reactores, se producen inhibidores que bajan el rendimiento y aumenta el tiempo del proceso, sin embargo, como se mencionó en la sección de

Hidrólisis enzimática, también está la sacarificación y fermentación simultanea (SSF) que es superior en rendimiento y utilidad. Aparte, existe el bioproceso consolidado (CBP) con una fermentación e hidrólisis simultáneas y cofermentación. La producción de enzima, la hidrólisis y fermentación son todas juntas llevadas a cabo en un reactor. Se utilizan uno o varios cultivos de microorganismos y además no requiere inversión para obtener la enzima. Se utilizan para esto bacterias como *Clostridium Thermocellum* u hongos como *Neurospora Crassa*, *Fusarium Oxysporum* y *Paecilomyces*. Un aspecto importante a considerar, es que los microorganismos necesitan ser compatibles en condiciones de operación como pH y temperatura. La desventaja de este proceso consolidado es que se aplican periodos largos de fermentación (de 3 a 12 días) (81).

Son muchos los factores involucrados para tener un proceso con bajo costo y alto rendimiento. Uno de ellos es el pH, para el que se ha establecido que alrededor de 5 es el más favorable para obtener rendimientos altos de etanol. pHs arriba de 6.5 producen acetato. Otra variable es la Temperatura, hay microorganismos mesófilos ($T_{\text{óptima}} < 45$ °C) o termófilos ($T_{\text{óptima}} > 45$ °C). La *S. Cerevisiae* da rendimientos altos de etanol a una T de 30 °C. Variables físicas como agitación, sonicar durante el proceso de fermentación que en un caso mejoró hasta 10 veces el rendimiento (82), ultrasonido (83), y los nutrientes agregados a la solución a fermentar, por ejemplo el utilizar restos de comida como nutrientes durante la SFF para disminuir costos (30).

Otro factor, es la inmovilización del microorganismo. Por ejemplo, se ha investigado el utilizar al microorganismo inmovilizado en un reactor o en una membrana (33, 84) O utilizar levadura en forma de flóculos (85).

Son varias las ventajas de inmovilizar al microorganismo: incrementa el rendimiento, las células son más activas y estables debido a que están protegidas por el material de soporte y entonces hay una mayor tolerancia a inhibidores, se produce una mayor concentración celular, la separación del microorganismo de la solución fermentada es más fácil, el riesgo de contaminación es menor, es posible reutilizar el microorganismo, son menores los tiempos de fermentación e incrementan los tiempos de conservación (86, 87).

Son 4 las técnicas de inmovilización: (a) adsorción en la superficie de un portador o material sólido (por ej. celulosa) donde el biocatalizador o microorganismo se une a un soporte insoluble en agua mediante enlaces iónicos o covalentes, acoplamiento bioespecífico o uniones debidas al fenómeno de adsorción, (b) atrapamiento en una matriz porosa (por ej. alginato) en donde las células penetran en la matriz hasta que su movilidad es obstruida por otras células, o el material se forma *in situ* con el medio de cultivo. Las células están en un medio rígido para prevenir su difusión a los alrededores pero también hay una transferencia de nutrientes y metabolitos, (c) floculación de forma natural ó con agentes ligantes (cross linking) inducida artificialmente, en donde la floculación está definida como la agregación de células para formar una unidad larga que sedimenta o precipita rápidamente y (d) contención celular detrás de una barrera por ejemplo una membrana microporosa o en una microcápsula (88).

Usualmente los materiales para inmovilizar el microorganismo (88, 89) son varios tipos de geles como alginatos (87, 90), pectinatos, carragenina, poliacrilamida, agar (91), gluten (92), materiales con alta área superficial como kissiris o materiales de origen industrial como espuma de poliuretano, fibras de acero inoxidable, membranas y materiales naturales como cáscaras de fruta como manzana (93), naranja (94), bagazo de caña de azúcar (95) ó betabel (33), madera, celulosa, algodón, vidrio poroso y alúmina (96).

Para el caso del presente trabajo se eligió utilizar levadura *S. cerevisiae* inmovilizada en esferas de alginato debido a que es un material barato, no es tóxico y el procedimiento de inmovilización es sencillo.

1.1.4. A partir de naranja

Particularmente para la producción de bioetanol a partir de naranja, se ha trabajado con hidrólisis ácida a 121 °C, 30 ó 15 min (45, 97), explosión de vapor con ó sin ácido a 160 °C

y 4 min (37) o autohidrólisis a 180°C y 2.5 min, seguida de hidrólisis enzimática (42). A partir de jugo de naranja y piña empleando como pretratamiento ozonólisis (98) y en otro caso aplicando la combinación de un pretratamiento ácido y con ozono (99). La fermentación con *S. cerevisiae* en polvo.

1.2. Técnicas analíticas

Ahora bien, algo que no se debe perder de vista y que también contribuye al costo del proceso, son las técnicas analíticas aplicadas.

Por ejemplo para la cuantificación de azúcares, se ha utilizado el método de Miller, con ácido 3,5-dinitrosalicílico por espectrofotometría Uv-Vis (100). El análisis de xilosa con el método de la *p*-bromoanilina (26). Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y de intercambio aniónico (HPAEC) con un detector amperométrico (25, 28, 101, 102) o con un detector de índice de refracción para cuantificación e identificación de azúcares como glucosa, xilosa, fructosa, manosa y arabinosa (76).

Para la determinación de etanol, se ha utilizado el método picnométrico (33), método del ácido crómico (26), determinación con dicromato de potasio, midiendo la gravedad específica y por HPLC utilizando un detector de índice de refracción (29, 103) o cromatografía de gases con detector de ionización de flama (84, 104). Además de la detección de subproductos como acetato de etilo, acetato de propilo, amil alcoholes, propanol y alcohol isopropílico también por cromatografía.

CAPÍTULO 2

2.1 HIPÓTESIS

La modificación de procesos de hidrólisis y fermentación para residuos de cáscara de naranja incrementará la producción de azúcares fermentables y por lo tanto el rendimiento de bioetanol en 80%.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

Modificar los procesos de hidrólisis y fermentación para la producción de azúcares reductores y bioetanol a partir de residuos de cáscara de naranja

2.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la eficiencia de la producción de azúcares reductores a partir de residuos de cáscara de naranja aplicando hidrólisis ácida, hidrólisis catalizada con alúmina, arcillas y térmica.
- Analizar el efecto de la carga de catalizador en el rendimiento de azúcares reductores
- Analizar el efecto de la temperatura, agitación, carga de biomasa, presión, tiempo y tipo de gas en la hidrólisis térmica.
- Determinar azúcares reductores por espectrofotometría UV-Vis utilizando el método de DNS y por HPLC
- Estudiar el efecto del tipo de esfera, tiempo de fermentación, concentración de glucosa, agitación, carga de esfera, tiempo de incubación y adición de nutrientes durante la fermentación de soluciones de glucosa e hidrolizados de cáscara de naranja utilizando *S. cerevisiae* en forma de polvo y de esfera
- Determinar rendimiento de etanol, haciendo uso de CG e índice de refracción para su cuantificación.
- Detectar posibles subproductos utilizando CG.

CAPITULO 3

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Cáscara de naranja lavada y seca. Variedad *Valencia* recolectada en abril 2013 en Toluca, México.

Reactivos: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{NH}_4(2)\text{SO}_4$, MgSO_4 , ZnSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , FeSO_4 , CaCl_2 , alginato de sodio, ácido 3,5-dinitrosalicílico, H_2SO_4 , HCl , NaCH_3CHO , Fenol, NaOH , tartrato de sodio, CuNO_3 , HNO_3 y alúmina en grado reactivo. Glucosa, fructosa, sacarosa, xilosa, furfural, hidroximetilfurfural, etanol, metanol, butanol y alcohol isopropílico en grado cromatográfico y nitrógeno de alta pureza, agua desionizada y destilada, levadura de pan (marca Tradipan) y arcilla montmorilonita pilareada con Al

Para los experimentos de hidrólisis con Temperatura y Presión controlada, se utilizó un reactor de presión y agitación Parr 4843

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. *Análisis estadístico*

En todos los casos, los procedimientos se hicieron por triplicado, se determinaron valores estadísticos de sesgo y en pruebas estadísticas se utilizó un nivel de confianza del 95%

3.2.2. *Recolección de biomasa*

La cáscara de naranja se recolectó en el mes de marzo 2013 en una juguería local de Toluca cuyo proveedor es la Central de Abastos de Toluca.

Se enjuagó, se puso a secar en estufa a 60 °C por 4 h y posteriormente se molió a 60 mesh.

3.2.3. *Análisis proximal*

El contenido de cenizas y humedad se midió usando los métodos de la AOAC (105). De acuerdo a estos, 10 g de cascara de naranja se secaron a 105 °C por 24 h. Se transfirieron a una mufla a 575 °C por 24 h y posteriormente se analizó fibra detergente total (NDF), fibra

ácida detergente (ADF) y lignina ácida detergente (ADL) utilizando el analizador 200 ANKOM.

El contenido de hemicelulosa se calculó de la diferencia de NDF menos ADF. La cantidad de proteína se determinó estimando el contenido total de nitrógeno aplicando el método Kjeldahl y multiplicando por el factor de conversión 6.25.

3.2.4. Cuantificación de azúcares reductores

3.2.4.1. Método de DNS

El método de DNS (ácido 3,5 - dinitrosalicílico) (106) consiste en preparar una solución de tartrato de sodio y potasio, hidróxido de sodio y ácido 3,5 - dinitrosalicílico (para 50 mL: 15, 0.8 y 0.5 g, respectivamente) que se mezcla con la solución de la muestra 1:1 (0.5 mL con 0.5 mL) en un tubo de ensayo, se calienta a ebullición por 30 min en baño maría (si la muestra tiene azúcares reductores, la solución cambiará de amarillo a rojo), se deja enfriar a temperatura ambiente, se agregan 4 partes iguales de agua (4 mL para este caso) desionizada y posteriormente se lee a 570 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Hach DR5000.

Previamente se elaboró una curva de calibración de 0 a 1000 ppm de glucosa.

3.2.4.2. Cromatografía

El contenido de glucosa, fructosa y xilosa se determinó mediante un sistema de HPLS equipado con una columna Meta Carb 87C 50x (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). El eluyente utilizado fue agua Milli-Q a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min y 65 °C. Se monitoreo con un detector de índice de refracción (Prostar 350, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA).

La presencia de 5 – hidroximetil furfural (HMF) se cuantificó mediante HPLC con una columna xD8-C18. El eluyente usado fue K₂HPO₄ 50 mM en metanol, con una velocidad de flujo de 1 mL/min a 60 °C y monitoreado con un detector UV.

El etanol se cuantificó utilizando un sistema de cromatografía de gases (CP3800, VARIAN, Mexico) equipado con una columna tipo wax (30 m x 0.25 mm, i.d. 0.5 µm). Las condiciones del horno fueron: Temperatura 50 °C por 3 min; gradiente de 50 °C a 180 °C a

15 °C/min; split ratio de 50 mL/min; las temperaturas del inyector y detector FID de 180 °C y 250 °C, respectivamente. El gas acarreador, Helio, a un flujo de 1 mL/min.

3.2.5 Métodos de hidrólisis.

3.2.5.1 Hidrólisis ácida

La hidrólisis de los residuos lignocelulósicos de la naranja se llevó a cabo en un reactor tipo batch de vidrio con agitación continua, a 80 °C y 0.75 % v/v de H₂SO₄ utilizando 10 mL de agua y 0.25 g de cáscara de naranja durante 60 min.

Aparte, se hizo la reacción en una autoclave a 121 °C, según la siguiente tabla:

Tabla 7 Variables estudiadas en la hidrólisis ácida		
Factores	Dominio experimental	Respuesta
Concentración de ácido	0.5 % a 0.75 % (v/v)	AZÚCARES REDUCTORES
Tiempo	15 min, 30 min, 45 min, 60 min	

Utilizando 10 mL de agua, en reactores de teflón, con 0.25 g de CN y aplicando una presión de 0.1 MPa a 121 °C y 30 min se estudió el efecto de la concentración del ácido en el rendimiento de AR.

El efecto del tiempo en el rendimiento de AR se analizó utilizando 100 mL de agua, 2.5 g de cáscara de naranja en la autoclave a la misma Presión y Temperatura mencionadas anteriormente y se hicieron reacciones de 15 min, 30 min, 45 min y 60 min.

Al final de las reacciones se cuantificaron los azúcares reductores producidos utilizando el método del DNS según la sección 3.2.4.1. Método de DNS utilizando 0.25 mL de muestra y diluyendo a 1 mL haciendo el ajuste al final con este factor y utilizando la curva de calibración.

3.2.5.2 Catalizada heterogéneamente

En este caso se emplearon como catalizadores heterogéneos, alúmina (Al₂O₃) sola, con Cu y otra con Ag, arcilla montmorillonita pilareada con Cu, con ácido sulfúrico y otra con Al. Para esto, a 10 mL de agua se le agregaron 0.25 g de cáscara de naranja en un reactor de teflón, se agregó catalizador en un 1.5, 3 o 10 % (peso de catalizador/peso de cáscara), se

agitó ligeramente y posteriormente se colocó en autoclave durante 30 o 60 min a 121 °C y 0.1 MPa.

Para el caso de la alúmina, alúmina con Ag y arcilla con Al, con Cu y con ácido sulfúrico se hizo una reacción en el reactor de presión a 120 °C, utilizando 10 veces más el volumen que en la autoclave.

Tabla 8 Variables estudiadas en la hidrólisis catalizada heterogéneamente.

Factores	Dominio experimental	Respuesta
Tiempo	30 min, 60 min	AZÚCARES REDUCTORES
Carga de catalizador	1.5 %, 3 % y 10 %	
Tipo de reactor	Autoclave, reactor de presión	

3.2.5.3. Hidrólisis térmica

3.2.5.3.1. Efecto de la temperatura en el rendimiento de AR

Se añadieron 2.5 g de CN y 100 mL de agua desionizada en el reactor de presión. Se ajustó ésta a 0.6 MPa utilizando N₂ y 350 rpm durante 60 min, se tomaron muestras después de 15 min, 30 min, 45 min y 60 min manteniendo la Temperatura en cada experimento a 110 °C, 120 °C, 130 °C, 140 °C, 160 °C y 180 °C.

3.2.5.3.2. Efecto de la presión en el rendimiento de AR

Para estudiar el efecto de la presión, se añadieron 2.5 g de CN y 100 mL de agua desionizada en el reactor de presión ajustando la velocidad de agitación a 350 rpm, 160 °C durante 30 min manteniendo la presión en cada experimento a 1 MPa, 0.8 MPa, 0.6 MPa y 0.5 MPa con N₂.

3.2.5.3.3. Efecto de la carga de cáscara de naranja en el rendimiento de AR

Se varió la carga de CN de 2.5 a 7.5 g en 100 mL de agua desionizada en el reactor de presión a 350 rpm, 160°C, 30 min y 0.6 MPa.

3.2.5.3.4. Efecto del tipo de gas en el rendimiento de AR

El tipo de gas se estudió cambiando N₂ por CO₂ para ajustar la presión a 0.6 y 1 MPa. Éste cambio de gas se propuso con el fin de disminuir el valor de pH de la solución debido a la presencia de ácido carbónico a altas presiones y temperaturas y por lo tanto facilitar la hidrólisis (107). Se utilizaron 2.5 g de CN, 100 mL de agua desionizada, 350 rpm, 160 °C y 30 min.

Para cada experimento se analizaron AR por el método de DNS, pH final de la reacción y peso del sólido remanente. Además, los hidrolizados obtenidos según el procedimiento de la sección 3.2.4.1

3.2.5.3.5. Efecto del tipo la temperatura en el rendimiento de AR

Se analizaron por HPLC para la cuantificación de glucosa, fructosa, xilosa, furfural e hidroximetilfurfural según la sección

3.2.4.2. Cromatografía También, para cada experimento se filtró, lavó y pesó el residuo sólido de la hidrólisis para luego ser analizado por IR-ATR en un equipo Bruker Tensor 27.

3.2.5.4. Análisis de polisacáridos. Reacción de Lugol

Este análisis fue cualitativo y se llevó a cabo mediante la reacción de una solución de yodo (lugol) y polisacáridos para formar un complejo de inclusión que tiene diversos colores según las ramificaciones existentes en la molécula del polisacárido y que van de azul a violeta. Esta solución de lugol no reacciona con los azúcares simples como glucosa o fructosa. Por lo tanto, para determinar la existencia de azúcares polisacáridos en los hidrolizados, 0.5 mL de esta solución se mezclaron con 0,05 mL de una solución de lugol.

3.2.6 Fermentación

3.2.6.1. Efecto de inmovilización de la levadura en el rendimiento de etanol

Para este estudio, se utilizaron 25 mL de una solución de glucosa al 5% p/v con 6.25 mg de (NH₄)₂SO₄, 0.03125 g de MgSO₄ y 6.25 mg de K₂HPO₄. Se ajustó el pH a 5 con soluciones de HCl y NaOH 0.1 M y luego se esterilizó en una autoclave.

Para la primera parte, es decir la fermentación con levadura en forma de polvo, se agregaron 0.015 g de levadura a la solución esterilizada de glucosa y se colocó el frasco

cerrado y con atmósfera de nitrógeno en una estufa a 30°C con agitación constante de 150 rpm durante 48 h.

Para la parte de la levadura inmovilizada se prepararon esferas de alginato con levadura de la siguiente manera:

Se prepararon 2.5 mL de una solución de glucosa preparada con 0.25 g de ésta, 0.005 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.001 g de MgSO_4 y 0.001 g de K_2HPO_4 . De igual manera que en la parte previa se ajustó el pH a 5 y se esterilizó. Posteriormente se le agregaron 0.015 g de levadura y esta solución se incorporó a otra de 7.5 mL de agua y 0.2 g de alginato de sodio. Se agitó hasta tener una mezcla homogénea para luego dejarla caer gota a gota con ayuda de una jeringa, a 5 mL de una solución de CaCl_2 0.1 M para formar las esferas. Se separaron por decantación.

Una vez preparadas las esferas, se agregaron a 25 mL de una solución de glucosa 5% p/v preparada como se describe al inicio de esta sección.

Se utilizaron frascos cerrados en atmósfera de nitrógeno, 30°C, agitación constante de 150 rpm y 48 h de fermentación.

Una vez finalizado el tiempo para ambos experimentos, se destiló el fermentado para determinar el rendimiento de etanol por índice de refracción.

3.2.6.2. Efecto de la concentración de glucosa en el tiempo de fermentación y % de disminución de glucosa

Con el fin de conocer la concentración necesaria de glucosa en los hidrolizados de naranja antes de iniciar la fermentación, se prepararon 25 mL de soluciones de glucosa al 2.5 %, 5 %, 7.5 % y 10 % (p/v) de concentración con 6.25 mg de K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0.3125 g de MgSO_4 en agua desionizada en frascos de vidrio. Posteriormente se ajustó el pH a 5 con soluciones de NaOH y HCl 1 M y se esterizaron en autoclave a 0.1 MPa y 121 °C durante 15 min. Se les agregaron esferas de alginato preparadas previamente según la sección previa y se metieron estos frascos en atmósfera de nitrógeno y cerrados, a fermentar a 30 °C durante 24 h, 48 h, 72 h o 144 h con agitación constante (150 rpm) hasta obtener un

máximo en el % de disminución de glucosa determinado al finalizar el tiempo de fermentación correspondiente midiendo la cantidad de glucosa presente en la solución mediante el método de DNS.

3.2.6.3. Efecto del tiempo de incubación de la levadura en el rendimiento de etanol

Es importante aclarar que el efecto de esta variable se estudió utilizando soluciones sintéticas de glucosa y no directamente los hidrolizados de CN.

Se prepararon esferas de alginato como en la sección 3.2.6.1. Efecto de inmovilización de la levadura en el rendimiento de etanol excepto que el tiempo de incubación de la solución de levadura previo a la formación de la esfera, se modificó de 0 h a 24 h. Se determinó el número de células viables utilizando un hemocitómetro Optik Labor, al final de este tiempo y se procedió a formar la esfera en soluciones de CaCl_2 . Se agregaron a 25 mL de una solución de glucosa al 5% p/v, en una atmósfera de nitrógeno y frasco cerrado para fermentar por 48 h a 30°C, agitación de 150 rpm. Finalmente se destiló y se determinó el rendimiento de etanol utilizando refractometría.

3.2.6.4. Efecto de la suma de nutrientes al hidrolizado

Con el objetivo de conocer si es necesario agregar nutrientes a los hidrolizados antes de fermentar, se hizo una prueba con hidrolizados provenientes del tratamiento en el reactor de presión a 140 °C. Se redujeron en volumen mediante calentamiento hasta 25 mL, se ajustó pH a 5 con soluciones de NaOH y HCl y posteriormente se filtraron para retirar sólidos suspendidos. Se obtuvieron 2 reactores. Sólo a uno se le agregaron 6.25 mg de K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0.3125 g de MgSO_4 . Se esterilizaron con autoclave durante 15 min a 0.1 MPa y 121 °C y posteriormente se les agregaron esferas de alginato preparadas previamente según la sección 3.2.6.1. Efecto de inmovilización de la levadura en el rendimiento de etanol Se metieron ambos reactores a fermentar a 30 °C durante 48 h con agitación constante y al finalizar éste tiempo se destilaron las soluciones para determinar el rendimiento de etanol. Se realizó la prueba por triplicado.

3.2.6.5. Efecto del tipo de hidrólisis en el rendimiento de etanol

Cada uno de los hidrolizados obtenidos en la sección 3.2.5.1 Hidrólisis ácida se redujeron en volumen mediante calentamiento hasta obtener una concentración del 5 % p/v de AR, se

ajustó pH a 5 con soluciones de NaOH 1 M y HCl 1 M y posteriormente se filtró con el fin de remover sólidos suspendidos. 25 mL de ésta solución se colocaron en frascos de vidrio y se esterilizaron en autoclave a 0.1 MPa y 121 °C durante 15 min.

Tabla 9 Tratamientos de hidrólisis			
Tratamiento			Condiciones
Hidrólisis	Térmica en reactor de presión 0.6 Mpa	1	T: 110 °C
		2	T: 120 °C
		3	T: 130 °C
		4	T: 140 °C
		5	T: 160 °C
		6	T: 180 °C
	En autoclave T: 121 °C, 0.1 MPa	7	Ácida
		8	Térmica

Por otra parte, se prepararon esferas de alginato con levadura de la misma manera que la sección 3.2.6.1. Efecto de inmovilización de la levadura en el rendimiento de etanol

Se procedió a agregar las esferas de alginato preparadas a la solución esterilizada del hidrolizado y se metió a fermentar en estufa utilizando frascos con atmósfera de nitrógeno, cerrados, a 30 °C, con agitación de 150 rpm durante 48 h.

Al término de éste tiempo, el fermentado se destiló para separar el etanol producido que finalmente se cuantificó haciendo uso de un refractómetro de Abbe.

3.2.6.6. Ciclos de fermentación

Con el fin de evaluar la posibilidad de reutilizar las esferas, se estudiaron los ciclos de fermentación. Para esto, los hidrolizados obtenidos en el autoclave a 121 °C, 0.1 MPa y 30 min, se redujeron en volumen mediante calentamiento hasta obtener una concentración del 5 % p/v de AR, se ajustó pH a 5 con soluciones de NaOH 1 M y HCl 1 M y posteriormente

se filtró con el fin de remover sólidos suspendidos. 25 mL de ésta solución se colocaron en frascos de vidrio y se esterilizaron en autoclave a 0.1 MPa y 121 °C durante 15 min.

Por otra parte, se prepararon esferas de alginato con levadura de la misma manera que la sección 3.2.6.1. Efecto de inmovilización de la levadura en el rendimiento de etanol

Se procedió a agregar las esferas de alginato preparadas a la solución esterilizada del hidrolizado y se metió a fermentar en estufa a 30 °C, con agitación constante por 48 h. Al término de éste tiempo, se filtraron las esferas, se lavaron con 3 mL de agua desionizada estéril dejándolos caer en el fermentado, y las esferas lavadas se agregaron a otro frasco que contenía 25 mL de hidrolizado. Por una parte se metió este frasco a fermentar bajo las mismas condiciones que el primero y por otro lado, el fermentado se puso a destilar para separar el etanol producido que finalmente se cuantificó haciendo uso de un refractómetro de Abbe. Se repitió este procedimiento para cada ciclo.

3.2.7 Determinación de etanol por índice de refracción y cromatografía

Los destilados se analizaron utilizando un refractómetro de Abbe haciendo uso de una curva de calibración de 0 % a 50 % (v/v etanol/agua).

El análisis por cromatografía se hizo en un CG con detector FID.

3.2.8 Determinación de subproductos por gases y gases masas.

Con el fin de identificar otros alcoholes como metanol, butanol o alcohol isopropílico, se realizó un análisis de los destilados de los fermentados de la sección 3.2.6.5. Efecto del tipo de hidrólisis en el rendimiento de etanol por CG utilizando el mismo método que la sección anterior.

3.3 UBICACIÓN E INFRAESTRUCTURA

El desarrollo experimental, análisis y caracterización para la síntesis del bioetanol se realizará en la infraestructura de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) y en el Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable (UNAM-UAEM), donde se cuenta con cromatógrafo de líquidos y gases, equipo de espectrofotometría UV-Vis, FTIR-ATR y microscopía electrónica de barrido.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 HIDRÓLISIS

4.1.1. Hidrólisis ácida

4.1.1.1. Efecto de la concentración de ácido en el rendimiento de AR

En el **Gráfico 1** se puede observar que al incrementar la concentración de ácido, hay un ligero incremento de AR, sin embargo al analizar estadísticamente los datos, se determinó que no hay diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%. En el proceso de hidrólisis, los compuestos lignocelulósicos se rompen para llegar a azúcares reductores, sin embargo, es probable que a cierto tiempo los azúcares reductores comiencen a hidrolizarse también porque lo que fue necesario analizar el efecto del tiempo de reacción también.

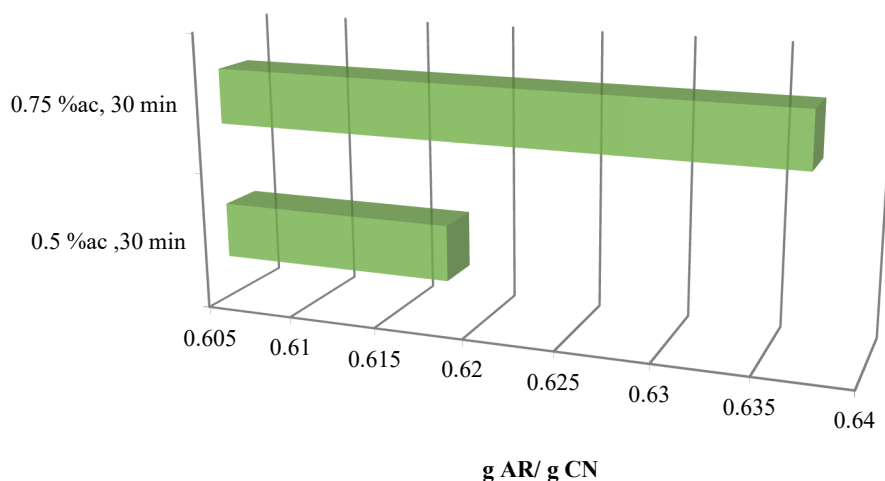


Gráfico 1 Efecto de la carga del ácido en el rendimiento de AR

Para el caso de la hidrólisis ácida en un matraz de vidrio a 80 °C, se obtuvo un rendimiento de 0.4503 g AR/g CN después de 60 min, mientras que a los 30 min en el autoclave se tiene un rendimiento de 0.62 g Ar/ g CN por lo que, debido a esta diferencia significativa (con un nivel de confianza del 95%), se optó por trabajar con el autoclave a 121 °C. En el matraz, aunque se aplicó agitación, la T no fue suficiente para tener altos rendimientos de hidrólisis.

4.1.1.2. Efecto del tiempo de reacción en el rendimiento de AR

En el **Gráfico 2** se observa que al incrementar el tiempo de reacción para una hidrólisis ácida con 0.75 % v/v de concentración de ácido, aumenta también el rendimiento de AR llegando a un punto máximo a los 30 min y posteriormente el rendimiento disminuye.

Comparando los valores de esta hidrólisis con la anterior, se tienen valores menores ya que se cambió de 10 mL a 100 mL el volumen total de reacción.

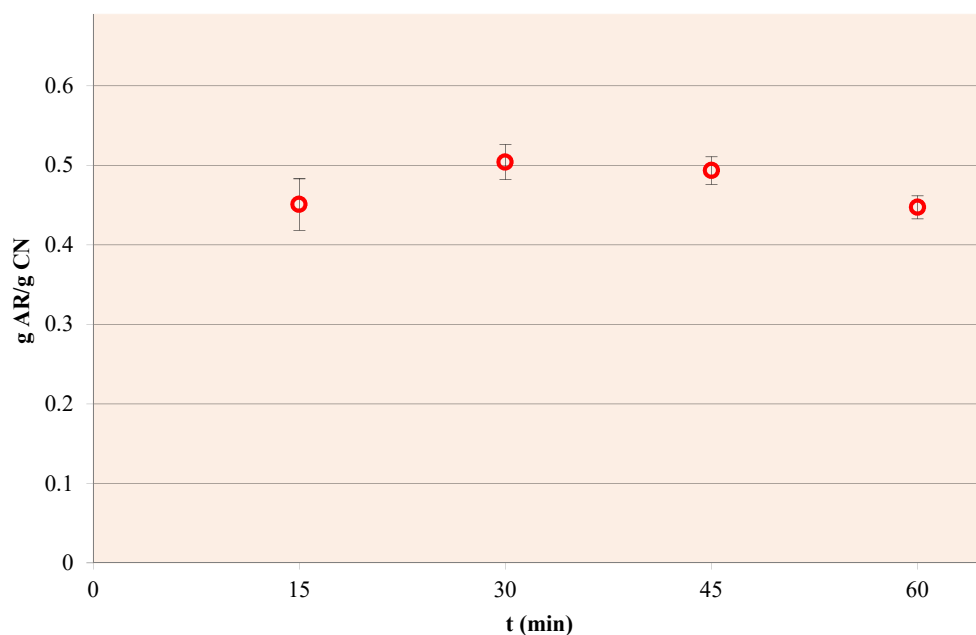


Gráfico 2 Efecto del tiempo de reacción durante la hidrólisis ácida en el rendimiento de AR

Significa entonces que hay un punto donde se empiezan a hidrolizar los azúcares entre 30 y 45 min de reacción para producir derivados de furano o ácidos carboxílicos que bajan aún más el pH de la solución y que también producen un color café más intenso como se puede ver en la **Figura 5**.

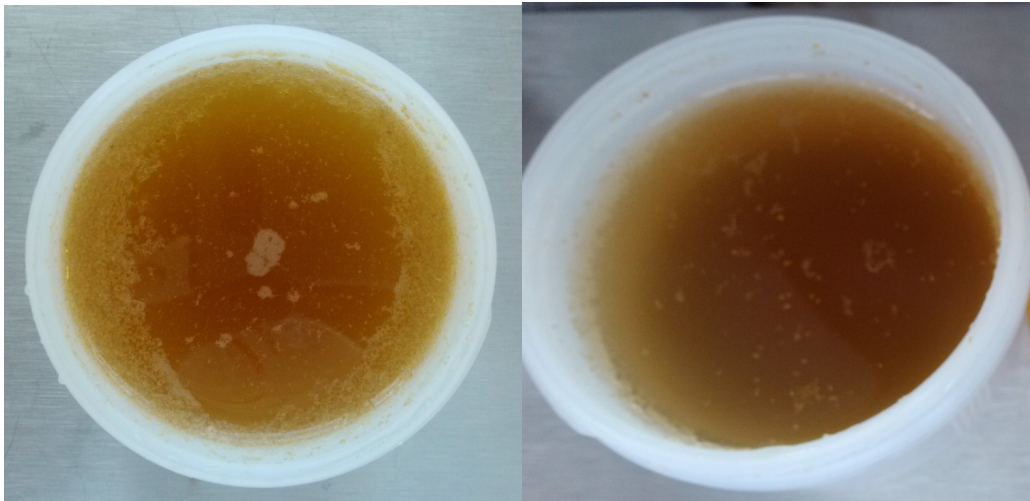


Figura 5 Hidrolizados de cáscara de naranja con ácido en autoclave durante 15 y 60 min.

4.1.2. Hidrólisis catalizada heterogéneamente.

Los resultados de este tipo de hidrólisis se presentan en el **Gráfico 3**. Se trabajó en la autoclave a 30 y 60 min utilizando 10 mL de agua como se describe en la sección 3.2.5.2 Catalizada heterogéneamente. Analizando los datos estadísticamente, resulta ser en general que el rendimiento incrementa hasta un 10 % al adicionar el catalizador comparado con el blanco. Por ejemplo, el blanco arroja un rendimiento de 0.33 g AR/ g CN, mientras que el catalizador un valor 0.38 g AR/ g CN, para el caso de la alúmina con Cu y 60 min. Sin embargo no se encontró diferencia significativa al cambiar de catalizador ni al prolongar el tiempo de reacción y sólo se observó diferencia significativa al variar la carga de catalizador, obteniendo mejores resultados para una carga menor, de 1.5 % p/p.

En otros estudios (57), se ha reportado la mejora del rendimiento en más de un 10%, sin embargo son catalizadores modificados previamente o se trabajó bajo condiciones altas de T y P. Por ejemplo, para la conversión de celulosa se utilizó montmorillonita ácida a 200 °C durante 4 h, logrando un 91% de conversión (51), o utilizando zeolitas a 190 °C (108), o para la conversión de celulosa a sorbitol y manitol, se logró un 31% de conversión utilizando γ -alúmina con Pt durante 24 h y a 50 bar (5 MPa) de presión (109). Sin embargo, uno de los planteamientos al inicio del proyecto fue mejorar el proceso de obtención de AR, reduciendo tiempo de tratamiento, costos y con un mayor rendimiento. Además de evitar consecuencias al final del proceso como por ejemplo producir residuos ácidos que son corrosivos o que necesitan un tratamiento adicional. Por lo tanto, aunque la hidrólisis ácida

produce los mayores rendimientos de AR, se tomó como valor de referencia solamente. Para el caso de la hidrólisis con catalizadores sólidos, aunque son baratos, no producen el efecto deseado, es muy poco el incremento de rendimiento, así que se siguió analizando la reacción de hidrólisis aplicando ahora autohidrólisis o hidrólisis con agua caliente.

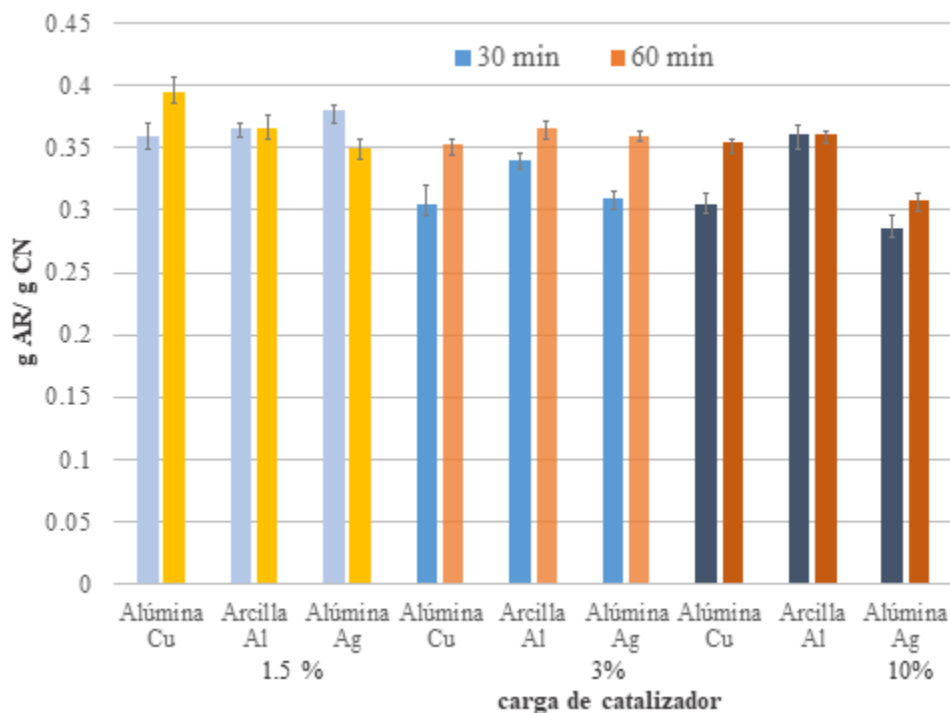


Gráfico 3. Efecto del tipo y carga de catalizador y tiempo de reacción en el rendimiento de AR

4.1.3. Hidrólisis térmica

4.1.3.1. Efecto de la T en el rendimiento de AR

Se observó, según los resultados del **Gráfico 4**, que al incrementar la T, el rendimiento de AR también se incrementa. Sin embargo, no hay diferencia significativa entre 160 °C y 180 °C. A estas dos T se obtiene un rendimiento comparable con la hidrólisis ácida. Desde un tiempo 0 se obtiene un rendimiento de 0.21 g AR/ g CN, esto debido a que la CN en sí contiene azúcares solubles.

Otro resultado que se debe resaltar, es que a una T de 160 °C y 180 °C, desde un tiempo de 30 min en adelante, los rendimientos de AR son similares. Se hizo un experimento adicional a 160 °C durante 7.5 min para conocer el efecto del tiempo de reacción, y resultó

que desde este tiempo se obtiene un rendimiento alrededor del 40% por lo que la variable de mayor efecto es la T.

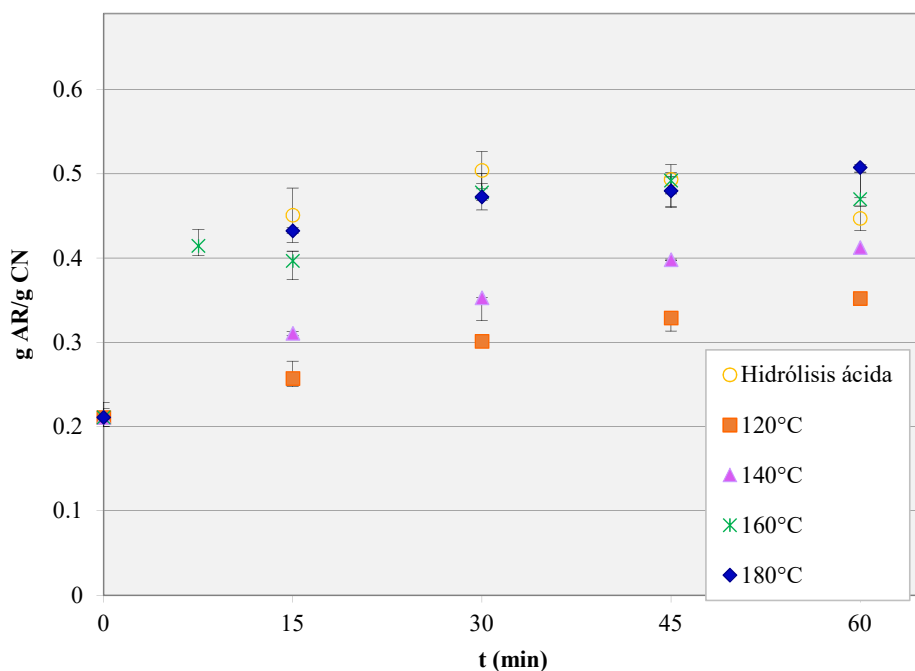


Gráfico 4 Efecto de la T en el rendimiento de AR durante la hidrólisis térmica

A temperaturas inferiores a 160 °C y tiempo menor a 30 min, se atribuye el rendimiento a la degradación de hemicelulosa, que procede dentro de un rango de 125 °C a 250 °C según análisis de termogravimetría (6). Esta etapa se acelera con temperaturas superiores a 160 °C. Es decir, se promueve no sólo la degradación de la hemicelulosa sino también de la celulosa. La hemicelulosa es soluble a 160 °C y la lignina a 180 °C (110). De 160 °C y arriba, se observa que hay un momento en el que la concentración de hemicelulosa es mínima y que la producción de RS puede ser principalmente debido a la degradación de la celulosa. La celulosa tiene una temperatura de degradación de 260 °C a 380 °C. Sin embargo, se ha divulgado que la hidrólisis de la celulosa puede ocurrir a temperaturas más bajas al agregar ácidos, catalizadores, presión o líquidos iónicos (111). En concordancia con lo anterior y con el diagrama de fases del agua (112), es probable que la hemicelulosa, la lignina y la celulosa amorfa se estén transformando según la reacción de la **Figura 3**. Para confirmar esta afirmación, se determinó la presencia de polisacáridos en el hidrolizado

mediante su reacción con lugol. Un color azul-púrpura indica la presencia de polisacáridos, mientras que un rojo caoba la presencia de oligosacáridos o azúcares simples.

En la **Figura 6** puede observarse que a 120 °C y 140 °C hay polisacáridos mientras que a una mayor T ya no.

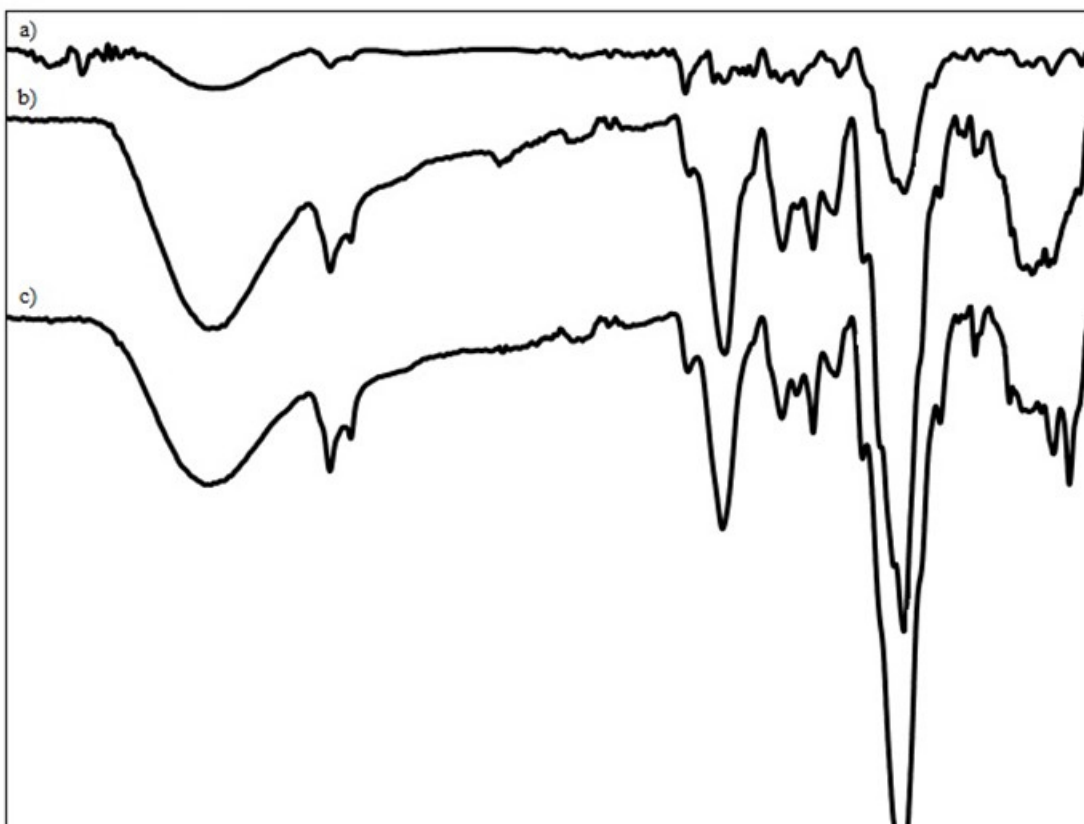


Figura 6 Reacción de hidrolizados con Lugol. P 1 MPa, 30 min, T de izq a der: 120 °C, 140 °C, 160 °C y 180 °C

Al final de la reacción, quedó un residuo sólido, para todos los casos. Mientras mayor fue la T, menor la cantidad de residuo, logrando hasta un 20 % de reducción de peso.

El análisis de IR-ATR de estos residuos se presenta en la

Figura 7. Estos demuestran que hay un cambio en la estructura del material con el aumento de T. A 120 °C y 140 °C, la intensidad de la banda a 1200-900 cm^{-1} debida a una estructura glicosídica, aumenta por la ruptura de la estructura del polímero en fracciones más pequeñas de oligosacáridos o unidades glicosídicas. Los enlaces C-O-C y C-H con bandas en 1105 cm^{-1} y 1026 cm^{-1} , respectivamente, se hacen más prominentes en comparación con la CN sin algún tratamiento. En contraste, el análisis de los sólidos obtenidos después de la hidrólisis a 160 °C y 180 °C, muestra que la intensidad de las bandas debido al enlace O-H en 3300 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1344 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , así como la banda debida al enlace C-O-C a 1050 cm^{-1} , disminuyen drásticamente indicando que las unidades glicosídicas fueron transferidas a la solución, aunque no del todo. Esas bandas en 1050 cm^{-1} , 2880 cm^{-1} y 2950 cm^{-1} que todavía están presentes, también se observan en el espectro de un estándar de celulosa, por lo que a estas condiciones de P y T, es probable que algo de celulosa, principalmente la de estructura amorfa, se haya degradado (59).



Número de onda cm^{-1}

Figura 7. Espectros IR-ATR de los sólidos obtenidos al final de la hidrólisis térmica: a) CN sin tratamiento, b) a 120 °C, c) a 140 °C, d) 160 °C, e) 180 °C, f) celulosa y g) lignina

En el **Gráfico 5** se presentan las concentraciones de azúcares en los hidrolizados. Se observan 3 series de puntos: fructosa, glucosa y xilosa, que son las concentraciones de los hidrolizados obtenidos en el reactor de presión y los puntos color café a 121 °C, son las correspondientes al hidrolizado obtenido en la autoclave.

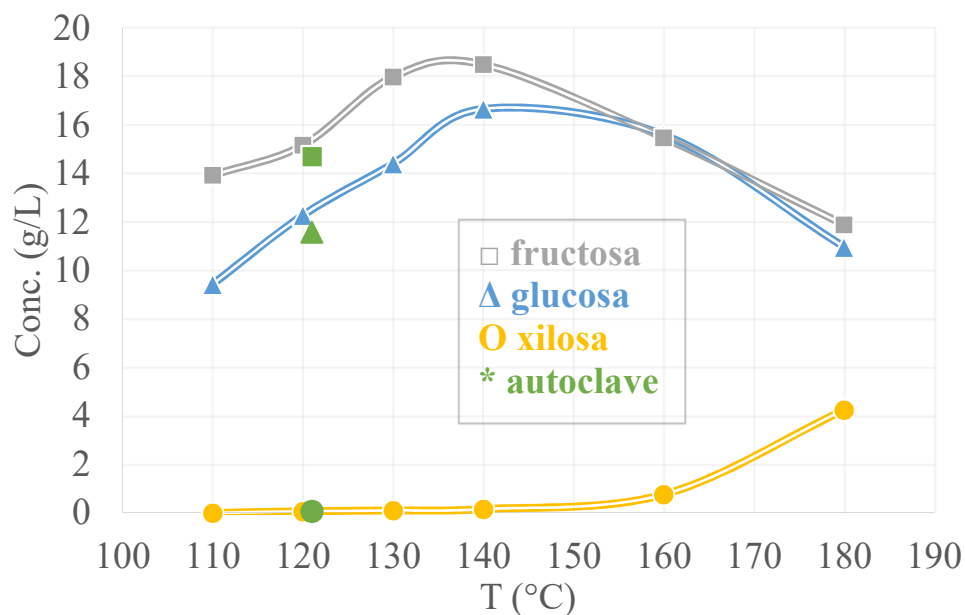


Gráfico 5. Concentración de glucosa, fructosa y xilosa en hidrolizados según análisis de HPLC

Se observa que aumenta la concentración de glucosa y fructosa para los hidrolizados obtenidos de 110 °C a 140 °C, sin embargo, a 160 °C y 180 °C, las concentraciones de estos azúcares son menores y además ya hay contenido de xilosa. Es importante mencionar que en el análisis de HPLC sólo se usaron estos tres estándares para cuantificar azúcares, aunque hubo la presencia de más picos a diferentes tiempos de retención por lo que es probable que otros azúcares estén en los hidrolizados como por ejemplo arabinosa o manosa que contribuyen a los porcentajes altos de AR obtenidos previamente en los hidrolizados obtenidos a las dos temperaturas más altas.

Por lo anterior se fermentaron todos los hidrolizados y no solamente el de 160 °C.

Se analizó la presencia de derivados de furano en el hidrolizado también, ya que se ha estudiado que estos compuestos actúan como inhibidores de la fermentación disminuyendo la actividad de las enzimas no glucolíticas como las piruvato y aldehído deshidrogenasa (113, 114)

En la **Gráfico 6**, se presentan las concentraciones de HMF en los hidrolizados. No se encontró furfural. Se observa en la figura que a partir de una T de 140 °C es donde empieza a incrementarse la concentración de HMF siendo mayor a 500 mg/L para el caso de los

hidrolizados obtenidos a una T de 160 °C y 180 °C. Es decir que a estas T se tendría un efecto inhibitorio para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (114).

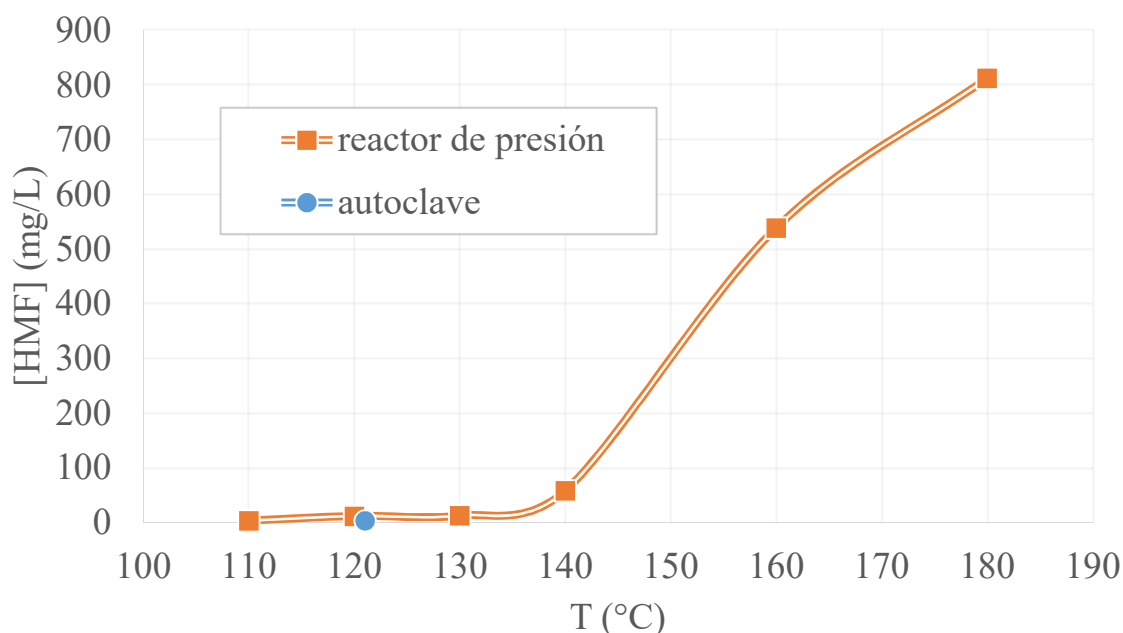


Gráfico 6. Presencia de derivados de furano en los hidrolizados según análisis de HPLC.

4.1.3.2. Efecto de la P en el rendimiento de AR

En el **Gráfico 7**, se presenta el efecto de P sobre el rendimiento de AR durante la hidrólisis térmica a 160 °C y 30 min. El método que se utilizó para discriminar entre los resultados fue el procedimiento ANOVA. Según este, no hay diferencias estadísticamente significativas entre la aplicación de presión de 1 MPa, 0.8 MPa y 0.6 MPa) con un nivel de confianza del 95%.

En otros estudios donde se analizó el efecto de la P sobre el rendimiento de azúcar a partir de otra biomasa, resultó que un mayor rendimiento de azúcar se obtiene cuando se incrementa la presión. Esto fue atribuido a una mayor penetración de agua en la parte interna de la biomasa, cambios de cristalinidad, reducción de tamaño de partícula o daños en la estructura a alta presión (115, 116).

En este caso, el efecto positivo de la presión a valores superiores a 0.5 MPa, puede ser atribuido al estado físico y la acidez del agua. Según el diagrama de fases termodinámico del agua, ésta va de vapor (a 160 °C y P =0.5 MPa) a estado líquido (P > 0.5 MPa y 160 °C). Por lo tanto, a 0.5 MPa, el contacto entre la CN y el agua no está favorecido afectando

el rendimiento de la reacción. Además, la constante de acidez del agua es más pequeña a esta P que a valores mayores. Así que como no se encontró diferencia significativa entre una P de 0.6 MPa, 0.8 MPa ó 1 MPa, se eligió la primera para llevar a cabo los demás experimentos.

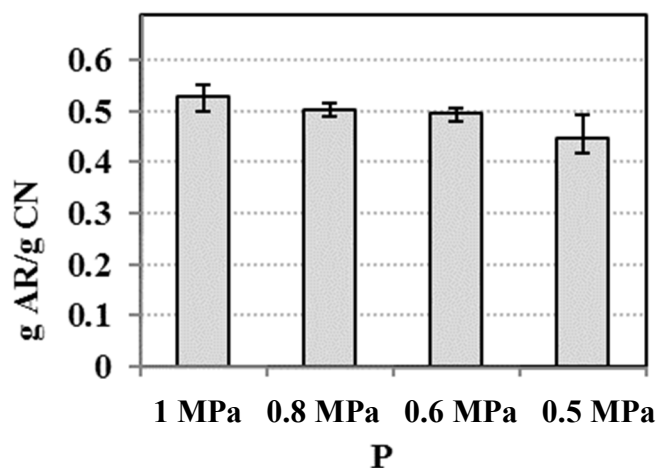


Gráfico 7 Efecto De la P en el rendimiento de AR

4.1.3.3. Efecto del tipo de gas en el rendimiento de AR

Se evaluaron dos gases, CO₂ y N₂, para llevar a cabo la reacción de hidrólisis. El CO₂ se eligió con el fin de aumentar la acidez de la solución y por lo tanto mejorar el rendimiento de AR. Los resultados se muestran en el **Gráfico 8**. El método utilizado para analizar los resultados fue la prueba de Fisher. Según este método, no hay diferencias estadísticamente significativas. Es probable que a 160 °C y 0.6 o 1 MPa, la cantidad de H₃O⁺ y H₂CO₃ no son suficientes para mejorar el rendimiento (64), en contraste con lo de demostrado por Zhang y Wu (107) donde el CO₂ afecta positivamente la producción de glucosa cuando se utiliza el bagazo de caña de azúcar como materia prima.

En este caso de la CN, el pH de la mezcla de agua - CO₂ disminuyó de 4.1 con N₂ a 3.9 con CO₂. De acuerdo con Rogalinski et al (66), los resultados de rendimiento obtenido no son de extrañar debido a que no se observó una disminución en el pH. Vale la pena señalar que un valor de pH de 2.0 o menos es causado por la adición de ácido sulfúrico en la hidrólisis. Sin embargo, operando la reacción a 160 °C, 0.6 MPa durante 30 min se logran resultados de rendimiento de AR comparables con la hidrólisis ácida.

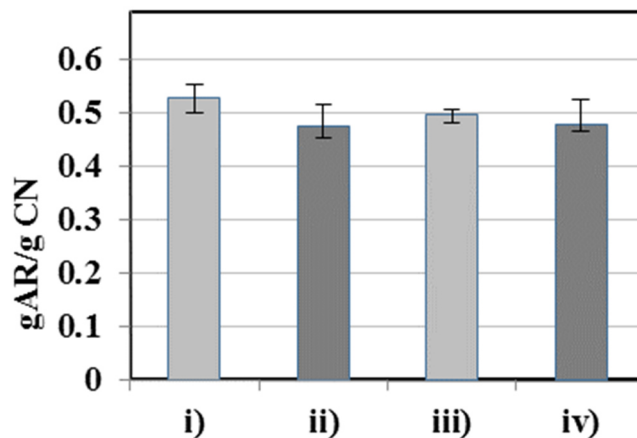


Gráfico 8 Efecto del tipo de gas en el rendimiento de AR con 2.5×10^{-2} g/mL de CN: i) 1 MPa-N₂, ii) 1 MPa-CO₂, iii) 0.6 MPa-N₂, iv) 0.6 MPa-CO₂ a 160 °C, 350 rpm y 30 min

4.1.3.4. Efecto de la carga de CN en el rendimiento de AR

Este efecto se estudió para los valores de carga de masa de CN de 2.5×10^{-2} g/cm³ y 7.5×10^{-2} g/cm³.

Cuando se incrementa la carga de CN, el rendimiento de AR se ve disminuido en un 6%. (**Gráfico 9**). La reacción de hidrólisis térmica se basa en que los iones H₃O⁺ del agua atacan a los enlaces β-1, 4-glicosídicos del polímero. Si la fracción H₂O/CN disminuye, menor será la cantidad de estos iones y por lo tanto también el rendimiento. Sin embargo, se aplicó un análisis estadístico de ANOVA y se concluyó que no existe diferencia significativa al cambiar la carga de CN, con un nivel de confianza del 95%.

Por lo tanto, se eligió una carga de 2.5×10^{-2} g/cm³ de CN para otros experimentos.

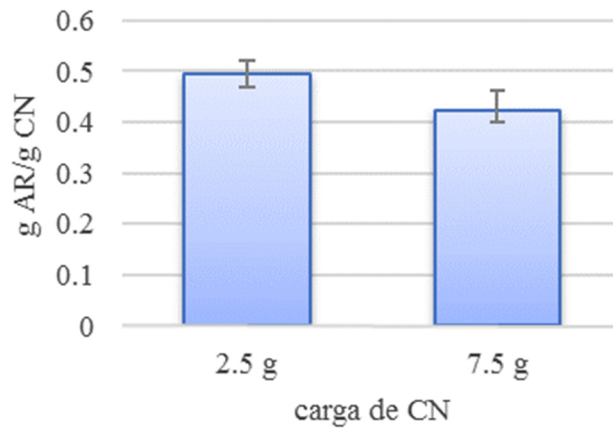


Gráfico 9 Efecto de la carga de CN en el rendimiento de AR durante la reacción de hidrólisis térmica

4.2 FERMENTACIÓN

4.2.1. Efecto de la concentración de glucosa en el tiempo de fermentación y % de disminución de glucosa

Se obtuvieron los resultados representados en el **Gráfico 10**. Se puede observar que mientras mayor es la concentración de glucosa en la solución, mayor es el tiempo necesario de fermentación para tener una disminución de glucosa cercana a 90 % que significaría una mayor transformación de glucosa a etanol. Para una concentración de glucosa de 2.5 % p/v son suficientes 24 h de fermentación, para una concentración de 5 % p/v son 48 h y para 7.5 y 10 % p/v de glucosa, son necesarias 72 h. Esto, sin embargo, depende de la levadura utilizada y de las condiciones del reactor de fermentación. Para este caso, se elige una concentración de 5 % p/v y un tiempo de 48 h de fermentación para aplicar a los hidrolizados de cáscara de naranja.

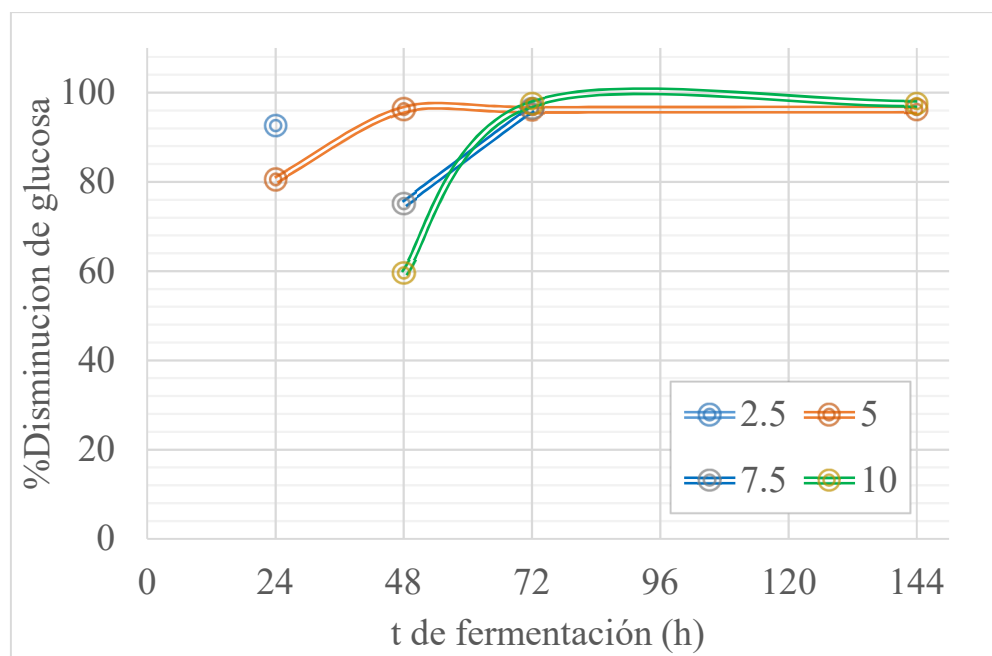


Gráfico 10 Efecto de la concentración de glucosa en el tiempo de fermentación y % de disminución de glucosa

4.2.2. Efecto de la suma de nutrientes al hidrolizado

Para el caso de la solución con nutrientes se obtuvo un rendimiento de 57.9 % y para el hidrolizado sin nutrientes de 53.1 %. Se realizó una prueba estadística de Fisher con un nivel de confianza del 99% y se concluyó que no hay diferencia significativa entre la fermentación con y sin nutrientes.

4.2.3. Efecto del tipo de hidrólisis en el rendimiento de etanol

Se realizó el cálculo de L obtenidos de etanol por cada 1000 kg de CN ya que la reducción de volumen, mediante calentamiento, de los hidrolizados para llegar a una concentración de 5 % p/v de AR, necesitó distinto volumen inicial de hidrolizado y por lo tanto provenían de una carga total de CN diferente para cada caso. Por ejemplo, para obtener 25 mL de hidrolizado reducido de un tratamiento a una T de 140 °C, 160 °C ó 180 °C, fueron necesarios 100 mL de cada hidrolizado, es decir 2.5 g de CN, pero para los provenientes de un tratamiento a una T de 110 °C, 120 °C ó 130 °C, fueron necesarios 200 mL ó 5 g de CN.

En el **Gráfico 11** se observa que a una T de 120 °C, 130 °C y 140 °C se obtienen mayores rendimientos de etanol. (La numeración corresponde a la de **la Tabla 9**). Lo anterior concuerda con los resultados del análisis por HPLC de los hidrolizados ya que a éstas temperaturas hay una mayor concentración de glucosa y fructosa, que son los azúcares que contribuyen al rendimiento de etanol. Además, es probable que en el caso de los hidrolizados obtenidos a T de 160 °C y 180 °C y el obtenido de la hidrólisis ácida en autoclave, que dieron rendimientos menores de etanol, la cantidad de HMF en ellos sea suficiente para contribuir a la inhibición de la fermentación.

Otro factor que pudiera estar afectando el rendimiento, además de la concentración de azúcares, es la probable presencia de otro tipo de inhibidores como ácidos carboxílicos o derivados fenólicos que tendrían que analizarse en concentración e identidad (113).

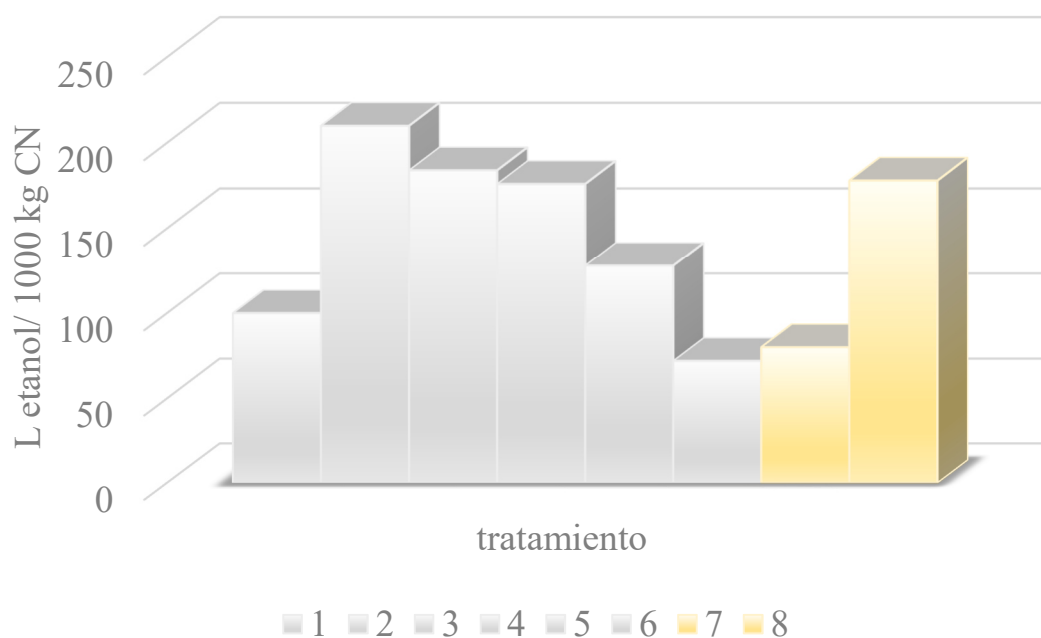


Gráfico 11 Efecto del tipo de hidrólisis en el rendimiento de etanol

Se realizó una prueba Duncan de los datos obtenidos y se concluye que no hay diferencia significativa entre los hidrolizados obtenidos en el reactor a 130 °C y 140 °C y el obtenido en la autoclave a 121 °C, ni hay diferencia significativa entre el tratamiento con ácido y a 180 °C. Para el caso de los hidrolizados obtenidos a 110 °C, 120 °C y 160 °C sí hay diferencia significativa con un nivel de confianza del 99 %, por lo que el mayor rendimiento de etanol se obtiene al aplicar una T en el reactor de presión de 120 °C, con un

rendimiento de 210 L/1000 kg de CN, sin embargo, es necesario aún realizar un análisis de gasto de energía entre la reacción de hidrólisis en el reactor de presión a 120 °C (número 2 en el **Gráfico 11**) y la hidrólisis en el autoclave (número 8 en el **Gráfico 11**) para confirmar que sí es viable y de mayor eficiencia utilizar el reactor de presión a 120 °C.

4.2.4. Ciclos de fermentación

En el **Gráfico 12** se presenta el rendimiento de etanol obtenido al destilar al final de cada ciclo. Es importante aclarar que al final del ciclo número 6, se destiló la solución con las esferas en ella.

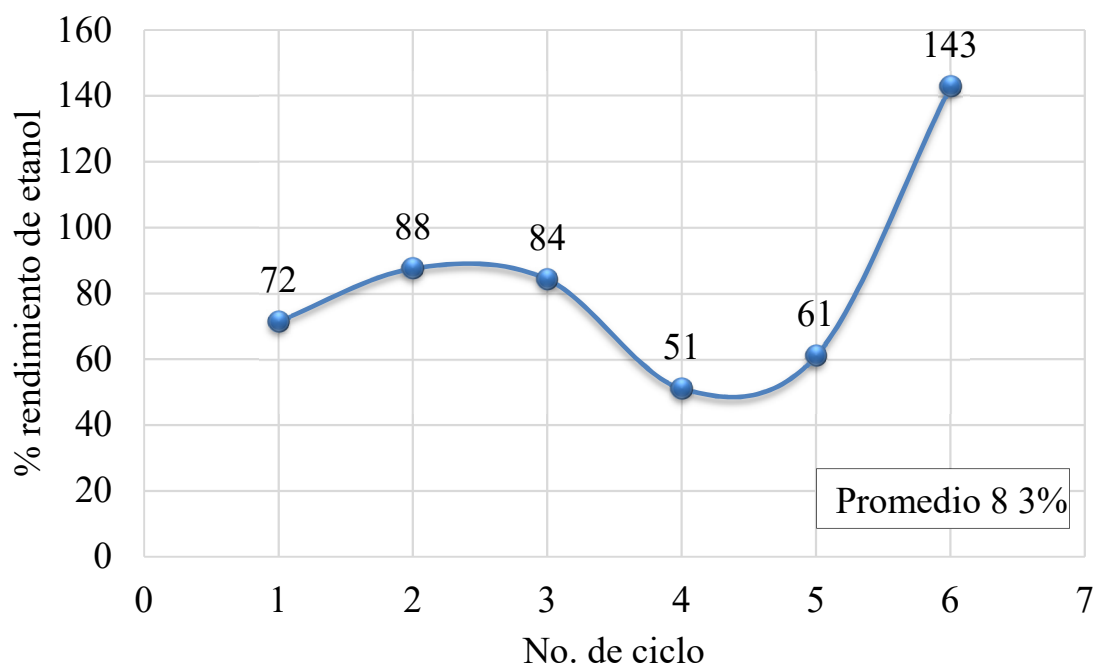


Gráfico 12 Ciclos de fermentación

Se obtiene un promedio de 83 % de rendimiento de etanol sin embargo en el ciclo 4 y 5 se observa una disminución. Esto probablemente es debido a que hay una saturación de inhibidores en la esfera y por lo tanto el consumo de glucosa, o flujo de ésta, de la solución hacia el interior de la esfera, no es el mismo que al inicio (117). También es probable que la concentración de etanol dentro de la esfera disminuya el rendimiento de las reacciones enzimáticas involucradas en el proceso, debido a que la levadura solo tolera cierta

concentración. El rendimiento del ciclo 6, mayor a 100 %, hace concluir que se fue acumulando cierta concentración de etanol dentro de la esfera desde ciclos anteriores.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- ❖ Se modificó el proceso de hidrólisis y fermentación para la producción de azúcares reductores y bioetanol a partir de residuos de cáscara de naranja utilizando catálisis heterogénea, hidrólisis térmica y fermentación con esferas de alginato
- ❖ Se logró evaluar la eficiencia de la producción de azúcares reductores a partir de residuos de cáscara de naranja aplicando hidrólisis ácida, hidrólisis catalizada con alúmina y arcillas e hidrólisis térmica, resultando más eficiente ésta última.
- ❖ Se analizó el efecto de la carga de catalizador en el rendimiento de azúcares reductores y se encontró que no hay diferencia significativa con un 95% de confianza al aplicar catálisis heterogénea
- ❖ Se analizó el efecto de la T, P, tipo de gas y carga de cáscara en el rendimiento de AR en la hidrólisis resultando que la T es la variable que tiene un mayor efecto
- ❖ Se determinaron azúcares reductores por espectrofotometría UV-Vis utilizando el método de DNS y por HPLC
- ❖ Se estudió el efecto del tipo de esfera, tiempo de fermentación, concentración de glucosa, agitación, carga de esfera, tiempo de incubación y adición de nutrientes durante la fermentación de soluciones de glucosa e hidrolizados de cáscara de naranja utilizando *S. cerevisiae* en forma de polvo y de esfera
- ❖ El tratamiento térmico a la CN da rendimientos comparables con la hidrólisis ácida no siendo necesarios reactivos adicionales al agua y sin producción de residuos corrosivos.
- ❖ El rendimiento de etanol se determinó haciendo uso de CG e índice de refracción, encontrando que el rendimiento es mejorado al utilizar levadura inmovilizada en esferas debido a que hay una mayor tolerancia a inhibidores y una mayor concentración de levadura.
- ❖ Se detectó butanol como subproducto utilizando CG.
- ❖ La levadura en forma de esferas permite su fácil recuperación y posible reuso, disminuyendo costos y tiempo

- ❖ Es posible reutilizar la esfera hasta 6 ciclos, sin embargo, desde el 4 ciclo el rendimiento se ve disminuido en un 20%.
- ❖ La modificación al proceso de obtención de etanol a partir de residuos de CN mediante la aplicación de hidrólisis térmica y fermentación con esferas de alginato resulta en un mayor rendimiento de etanol comparado con la hidrólisis ácida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy conversion and Management*. 2011:858-75.
2. Menon V, Rao M. Trend in bioconversion of lignocellulose; Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012:1-29.
3. García García JL. Ciencias de Joseleg [Internet]2015. [cited 2015 nov 10, 2015]. Available from: <http://cienciasdejoseleg.blogspot.mx/2015/01/la-lignina-como-material-de-sosten.html>.
4. Binod P, Singhu R, Singhanian RR, Vikran S, Devi L, Nagalakshmi S, et al. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology*. 2010:4767-74.
5. Liu S-Y, Lin C-Y. Development and perspective of promising energy plants for bioethanol production in Taiwan. *Renewable Energy*. 2009, vol. 34:1902-7.
6. Polycarpou P. Bioethanol production from *Asphodelus aestivus*. *Renewable Energy*. 2009:2525-7.
7. Romao BB, Silva FBd, Resende MMd, Cardoso VL. Ethanol Production from the Soybean Molasses Hydrolysed. *Energy and Fuels*. 2012:2310-2316
8. Binod P, Kuttiraja M, Archana M, Janu KU, Sindhu R, Sukumaran RK, et al. High temperature pretreatment and hydrolysis of cotton stalk for producing sugars for bioethanol production. *Fuel*. 2012:340-5.
9. Rabelo SC, Carrere H, R. Maciel Filho ACC. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in biorefactory concept. *Bioresource Technology*. 2011:7887-95.
10. Sassner P, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*. 2008:422-30.
11. Mohanty SK, Behera S, Swain MR, Ray RC. Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. *Applied Energy*. 2009:640-4.
12. Boluda Aguilar M, Vidal García L, Castañeda Gonzalez FdP, Gómez López A. Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2010:3506-13.

13. Rodriguez LA, Toro ME, Vazquez F, Daneri MLC, Gouiric SC, Vallejo MD. Bioethanol production from grape and suhar beet pomaces by solid-state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010:5914-7.
14. Ruangviriyachai C, Niwaswong C, Kosaikanon N, Chanthai S, Chaimart P. Pineapple Peel Waste for Bioethanol Production. *Journal of Biotechnology* 150S. 2010:S1-S576
15. Deepa Shenoy AP, Vikas RK, Neeraja HS, Deeksha JS, Nayak C, Rao CV. A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. *Biomass and Energy*. 2011:4107-11.
16. Arredondo HIV, Colorado AAR, junior SDO. Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis. *Energy*. 2010:3081-7.
17. John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. Micro and macroalgal biomass; A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*. 2011:186-93.
18. Lee JW, Koo BW, Choi JW, Choi DH, Choi IG. Evaluation of waste mushroom logs as a potential biomass reasource for the production of bioethanol. *Bioresource Technology*. 2008:2736-41.
19. Dubey Ak, Gupta PK, Garg N, Naithani S. Bioethanol production from waste paper acid pretreated hydrolyzate with xylose fermenting *Pichia stipitis*. *Carbohydrate Polymers*. 2012:825-9.
20. Hernandez CC, Lara SG, Saldivar SOS. Conversion into bioethanol of insect (*Sitophilus zeamais* Motschulsky), mold (*Aspergillus flavus* Link) and sprout-damaged maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Journal or Cereal Science*. 2012:1-12.
21. Kamei I, Hirota Y, Mori T, Hirai H, Meguro S, Kondo R. Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresource Technology*. 2012:137-42.
22. Uncu ON, Cekmecelioglu D. Cost effective approach to ethanol production and optimization by response surface methadology. *Waste Management*. 2011:636-43.
23. Arredondo Velásquez HI, Colorado Ruiz AA, Junior De Oliveira S. Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis. *Energy*. 2010:3081-7.

24. Chung BY, Lee JT, Bai HW, Kim UJ, Bae HJ, Wi SG, et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of poplar bark by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production. *Radiation Physics and Chemistry*. 2012:1003-1007
25. Vucurovic VM, Razmovski RN. Sugar beet pulp as support for *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bioethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2012:128-34.
26. Pourbafrani M, Talebnia F, Niklasson C, Taherzadeh MJ. Protective Effect of Encapsulation in Fermentation of Limonene-contained Media and Orange Peel Hydrolyzate. *International Journal of Molecular Sciences*. 2007;8(8):777-87.
27. México SdIAyPd. Reporte especial naranja <http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100602-reporte-naranja.pdf2009> [
28. Fruit and tree nuts situation and outlook yearbook FTS2005 [Internet]. Department of Agriculture. Economic Research Service. 2005 [cited 28/feb/2006]. Available from: www.ers.usda.gov.
29. Mejia CC, Gutierrez AJ, Halwagi ME. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection*. 2011:189-202.
30. Soresen A, Teller PJ, Hilstrom T, Ahring BK. Hydrolysis of *Miscanthus* for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pretreatment and enzymatic treatment. *Bioresource Technology*. 2008:6602-7.
31. Chen H, Qiu W. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnology Advances*. 2010:556-62.
32. Converti Attilio PP, Del Borgui Marco, Ferraiolo Giuseppe. Pretreatment Operations and Alcohol Fermentation of Orange Wastes. *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING*. 1989:277-81.
33. Santi G, Crognale S, D'Annibale A, Petruccioli M, Ruzzi M, Valentini R, et al. Orange peel pretreatment in a novel lab-scale direct steam-injection apparatus for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2014;61(0):146-56.
34. Bicu I, Mustata F. Optimization of isolation of cellulose from orange peel using sodium hydroxide and chelating agents. *Carbohydrate Polymers*. 2013;98(1):341-8.

35. Widmer W, Zhou W, Grohmann K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 2010:5242–9.
36. Monavari S, Galbe M, Zacchi G. Influence of impregnation with lactic acid on sugar yields from steam pretreatment of sugarcane bagasse and spruce, for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2011:3115-22.
37. Singh Oberoi H, Venkata Vadlani P, Madl RL. Ethanol Production from Orange Peels: Two-Stage Hydrolysis and Fermentation Studies Using Optimized Parameters through Experimental Design. *J Agric Food Chem*. 2010:3422-9.
38. Kotarska K, Świerczyńska A, Dziemianowicz W. Study on the decomposition of lignocellulosic biomass and subjecting it to alcoholic fermentation: Study on the decomposition of lignocellulosic biomass. *Renewable Energy*. 2015;75(0):389-94.
39. Jung YH, Kim IJ, Kim HK, Kim KH. Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2013;132(0):109-14.
40. Ruiz HA, Silva DP, Ruzene DS, Lima LF, Vicente AA, Teixeira JA. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain - Effect of process conditions. *Fuel*. 2012;95(1):528-36.
41. Abushammala H, Hashaikeh R. Enzymatic hydrolysis of cellulose and the use of TiO₂ nanoparticles to open up the cellulose structure. *Biomass and Bioenergy*. 2011:3970-75.
42. Tong DS, Xia X, Ping Luo X, Mei Wu L, Xiang Lin C, Hua Yu W. Catalytic hydrolysis of cellulose to reducing sugar over acid-activated montmorillonite catalysts. *Applied Clay Science*. 2012:147-53.
43. Suárez LMC. Introducción a la Catálisis Heterogénea. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2002:1-12, 34-36
44. Tan IS, Lam MK, Lee KT. Hydrolysis of Macroalgae Using Heterogeneous Catalyst for Bioethanol Production. *Carbohydrate Polymers*. 2010:561-66.
45. Caia H, Changzhi L, Wanga A, Xua G, Zhang T. Zeolite-promoted hydrolysis of cellulose in ionic liquid, insight into the mutual behavior of zeolite, cellulose and ionic liquid. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2012:333-38.

46. Zhou L, Shi M, Cai Q, Wua L, Hua X, Yang X, et al. Hydrolysis of hemicellulose catalyzed by hierarchical H-USY zeolites – The role of acidity and pore structure. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013:54-9.
47. Marzo M, Gervasini A, Carniti P. Hydrolysis of disaccharides over solid acid catalysts under green conditions. *Carbohydrate Research*. 2012:23-31.
48. Yamaguchi D, Kitano M, Suganuma S, Nakajima K, Kato H, Hara M. Hydrolysis of Cellulose by a Solid Acid Catalyst under Optimal Reaction Conditions. *J Phys Chem*. 2009:3181-8.
49. Suganuma S, Nakajima K, Kitano M, Yamaguchi D, Kato H, Hayashi S, et al. Hydrolysis of Cellulose by Amorphous Carbon Bearing SO₃H, COOH, and OH Groups. *J AM CHEM SOC*. 2008:12787-93.
50. Zakzeski J, Ruud J. H G, Arjan TS, Weckhuysen BM. Solid Acid-Catalyzed Cellulose Hydrolysis Monitored by In Situ ATR-IR Spectroscopy. *ChemSusChem*. 2012:430-7.
51. Vandana S, Ashutosh T, Premlata K, Stuti T. Microwave-promoted hydrolysis of plant seed gums on alumina support. *Carbohydrate Research*. 2006:2270-4.
52. Lourvanij K, Rorrer GL. Dehydration of glucose to organic acids in microporous pillared clay catalysts. *Applied Catalysis A: General*. 1994:147-65.
53. Besoain E. *Mineralogía de arcillas de suelos: Bib. Orton IICA / CATIE*; 1985.
54. Won Lee J, W. Jeffries T. Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. *Bioresource Technology*. 2011;102:5884–90.
55. Rogalinski T, Ingram T, Brunner G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2008;47(1):54-63.
56. Ibbett R, Gaddipati S, Davies S, Hill S, Tucker G. The mechanisms of hydrothermal deconstruction of lignocellulose: New insights from thermal–analytical and complementary studies. *Bioresource Technology*. 2011;102(19):9272-8.
57. Santos ALF, Kawase KYF, Coelho GLV. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2011;56(3):277-82.

58. Fernández-Bolaños J, Felizón B, Heredia A, Rodríguez R, Guillén R, Jiménez A. Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*. 2001;79(1):53-61.
59. Cuevas M, García JF, Hodaifa G, Sánchez S. Oligosaccharides and sugars production from olive stones by autohydrolysis and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*. 2015;70(0):100-6.
60. Nabarlantz D, Ebringerová A, Montané D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 2007;69(1):20-8.
61. Batalha LAR, Han Q, Jameel H, Chang H-m, Colodette JL, Borges Gomes FJ. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. *Bioresource Technology*. 2015;180(0):97-105.
62. Narayanaswamy N, Faik A, Goetz DJ, Gu T. Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. 2011;102(13):6995-7000.
63. Buruiana C-T, Vizireanu C, Garrote G, Parajó JC. Optimization of corn stover biorefinery for coproduction of oligomers and second generation bioethanol using non-isothermal autohydrolysis. *Industrial Crops and Products*. 2014;54:32-9.
64. Relvas FM, Morais ARC, Bogel-Lukasik R. Kinetic modeling of hemicellulose-derived biomass hydrolysis under high pressure CO₂-H₂O mixture technology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2015;99(0):95-102.
65. Roque RMN, Baig MN, Leeke GA, Bowra S, Santos RCD. Study on sub-critical water mediated hydrolysis of *Miscanthus* a lignocellulosic biomass. *Resources, Conservation and Recycling*. 2012;59(0):43-6.
66. Boluda Aguilar M, Lopez Gomez A. Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*. 2013:188-97.
67. Shen DK, Gu S. The mechanism for thermal decomposition of cellulose and its main products. *Bioresource Technology*. 2009;100(24):6496-504.

68. Cantero DA, Dolores Bermejo M, José Cocero M. High glucose selectivity in pressurized water hydrolysis of cellulose using ultra-fast reactors. *Bioresource Technology*. 2013;135(0):697-703.
69. Sasaki C, Sumimoto K, Asada C, Nakamura Y. Direct hydrolysis of cellulose to glucose using ultra-high temperature and pressure steam explosion. *Carbohydrate Polymers*. 2012;89(1):298-301.
70. Okuda N, Ninomiya K, Katakura Y, Shioya S. Strategies for reducing supplemental medium cost in bioethanol production from waste house wood hydrolysate by ethanologenic *Escherichia coli*: Inoculum Size Increase and cocultura with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2008:90-6.
71. Dionisi D, Anderson JA, Aulenta F, McCue A, Paton G. The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2015;90(3):366-83.
72. Hsu CL, Chang KS, Lai MZ, Chang TC, Chang YH, Jang HD. Pretreatment and hydrolysis of cellulosic agricultural wastes with a cellulase producing *Streptomyces* for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2011:1878-84.
73. Neel PI, Gedanken A, Schwarz R, Sendersky E. Mild sonication accelerates ethanol production by yeast fermentation. *Energy and Fuels*. 2012:2352-56.
74. Werle LB, Garcia JC, Kuhn RC, Schwaab M, Foletto EL, Cancelier A, et al. Ultrasound-assisted acid hydrolysis of palm leaves (*Roystonea oleracea*) for production of fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*. 2013;45(0):128-32.
75. Wu KJ, Chang CF, Chang Js. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized bed and packed bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. *Process Biochemistry*. 2007:1165-71.
76. Ruiz HA, Silva DP, Ruzene DS, Lima LF, Vicente AA, Teixeira JA. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain - Effect of process conditions. *Fuel*. 2012:528-36.
77. Peinado RA, Moreno JJ, Villalba JM, González-Reyes JA, Ortega JM, Mauricio JC. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;40(1):79-84.

78. Wang HL, In Seong C, Young Gyu K, Duck Joo Y, Hyeun Jong B. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. *Bioresource Technology*. 2011;102:8191–8.
79. Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 2004;21(4):377-97.
80. Poreda A, Tuszyński T, Zdaniewicz M, Sroka P, Jakubowski M. Support materials for yeast immobilization affect the concentration of metal ions in the fermentation medium. *Journal of the Institute of Brewing*. 2013;119(3):164-71.
81. Zohar-Perez C, Chet I, Nussinovitch A. Unexpected distribution of immobilized microorganisms within alginate beads. *Biotechnol Bioeng*. 2004;88(5):671-4.
82. Behera Shuvashish, Shaktimay K, Rama Chandra M, Ramesh Chandra R. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. *Applied Energy*. 2010:96-100.
83. Bekatorou A, Koutinas AA, Kaliafas A, Kanellaki M. Freeze-dried *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on gluten pellets for glucose fermentation. *Process Biochemistry*. 2001;36(6):549-57.
84. Kourkoutas Y, Kanellaki M, Koutinas AA. Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. *LWT - Food Science and Technology*. 2006;39(9):980-6.
85. Plessas S, Bekatorou A, Koutinas AA, Soupioni M, Banat IM, Marchant R. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresource Technology*. 2007;98(4):860-5.
86. Singh A, Sharma P, Saran AK, Singh N, Bishnoi NR. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. *Renewable Energy*. 2013;50:488-93.
87. Hamdy MK, Kim K, Rudtke CA. Continuous ethanol production by yeast immobilized on to channeled alumina beads. *Biomass*. 1990;21(3):189-206.
88. Grohmann K, Cameron RG, Buslig BS. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresource Technology*. 1995;54(2):129-41.

89. Vera Garcia MA. Producción de bioetanol a partir de jugo de naranja y piña empleando pretratamiento de ozonólisis y adición de agentes externos (sacarosa, levadura, cáscara de naranja y piña). Toluca, Estado de México, México: Universidad Autónoma del Estado de México; 2010.
90. Madrid Morales E. Obtención de bioetanol a partir de residuos de naranja *Citrus spp.*: Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales; 2011.
91. Mojovic L, Nikolic S, Rakin M, Vukasinovic M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel*. 2006:1750-5.
92. Kaparaju P, Serrano M, Thomsen_ AB, Kongjan P, Angelidaki I. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 2009:2562-8.
93. Chang YH, Chang KS, Huang CW, Hsu CL, Jang HD. Comparision of batch and fed batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production. *Fuel*. 2012:166-73.
94. Roy P, Orikasa T, Tokuyasu K, Nakamura N, Shiina T. Evaluation of the life cycle of bioethanol produced from rice straws. *Bioresource Technology*. 2012:239-44.
95. Dodic S, Popov S, Dodic J, Rankovic J, Zavargo Z, Mucibabic RJ. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. *Biomass and Bioenergy*. 2009:822-7.
96. Chemists AAoOA. Official methods of analysis of the association of analytical chemists. 16th ed. Washington, D.C.1998.
97. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426-8.
98. Zhang H, Wu S. Enhanced enzymatic cellulose hydrolysis by subcritical carbon dioxide pretreatment of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 2014;158(0):161-5.
99. Lanzafame P, Temi DM, Perathoner S, Spadaro AN, Centi G. Direct conversion of cellulose to glucose and valuable intermediates in mild reaction conditions over solid acid catalysts. *Catalysis Today*. 2012;179(1):178-84.
100. Kobayashi H, Ohta H, Fukuoka A. Conversion of lignocellulose into renewable chemicals by heterogeneous catalysis. *Catalysis Science & Technology*. 2012;2(5):869-83.

101. Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2009;100(1):10-8.
102. Vo HT, Widyaya VT, Jae J, Kim HS, Lee H. Hydrolysis of ionic cellulose to glucose. *Bioresource Technology*. 2014;167(0):484-9.
103. Sinitsyn VV, Ponyatovsky EG, Kolesnikov AI, Dahlborg U, Calvo Dahlborg M. Thermodynamic properties and structural features of water at normal and high pressures. *Solid State Ionics*; 2001. p. 415-20.
104. Castañón Rodríguez JF, Torrestiana Sánchez B, Montero Lagunes M, Portilla Arias J, Ramírez de León JA, Aguilar Uscanga MG. Using high pressure processing (HPP) to pretreat sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*. 2013;98(1):1018-24.
105. Jin S, Zhang G, Zhang P, Fan S, Li F. High-pressure homogenization pretreatment of four different lignocellulosic biomass for enhancing enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*. 2015;181(0):270-4.
106. Behera S, Arora R, Nandhagopal N, Kumar S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;36(0):91-106.

CAPÍTULO 6 ANEXOS

Primer artículo

De: Olivia Lenahan

Enviado: miércoles, 1 de marzo de 2017 10:05 a. m.

Para: Brenda Corona; groam@uaemex.mx

CC: Martin Hubbe; Lucian Lucia

Asunto: [BioRes 10708] PUBLISHED; Thermal Hydrolysis of Orange Peel

Hello authors,

Thanks for your quick reply. Your paper is now published online and you can find your article on the Open Journal Systems (OJS) website, located here: <http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/index>; and your paper is also listed at : <http://www.ncsu.edu/bioresources/>

Attached is an updated page form with publication date and payment information, for your records. For financial questions, please contact our coordinator, Melissa Rabil, at biorescoordinator@gmail.com

Please look over your published paper and let me know if you have any questions or concerns regarding the pdf document.

Thank you!

Best Regards,
Olivia Lenahan

On Tue, Feb 28, 2017 at 5:50 PM, Brenda Corona <br8enda@hotmail.com> wrote:

Dear Olivia,

We approve the last version you send us. There is no further correction so please continue with the process.

Brenda Corona

Thermal Hydrolysis of Orange Peel and its Fermentation with Alginate Beads to Produce Ethanol

Brenda Corona Vázquez,^a Gabriela Roa-Morales,^{a,*} Reyna Natividad,^a Patricia Balderas-Hernández,^a and Jaime Saucedo-Luna^b

Orange peel (OP) was subjected to thermal hydrolysis at temperature (T) and pressure (P) values lower than 180 °C and 1000 kPa, respectively, to minimize the energy consumption and obtain a good ethanol yield. The process was conducted in an autoclave, a pressurized reactor for studying the effect of T (120 to 180 °C), P (500 to 1000 kPa), gas type (N_2 or CO_2), and OP loading (2.5×10^{-2} and 5×10^{-2} gmL^{-1}) on the reducing sugars yield. The results were compared with those from acid hydrolysis. Hydrolysates were fermented using immobilized yeast on alginate beads, and the highest ethanol yield of 33.14 g/L was obtained from OP treated at 120 °C. Under these conditions, a minimum of 1,407 kWh energy consumption was achieved.

Keywords: Ethanol; Thermal hydrolysis; Orange peel; Alginate beads

Contact information: a: Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca-Atlacomulco Km. 14.5, Toluca, Estado de México, 50200, México; b: Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Gral. Francisco J. Mugica, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, 58030, México;

* Corresponding author: groam@uaemex.mx

INTRODUCTION

Currently, 84% of energy that is consumed in the world originates from fossil fuels, a non-renewable and rapidly depleting resource. In addition, the use of fuels derived from it results in environmental problems such as emission of greenhouse gases, as well as economic concerns. Therefore, the need to find an alternative energy source has emerged in recent years. Lignocellulosic residues (for example: forestry waste, fruit peel, cereal, or waste paper) as energy sources are a good choice because of their chemical composition, which mostly consists of cellulose, hemicellulose, and lignin. These residues can be processed to obtain ethanol, which can then be used as an alternative combustible fuel (Sun and Cheng 2002; Balat 2011), a biofuel similar to gasoline, but with some advantages over it.

Ethanol is produced mostly from sugar cane or corn, principally in the USA and Brazil. However, in Mexico, as in many other countries, the production of ethanol from sugar cane or corn would not be a sustainable process. Corn and sugar cane production is not sufficient for national consumption in Mexico, as a certain amount is actually imported. Therefore, this process would imply investment in exclusive plantations for biofuel production. On the other hand, Mexico is the fourth worldwide orange producer. Every year, 800 thousand tons of dry waste from the orange industry could be exploited for ethanol production (Rezzadori *et al.* 2012), as this fruit is rich in fermentable sugars, has low lignin levels, is available all year round, and is inexpensive.

Previous studies have reported the successful hydrolysis of OP into sugars and their conversion into ethanol (Grohmann *et al.* 1995; Oberoi *et al.* 2010; Ghorbanpour Khamseh and Miccio 2012). The effects of pH, time, and temperature pretreatment on ethanol production has been studied extensively in the presence of acids (Widmer *et al.* 2010). However, the process with water as a reagent for ethanol production has not been analyzed in terms of energy expenditure and costs. Most of the studies on OP hydrolysis have employed acids. However, these processes are not environmentally friendly because corrosive residues may be produced and acid has to be separated from the hydrolysate. Also, it is necessary to use inoxidizable special reactors with steam injection, which are not easily accessible. Although enzymatic hydrolysis and Simultaneous Saccharification Fermentation (SSF) have several advantages, it is necessary to have an efficient hydrolysis and fermentation from the enzyme mixtures used (Santi *et al.* 2014).

Thermal hydrolysis has the advantage that no chemicals other than water are needed and the cellulose accessibility is enhanced. Thermal hydrolysis of several lignocellulosic materials has been reported at various temperature (*T*) ranges (180 to 250 °C) and pressure (*P*) of approximately 10,000 kPa (Prado *et al.* 2014; Sukhbaatar *et al.* 2014; Zhang and Wu 2014). Nevertheless, it is evident that the glucose yield achieved not only depends on the reaction conditions but also on the biomass source because of the variable chemical compositions (Yoon *et al.* 2014).

Hence, this study investigated the effect of thermal hydrolysis of orange peel (OP) on reducing sugars (RS) and glucose yields under various temperature and pressure conditions. The obtained results were compared with those attained with the widely studied acid hydrolysis method based on proximal analysis of the waste (Lee and Jeffries 2011). Finally, the hydrolysates were fermented with immobilized yeast on alginate beads to improve the ethanol yield (Lee *et al.* 2011), reduce the risk of microbial contamination, improve product tolerance, and to provide the option of relatively easy separation in such a way that the yeast can be reused. Sodium alginate is inexpensive, nontoxic, and easily form beads with yeast (Singh *et al.* 2013).

EXPERIMENTAL

Materials

Valencia orange (*Citrus sinensis* cv. *Valencia*) was collected from a local supermarket (Toluca City, Mexico) in bulk in mid-March. The peels were removed (mesocarp and exocarp together), washed, and dried at 60 °C in a Riossa E33D RSU Lab (Monterrey, Mexico) oven for approximately 4 h; they were then milled to 0.25-mm particle size.

Deionized water was used in all experiments. All chemicals were of reagent grade. H₂SO₄ and CaCl₂ were purchased from Fermont (Monterrey, México); glucose, MgSO₄, K₂HPO₄, and (NH₄)₂SO₄ were purchased from Baker (Monterrey, México); sodium alginate was purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. (India); and *Saccharomyces cerevisiae* yeast was obtained from Safmex S.A. de C.V. (Toluca City, Mexico).

Methods

Analytical methods

Ash and moisture content were measured using the Official Methods of Analysis: Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C. 1998). Protein content was

determined by estimating the total nitrogen content using the Kjeldahl method (A.O.A.C. 1998) and multiplying by a conversion factor of 6.25. Pectin was determined by Sudhakar and Maini's method (2000).

The content of hemicellulose and cellulose contents were 144.6 and 119.3 g/kg, respectively, on a dry matter basis, and the lignin content was 21.7 g/kg. A soluble RS content of 211.2 g/kg, protein content of 50.92 g/kg, and pectin content of 189.4 g/kg were determined.

Reducing sugars (RS) were quantified using the Miller method (Miller 1959) with 3,5-dinitrosalicylic acid at 570 nm using a UV-Vis spectrophotometer Hach DR5000 (HACH, Mexico). Glucose, fructose, and xylose contents in hydrolysates were assayed using a HPLC system, equipped with MetaCarb 87C Guard Column (50x) (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). The elution was performed with Milli-Q water at a flow rate of 0.6 mL/min and 65 °C, and monitored by refractive index detector (Prostar 350, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). The presence of 5-hydroxymethyl-furfural (HMF) in the hydrolysates was quantified by HPLC analysis using Eclipse xD8-C18 column, eluted with 50 mM K₂HPO₄ in methanol at a flow rate of 1 mL/min at 60 °C and monitored by a UV detector.

Ethanol was quantified using a gas chromatography system (CP3800, VARIAN, Mexico) equipped with a wax column (30 m x 0.25 mm, i.d. 0.5 µm). Oven conditions were: temperature 50 °C for 3 min; gradient from 50 to 180 °C at 15 °C/min; split ratio of 50 mL/min; injector and FID temperatures of 180 °C and 250 °C, respectively. The carrier gas used was helium at a flow of 1 mL/min.

Hydrolysis

The OP was hydrolyzed in a Teflon® reactor and in an autoclave at 103.4 kPa and 120 °C for 15, 30, 45, or 60 min with 2.5 g of OP, 100 mL of deionized water, and 0.075 mL of H₂SO₄. For thermal hydrolysis, the effect of temperature, pressure, gas type, and OP load on RS yield was studied.

The temperature effect on RS yield was studied by adding 2.5 g of OP to 100 mL of deionized water into a stirred Parr reactor. Pressure was adjusted to 1000 kPa with N₂ gas and at a stirring rate of 350 rpm during 60 min. Samples were taken from the reactor after 15, 30, and 45 min and the temperature was set at 120, 140, 160, or 180 °C.

The pressure effect on RS yield was studied by adding 2.5 g of OP to 100 mL of deionized water into a stirred Parr reactor, and pressure was adjusted to 1000, 800, 600 or 500 kPa with N₂, stirring rate of 350 rpm, and temperature of 160 °C for 30 min.

The OP load effect on RS yield was analyzed by varying the load from 2.5 to 7.5 g of OP with 100 mL of deionized water at 350 rpm, 160 °C, and 30 min.

Finally, the gas type effect on RS yield was determined by switching from N₂ to CO₂ to adjust the pressure to 1000 and 600 kPa into the reactor, and working with 2.5 g of OP, 100 mL of deionized water, 350 rpm, 160 °C, and 30 min. This change was done to improve the RS yield in the presence of CO₂ and carbonic acid at high temperature and pressure, and decreased pH of the solution, facilitating hydrolysis (Zhang and Wu 2014).

In all cases, reducing sugars, glucose, xylose, and fructose yields were determined. For experiments in which the temperature effect was studied, the solid residues were dried, weighted, and analyzed by infrared spectroscopy with an IR-ATR Bruker Tensor 27 (Bruker, Alemania). Also, glucose, fructose, xylose, furfural, and HMF contents were determined for hydrolysates obtained at different temperatures at 30 min, 600 kPa, and 350 rpm.

Yeast immobilization and fermentation.

Growth medium was prepared with glucose (100 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L), MgSO_4 (0.4 g/L), and K_2HPO_4 (0.4 g/L). The pH 5 was then adjusted with 0.1 M HCl or NaOH solution. It was sterilized and then 0.015 g of yeast was added to 2.5 mL of this sterile solution growth medium. The resulting media was then transferred to an oven at 30 °C for 24 h for incubation. At the end of this time, it was incorporated into 7.5 mL of a solution of alginate prepared with 0.2 g of sodium alginate and water. The mixture was stirred until homogeneous solution was obtained and then was added dropwise into 5 mL of 0.1 M CaCl_2 solution. This was then decanted to separate the alginate beads of 3 mm diameter size.

The OP hydrolysates were fermented to produce ethanol. For this purpose, the effect of immobilizing the yeast on the ethanol yield was evaluated first. To do so, fermentations with and without immobilized yeast were conducted. For the latter experiment, the hydrolysates obtained as described previously at 160 °C, 600 kPa, 350 rpm, and 30 min were reduced by heating to a concentration of 50 g/L of RS; pH was adjusted to 5 with 0.1 M HCl or NaOH solution, and then was sterilized. Approximately 25 mL of this solution was fermented with yeast immobilized on alginate beads prepared as described in previous section. The fermentation without immobilized yeast was done by mixing 2.5 mL of yeast solution resulting from incubation and 25 mL of sterile hydrolysate solution. Both experiments were performed at 30 °C during 48 h and a stirring rate of 150 rpm in closed flasks.

RESULTS AND DISCUSSION

Hydrolysis

The effect of temperature on RS yield was studied by treating OP at temperature range of 120 to 180 °C at 1000 kPa. In Fig. 1, it can be observed that increasing reaction temperature from 120 to 160 °C leads to higher yields of RS. Nevertheless, this effect is not remarkable above 160 °C and 30 min of reaction.

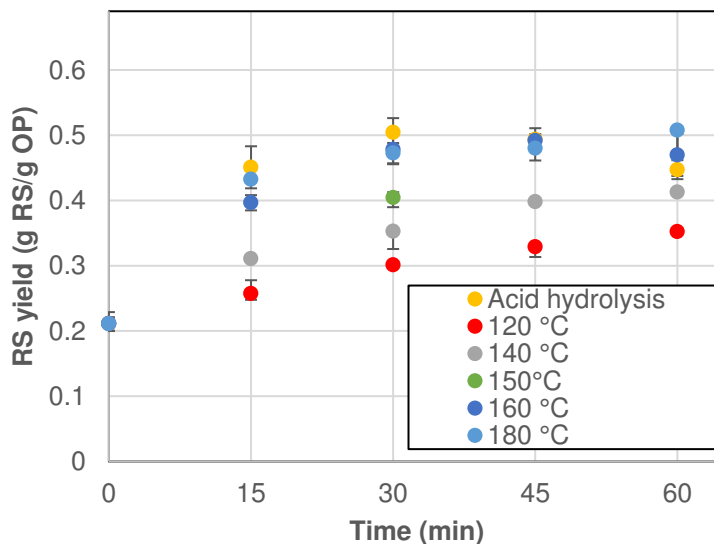


Fig. 1. Temperature effect on RS yield during thermal hydrolysis and comparison with acid hydrolysis

For reference purposes, the obtained results under acidic conditions are also included. It is worth noting that the maximum yield obtained under acidic conditions was practically the same with those at 160 °C and 180 °C. In the acid hydrolysis, the RS yield decreased after 30 min because of the degradation of sugars derived from the reaction into HMF or acids (Oberoi *et al.* 2010; Hu *et al.* 2013). Nevertheless, the increased glucose yield in hydrolysate resulted in a substantial increase in ethanol concentration, as *S. cerevisiae* is a hexose fermenting yeast. Although high temperatures produce higher RS yields than low temperatures, 130 °C was sufficient to produce a high glucose content in the hydrolysate, according to HPLC analysis (Fig. 2). Acid hydrolysis at temperatures higher than 130 °C resulted in production of inhibitory compounds like HMF formed *via* degradation of hexose sugars.

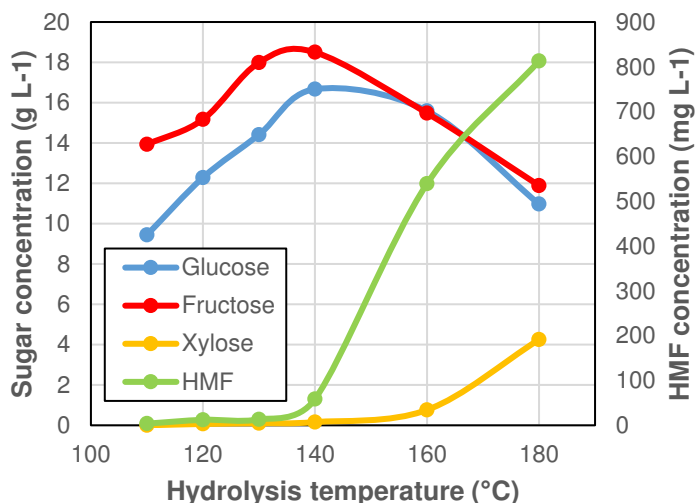


Fig. 2. Temperature effect on glucose, fructose, xylose, and HMF concentrations at the end of thermal hydrolysis (30 min, 600 kPa, and 350 rpm)

Furthermore, IR-ATR spectra of the solids were obtained before and after hydrolysis (spectra not shown). There was a change in the material's chemical structure with increasing *T*. At 120 and 140 °C, the band intensity at 1200 to 900 cm⁻¹, attributed to a glycosidic structure, increased because of the breaking of the structure of the polymer to smaller units of oligosaccharides or glycosidic units. The C-O-C stretch and C-H bend peaks at 1105 and 1026 cm⁻¹, respectively, became more prominent compared with the untreated OP. In contrast, the analysis of the solid obtained after hydrolysis at 160 and 180 °C showed that the intensities of the peaks corresponding to the O-H bond at 3300, 1450, 1344, and 1240 cm⁻¹ as well as the peak from the C-O-C bond at 1050 cm⁻¹, decreased drastically. Those peaks at 1050, 2880, and 2950 cm⁻¹ that were still present were also observed in the IR-spectrum of the cellulose standard. Hence, at these *P* and *T* conditions, it was assumed that some cellulose, primarily the amorphous structure, was degraded, but not entirely. The results also revealed the interaction of hemicellulose and pectin, which was also solubilized according to the RS yield levels (Zakzeski *et al.* 2012).

Based on the above results, it can be understood that 160 °C and 30 min were the conditions under which cellulose was hydrolyzed. Therefore, the pressure effect was studied at this temperature.

Figure 3a presents the P effect on RS yield during the thermal hydrolysis at 160 °C for 30 min. The method currently being used to discriminate among the means was ANOVA procedure. According to this method, there were no statistically significant differences between 1000, 800, and 600 kPa with a confidence level of 95%.

When the P effect on sugar yield was studied for other biomass types, it resulted in higher RS yields when the pressure was increased. This was attributed to the enhanced penetrability of water into the inner part of biomass, crystallinity changes, particle size reduction, or structure damage occurring at high pressure (Castañón-Rodríguez *et al.* 2013; Jin *et al.* 2015).

In this case, the positive effect of pressure when operated at values higher than 500 kPa can be ascribed to the physical state changes and acidity of water. According to the thermodynamic water phase diagram, water changes from vapor (at pressure of 500 kPa and 160 °C) to liquid state (pressure higher than 500 kPa and 160 °C). Therefore, at 500 kPa, the contact between the OP and water was not favored, which negatively affected the hydrolysis reaction yield. In addition, the acidity constant of water is smaller at 500 kPa than when pressure was increased. Because there were no significant differences between 600 and 1000 kPa, a pressure of 600 kPa was chosen to analyze the effect of the other variables on the RS yield during hydrolysis of OP.

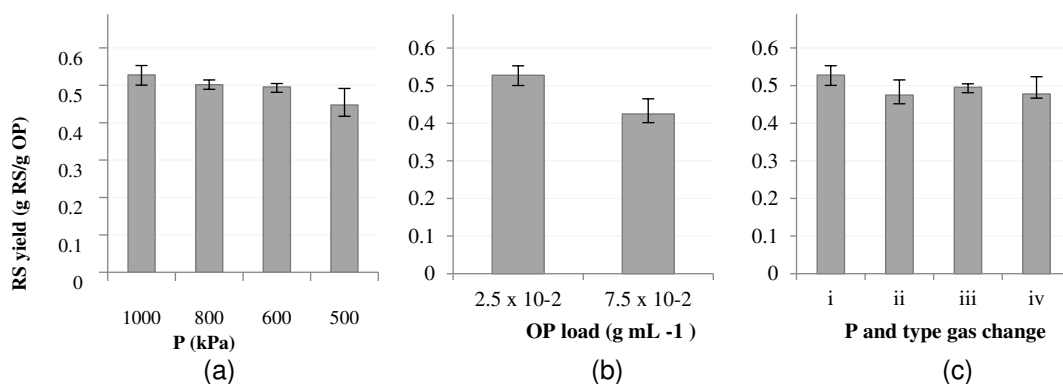


Fig. 3. Effect of a) P with 2.5×10^{-2} g/mL of OP, b) OP load at 1000 kPa, and c) Gas type with 2.5×10^{-2} g/mL of OP: i) 1000 kPa-N₂, ii) 1000 kPa-CO₂, iii) 600 kPa-N₂, iv) 600 kPa-CO₂ on RS yield during thermal hydrolysis at 160 °C, 350 rpm, and 30 min

The effect of OP loading on RS yield was studied at two values, 2.5×10^{-2} and 7.5×10^{-2} g/mL. When the OP load was increased, RS yield decreased by 6% (Fig. 3b). Thermal hydrolysis reaction is based on H₃O⁺ ions from water, which react with the β -1,4-glycosidic bond of the polymer. Decreasing the ratio H₂O/OP would result in smaller quantity of these ions and therefore reduced RS yield. Nevertheless, an ANOVA statistical analysis was applied, and it was concluded that there was no significant difference with changing OP loading, with a confidence level of 95%.

Two gases, CO₂ and N₂, were used to conduct the hydrolysis reaction. CO₂ gas was considered for use to increase the acidity of solution and consequently to increase the RS yield. Results are shown in Fig. 3c. According to Fisher's least significant difference (LSD) procedure, there were no significant differences observed in this case. It was likely that at 160 °C and 600 or 1000 kPa, the amount of H₃O⁺ and H₂CO₃ were not sufficient enough to improve the RS yield (Narayanaswamy *et al.* 2011), unlike a previous report (Zhang and Wu 2014), where CO₂ positively affected glucose yield when using sugarcane bagasse as the raw material. In this case, the pH of the H₂O - CO₂ mixture decreased from 4.1 with N₂

to 3.9 with CO₂. Hence, as reported by Rogalinski *et al.* (2008), the obtained results of RS yield were not surprising because a decrease in pH was not observed. It is worth pointing out that a pH value of 2.0 or less is caused by the addition of sulfuric acid when acid hydrolysis was applied.

Fermentation

From the perspective of increasing ethanol yield, it is effective to immobilize yeast in alginate beads, as 80% ethanol yield (EY) (EY- based on theoretical ethanol yield from RS initial concentration) can be attained. This represents a noticeable effect, as only a 35.5% of EY was obtained without immobilized yeast. This can be ascribed to a greater tolerance to ethanol concentration in the medium and a higher concentration of yeast units inside the beads (Shuvashish and Chandra 2010; Lee *et al.* 2011). Therefore, the OP hydrolysates were fermented using yeast immobilized in alginate beads.

The OP hydrolysates were fermented to determine ethanol yield in g per L of hydrolysate and g of ethanol per g of OP. The results are shown in Table 1.

Table 1. Results of the Fermentation of OP Hydrolysates: Effect of the Hydrolysis Reaction Temperature (T_R) on Ethanol Yield (EY) per Unit Substrate Consumed

Parameters	Pressure reactor conditions					Autoclave	Acid hydrolysis in autoclave
	120	130	140	160	180		
T_R (°C)	120	130	140	160	180	120	120
t_R (h)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
t_S (h)	0.816	0.85	0.883	0.95	1.016	0.75	0.75
Hydrolysis energy (kWh)	1.407	1.466	1.523	1.638	1.752	1.495	1.495
EY g/L	33.14	29.04	13.89	20.20	5.68	28.09	6.31
EY g per g OP	0.166	0.145	0.139	0.101	0.056	0.140	0.063
* t_R reaction time t_S total time in which reactor or autoclave were on							

There was no significant difference at 130, 140, or 120 °C in the autoclave, but at 120 °C in the reactor, there was, with a confidence level of 99% using Duncan's test. In addition, energy consumption at 120 °C in the pressure reactor was less than that in the autoclave. Heating time, fermentation time, and reactor size directly affect energy consumption. However, other factors, such as the cost of equipment, availability, feasibility of large-scale operation, useful life, and maintenance costs are also parameters requiring investigation. The addition of nutrients and reagents to adjust pH prior to fermentation and the type of microorganism also affect the overall process cost. The aim of this study was to analyze the effect of different variables on AR and ethanol yield. It was found that thermal hydrolysis at 130 °C produced more glucose and fructose, and inhibitors were present in a minimum concentration. The results of the fermentation confirm that the presence of inhibitors was an important factor. A temperature of 120 °C was found to be the most convenient because an ethanol production of 33.14 g/L of OP with 1.407 kWh consumed during hydrolysis was achieved. Grohmann *et al.* (1995), using an acid pretreatment and enzymatic hydrolysis with cellulolytic and pectinolytic enzymes, reported

an ethanol production of 38 g/L. Oberoi *et al.* (2010) reported a value of 50.55 g/L using a two-stage acid hydrolysis. Santi *et al.* (2014) achieved an ethanol yield of 15 g/L by acid pretreatment of citrus waste with a novel scaled reactor of steam injection at 180 °C and 150 s, and fermentation with an industrial *S. cerevisiae* strain. Pourbafrani *et al.* (2010) reported an ethanol yield of 0.037 g/L using diluted acid and enzymatic hydrolysis at 150 °C compared with 0.166 g/g reported in this study. Thus, it is important to highlight that the results obtained through the present study are promising because a value of ethanol yield among the above mentioned was obtained. Secondly, it has been shown that a *T* of 120 °C is sufficient to obtain the required reducing sugars to be fermented and no nutrients were added to hydrolysates prior to fermentation. Also, only one hydrolysis step was applied and fermentation was conducted with Baker's yeast immobilized on alginate beads, offering the option to reuse them.

CONCLUSIONS

1. The RS yield was positively affected by hydrolysis temperature. However, the inhibitor concentration also increased. The glucose and fructose concentration were highest at 130 °C, and the ethanol yield was highest with thermal hydrolysis at 120 °C. The effects of pressure, OP loading, and gas type on RS yield were negligible.
2. Immobilization of yeast onto alginate beads increased the ethanol yield to 44.5%, no extra nutrients were needed, and ethanol production attained the maximum value of 33.14 g/L. Therefore, the proposed process represents a valid and encouraging alternative for the production of ethanol.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support for Ph.D candidate Iván García Orozco, M. Sc. candidate Alejandra Nuñez Pineda, and M. Sc. candidate Lizbeth Triana Cruz from CCIQS UAEM-UNAM is gratefully acknowledged. The CONACyT support is also appreciated, and María Citlalit Martínez Soto is acknowledged for technical support.

REFERENCES CITED

- A.O.A.C. (1998). *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists*, 16th edition, Washington, DC.
- Balat, M. (2011). "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review," *Energy Convers. Manage.* 52(2), 858-875. DOI: 10.1016/j.enconman.2010.08.013
- Castañón-Rodríguez, J. F., Torrestiana-Sánchez, B., Montero-Lagunes, M., Portilla-Arias, J., Ramírez de León, J. A., and Aguilar-Uscanga, M. G. (2013). "Using high pressure processing (HPP) to pretreat sugarcane bagasse," *Carbohydr. Polym.* 98, 1018-1024. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.06.068

- Ghorbanpour Khamseh, A. A., and Miccio, M. (2012). "Comparison of batch, fed-batch and continuous well-mixed reactors for enzymatic hydrolysis of orange peel wastes," *Process Biochem.* 47, 1588-1594. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.10.018
- Grohmann, K., Cameron, R. G., and Buslig, B. S. (1995). "Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis," *Bioresour. Technol.* 54(2), 129-141. DOI: 10.1016/0960-8524(95)00121-2
- Hu, X., Wu, L., Wang, Y., Song, Y., Mourant, D., and Gunawan, R. (2013). "Acid-catalyzed conversion of mono- and poly-sugars into platform chemicals: Effects of molecular structure of sugar substrate," *Bioresour. Technol.* 133, 469-474. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.080
- Jin, S., Zhang, G., Zhang, P., Fan, S., and Li, F. (2015). "High-pressure homogenization pretreatment of four different lignocellulosic biomass for enhancing enzymatic digestibility," *Bioresour. Technol.* 181, 270-274. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.069
- Lee, J.-W., and Jeffries, T. W. (2011). "Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors," *Bioresour. Technol.* 102(10), 5884-5890. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.048
- Lee, K. H., Choi, I. S., Kim, Y.-G., Yang, D.-J., and Bae, H.-J. (2011). "Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads," *Bioresour. Technol.* 102(17), 8191-8198. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.06.063
- Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar," *Anal. Chem.* 31(3), 426-428. DOI: 10.1021/ac60147a030
- Narayanaswamy, N., Faik, A., Goetz, D. J., and Gu, T. (2011). "Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production," *Bioresour. Technol.* 102(13), 6995-7000. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.052
- Oberoi, H. S., Vadlani, P. V., and Madl, R. L. (2010). "Ethanol production from orange peels: Two-stage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through experimental design," *J. Agric. Food Chem.* 58(6), 3422-3429. DOI: 10.1021/jf903163t
- Pourbafrani, M., Forgács, G., Horváth, I. S., Niklasson, C., and Taherzadeh, M. J. (2010). "Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes," *Bioresour. Technol.* 101(11), 4246-4250. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.077
- Prado, J. M., Forster-Carneiro, T., Rostagno, M. A., Follegatti-Romero, L. A., Maugeri Filho, F., and Meireles, M. A. A. (2014). "Obtaining sugars from coconut husk, defatted grape seed, and pressed palm fiber by hydrolysis with subcritical water," *J. Supercrit. Fluids* 89, 89-98. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.02.017
- Rezzadori, K., Benedetti, S., and Amante, E. R. (2012). "Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products," *Food Bioprod. Process.* 90, 606-614. DOI: 10.1016/j.fbp.2012.06.002
- Rogalinski, T., Ingram, T., and Brunner, G. (2008). "Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures," *J. Supercrit. Fluids.* 47(1), 54-63. DOI: 10.1016/j.supflu.2008.05.003
- Santi, G., Crognale, S., D'Annibale, A., Petruccioli, M., Ruzzi, M., and Valentini, R. (2014). "Orange peel pretreatment in a novel lab-scale direct steam-injection apparatus for ethanol production," *Biomass Bioenerg.* 61, 146-156. DOI: 10.1016/j.biombioe.2013.12.007

- Shuvashish Behera, R. C. M., and Chandra Ray, R. (2010). "Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*," *Appl. Energ.* 87(7), 2352-2355. DOI: 10.1007/s13213-010-0160-y
- Singh, A., Sharma, P., Saran, A. K., Singh, N., and Bishnoi, N. R. (2013). "Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices," *Renew. Energ.* 50, 488-493. DOI: 10.1016/j.renene.2012.07.003
- Sudhakar, D. V., and Maini, S. B. (2000). "Isolation and characterization of mango peel pectins," *J. Food Process. Preserv.* 24(3), 209-227. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2000.tb00414.
- Sukhbaatar, B., Hassan, E. B., Kim, M., Steele, P., and Ingram, L. (2014). "Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses," *Carbohydr. Polym.* 101, 196-202. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.09.027
- Sun, Y., and Cheng, J. (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review," *Bioresour. Technol.* 83(1), 1-11. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7
- Widmer, W., Zhou, W., and Grohmann, K. (2010). "Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation," *Bioresour. Technol.* 101(14), 5242-5249. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.038
- Yoon, S. Y., Han, S. H., and Shin, S. J. (2014). "The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose," *Energy* 77, 19-24. DOI: 10.1016/j.energy.2014.01.104
- Zakzeski, J., Grisel, R. J. Smit, A. T., and Weckhuysen, B. M. (2012). "Solid acid-catalyzed cellulose hydrolysis monitored by *in situ* ATR-IR spectroscopy," *ChemSusChem* 5(2), 430-437. DOI: 10.1002/cssc.201100631
- Zhang, H., and Wu, S. (2014). "Enhanced enzymatic cellulose hydrolysis by subcritical carbon dioxide pretreatment of sugarcane bagasse," *Bioresour. Technol.* 158, 161-165. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.02.030

Article submitted: September 21, 2016; Peer review completed: January 21, 2017;
Revised version received: February 8, 2017; Accepted: February 9, 2017; Published:
March 1, 2017.
DOI: 10.15376/biores.12.2.2955-2964

Segundo artículo

Submission Confirmation

Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers <eesserver@eesmail.elsevier.com>

vie 04/08/2017 06:52 p.m.

Para: br8enda@hotmail.com <br8enda@hotmail.com>;

Cc: groam@uaemex.mx <groam@uaemex.mx>; reynanr@gmail.com <reynanr@gmail.com>; patbh2003@yahoo.com.mx <patbh2003@yahoo.com.mx>;

Review Article

Dear br8enda,

We have received your article "Fermentation using *Saccharomyces Cerevisiae* to produce bioethanol: Recent improvements" for consideration for publication in Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://ees.elsevier.com/jtice/>
2. Enter these login details:
Your username is: br8enda@hotmail.com

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/jtice/automail_query.asp

3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Fermentation using *Saccharomyces Cerevisiae* to produce bioethanol: Recent improvements

Corona Vázquez Brenda ^a, Roa-Morales Gabriela ^{a,*}, Natividad Reyna ^a, Balderas-Hernández Patricia ^a

^a Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca-Atlacomulco Km. 14.5, Toluca, Estado de México, 50200, México.

*Corresponding author. E-mail address: groam@uaemex.mx

Abstract

Bioethanol production has become a relevant issue today due to the importance of applications when proposing solutions for obtaining fuels that attain the reduction of greenhouse effect, besides research related to the subject is very broad and involves several aspects such as raw material, hydrolysis process, purification of the product and the fermentation process. This work analyzes this step focusing on the microorganism chosen by excellence: *Saccharomyces Cerevisiae* and reviewing the latest improvements and proposals that have been made to the process.

Keywords: fermentation, *S. Cerevisiae*, bioethanol

Highlights

Improvements to the fermentation process are mentioned within the areas of nutrients addition, immobilization and bioengineering.

Fermentation techniques and strategies are described and analyzed.

Add value products of fermentation process and its applications are mentioned

Introduction

In recent years, due to the energy crisis and the uncontrollable increasing environmental pollution, the use of biofuels is promoted. Within these, bioethanol plays an important role

because it can be used pure or in combination with gasoline reducing greenhouse gas emissions. Mainly used in cars or light vehicles with some system adjustments and its production is widely known. It can be carried out from a variety of raw materials which sugar content is high. To date, numerous resources have been investigated for bioethanol production, and can be classified into sugars, starch and lignocellulosic biomass. Conversion of raw material into bioethanol varies considerably depending on the nature of feedstock. In general, process consist of a serie of steps: pretreatment, hydrolysis and fermentation. It is mainly obtained from corn and sugarcane, however, due to competition between food and energy source, other sources such as fruit peels, cereals, waste paper, agricultural residues, flowers and recently algae have been studied [(22, 26, 28, 31, 48, 118)]

Previously the advantages and disadvantages of pretreatments have been analyzed, also the process of hydrolysis has been described in other studies and deepened in some type of this, nevertheless, in this review, it was decided to analyze the fermentation process to mention the last improvements to reduce costs, time and increase yields. In addition, due to the fermentation step is very complex (119), we desired to understand the process better facilitating the choice of required conditions for a specific process and thus improving its efficiency, focusing on *Saccharomyces Cerevisiae* as microorganism which has been used for bioethanol fermentation traditionally and has been proved to be very robust or high resistance to stress conditions (pH, osmolality, temperature), it has rapid growth and well suited to the fermentation of different hydrolysates. It transforms glucose into ethanol however other microorganisms are mentioned as follows: *Zymomonas mobilis*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobium brockii*, *Sarcina Ventriculi*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* and *Rominococcus albus*; fungus like *Aspergillus spp*; *Fusarium spp.* or *Penicillum spp.* and yeast like *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida Iusitaniaeae* and *Kluyveromyces marxianus*. In case of conversion process from xylose to ethanol bacteria like *Bacillus macerans*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Aerobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus polymixa*, *Aerobacter indologenes*; fungus like *Fusarium oxysporum*, *Monilia spp*; *Mucos spp*; *Neurospora spp*; *Pacilomyces spp*; *Polyporus spp*;

Rhizopus spp. and yeast like *Brettanomyces spp.*; *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* (120)

Fermentation process consists of transformation of components in the supernatant obtained from raw material pretreatment or hydrolysis steps and which can contain hexoses and pentoses sugars, depending on the source but the hydrolysate typically consists of glucose, xylose, arabinose, galactose, mannose, fructose, and rhamnose (6, 120, 121). This sugars are transformed into bioethanol by metabolic routes of the microorganism. Depending of this, bioethanol can be obtained or another value add product like organic acids, resins or biogases (101, 122-124).

Anaerobic fermentation can be used to produce high added-value products from biomasses, including organic waste. The carbon sources commonly used for this purpose are mainly rich in proteins, lipids, and carbohydrates. (124-128)

There are multiple added-value products and then applications (129) (See Table 1). For example, n-caproic acid as follows: antimicrobial agent (130, 131), additive in animal feed for poultry and pigs (132, 133), flavor additive in the food industry (134, 135), feedstock for the chemical industry (136-138), and a possible precursor in production of biofuels (139, 140) Other examples are lactic acid or d-psicose (141, 142).

Bioethanol fermentation can be described in terms of their performance parameters like temperature range, pH range, alcohol tolerance, growth rate, productivity, osmotic tolerance, specificity, yield, genetic stability and inhibitor tolerance. There are different fermentation techniques and strategies that are described below (92, 129, 143, 144). Fig. 1

Table 1. Added-Value Products from lignocellulosic materials

Microorganism	Raw Material	Added-value product	Reference
<i>Kluyveromyces</i>	Sugarcane	Fruity-odor	(145)
<i>Marxianus</i>	bagasse/sugar molasses mixture	beet	
<i>Klebsiella</i>	Bagasse	2,3-butanediol	(146)
<i>Pneumoniae</i>			
<i>Clostridium</i>	Molasse	Biohydrogen	(147)

<i>Butyricum</i>			
<i>Ralstonia</i>	Bagasse	Polyhydroxyalkanoates (PHA)	(114)
<i>Eutropha</i>			
<i>Flammulina</i>	soybean	Antioxidant	(148)
<i>Velutipes</i>			
<i>Aspergillus</i>	<i>Jatropha curcas</i> residue	Protease	(149)
<i>Oryzae</i>			
<i>Yarrowia</i>	Olive mill wastewater	Oleic acid	(150)
<i>Lipolytica</i>			
<i>Fibrobacter</i>	Orange peel	Succinic acid	(151)
<i>Succinogenes</i>			
<i>A. Viridans</i>	Pineapple peel	Lactic acid	(152)
<i>Comomonas sp.</i>	Sugarcane tops	Poly-3-hydroxybutyrate (PHB)	(153)
<i>Candida Tropicalis IEC5-ITV</i>			
<i>Candida</i>	Bagasse	Xylitol	(115)

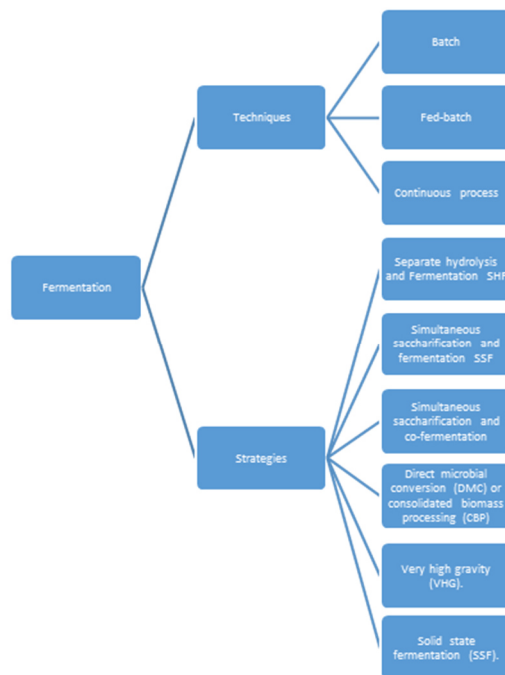


Fig. 1 Fermentation processes: Techniques and Strategies

Fermentation techniques

Fermentation can be performed as a batch, fed-batch or continuous process. Batch culture can be considered as a closed culture system which contains an initial and limited amount of nutrients, which is inoculated with microorganisms to allow the fermentation. It is a very simple method, during the fermentation nothing is added after inoculation except possibly acid or alkali for pH control or air for aerobic fermentations. Fed-batch reactors are widely used in industrial applications because they combine the advantages from both batch and continuous processes. The major advantage of fed-batch, comparing to batch, is the ability to increase maximum viable cell concentration, prolong culture lifetime and allow product accumulation to a higher concentration. This process allows for the maintenance of critical process variables (e.g. temperature, pH, and dissolved oxygen) at specific levels through feedback control. It is possible to apply different feeding rates and to control nutrients added. In the continuous process, feed, which contains substrate, culture medium and nutrients, is pumped continuously into an agitated vessel where the microorganisms are active. Consists of constantly feeding a culture medium under a constant flow rate with the maintenance of the reaction volume through removal of the fermented juice. The product contains bioethanol, cells, and residual sugar. This process presents greater fermentation capacity, lower costs, leads to uniform fermentation broth and allow the implementation of automatic systems.

A great advance in the process is the recycle of cell. Yeast is subjected to a decontamination process and may be recycled 400–600 times depending on yeast cell viability and bacterial contamination [(154, 155)

Hydrolysis and fermentation strategies

Separate hydrolysis and fermentation (SHF). Is a two-step process where hydrolysis is performed separately from fermentation step. Liquid flow from hydrolysis reactor enters the fermentation reactor. The advantage of SHF is the ability to carry out each step under optimal conditions (156). The process is carried out without washing of pretreated biomass, detoxification and nutrient supplementation so the disadvantage is the production of inhibitors like *acetic acid*, *lactic acid*, propionic acid, citric acid, succinic acid and

glycerol. The inhibition effect of these compounds was studied through ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and was resulted that an increasing concentration of the secondary metabolites led to longer lag time and a reduction of cell growth (157, 158).

Simultaneous saccharification and fermentation (SSF). Is a process that requires compatible fermentation and saccharification conditions, with a similar pH, temperature and optimum substrate concentration, typically controlled at pH 4.5 and 310 K. The saccharification and the subsequent fermentation of the sugars to ethanol by yeast take place in the same vessel. This process has an enhanced rate of hydrolysis due to removal of end product inhibition, needs lower enzyme loading, results in higher bioethanol yields, lower requirements for sterile conditions, shorter process time and less reactor volume (156). For example, El dalatony (2017), obtained an ethanol yield of 88.2% with SSF compared with a value of 72% using SHF for fermentation of a solution of a Mexican algae (159).

Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF). Is an option for ethanol production from xylose-rich lignocellulosic materials. Simultaneous saccharification of cellulose and hemicellulose and co-fermentation of end products glucose and xylose is reported to be carried out by genetically engineered microbes. SSCF increases ethanol yield and productivity in broth by reducing end-products inhibition and affording higher solid loading.

Direct microbial conversion (DMC) or consolidated biomass processing (CBP) combines cellulase production, cellulose hydrolysis and glucose fermentation into a single step. It requires a microbial culture that combines properties related to both substrate utilization and product formation. This process is attractive because it reduces the number of reactors, simplifies operation, and reduces the cost of chemicals (3). In addition, the use of thermophilic organisms support the possibility of realizing higher hydrolysis (120).

Very high gravity (VHG). This fermentation is applied to increase both the fermentation rate and final ethanol yield in a fermentation broth. It involves preparation of media containing at least 25% (w/v) of dissolved solids and produces ethanol at concentrations greater than 15% (v/v). However, this application can cause negative effects on yeast cells due to high osmotic pressure. It was reported that sufficient nitrogen can prevent it and promotes sugar utilization.

Bioethanol is produced under anaerobic conditions, however, appropriate aeration coupled with agitation, especially at the beginning of yeast growth, can markedly improve ethanol production because ergosterol production is increased and then ethanol tolerance, which might be due to increased membrane rigidity induced by ergosterol (160).

Solid state fermentation (SSF). It holds growth of microorganisms on moist solid substrates in the absence of free-flowing water. It provides the natural habitat for the growth of microorganisms on surface of solid material (or substrate). The advantages are higher fermentation capacity, higher end-product stability, lower catabolic repression and contamination risk and cost-effective technology. The drawback is that the operating conditions cannot be optimized for both steps simultaneously (118, 161).

The best strategy for a certain process principally depends on type sugar content of raw material, chemicals, time and infrastructure available but in general SSCF is the most appropriate strategy. Some other factors involved to have a process with low cost and high performance are the pH, for which a value has been established around a value of 5 as the most favorable for obtaining high yields of ethanol, pH above 6.5 produces acetate. Another variable is temperature, there are mesophilic microorganisms (optimum temperature $< 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) or thermophiles ($> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$). *S. cerevisiae* gives high yields of ethanol at a T of $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Physical variables such as agitation or for example sonication that in one case improved up 10 times the yield [(82), ultrasound (83), and the nutrients added to the solution to be fermented. For example, the use leftover food as nutrients during the SFF to reduce costs (162)].

Fermentation processes previously described can be carried out with high efficiencies as long as nutritional conditions are provided so that their metabolic is adequate. So the importance of adding nutrients is explained below.

Addition of nutrients

Addition of a single nutrient such as magnesium sulfate (MgSO_4), ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) or Lalanine ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$) are known to increase yield of bioethanol from sugar fermentation. Magnesium ion protects yeast cells from ethanol and temperature-induced stress by preventing the increase

in cell membrane permeability. Also act as an activator of some enzymes. Other nutrients like $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and MgSO_4 are also important. The sulphur composition in the form of $(\text{SO}_4)^{-2}$ can be utilized as the source of nutrient. In general, the addition of nutrients improve ethanol production however could be differences may be due to the different type of raw material used for fermentation [(163)].

Comelli (2016) studied that the media composition has an impact on ethanol yield and the overall process economics. This research was to develop a low-cost mineral-based supplement for alcoholic fermentation in an attempt to provide an economically feasible alternative to produce bioethanol. A mix of salts (164) was found to be optimal. It led to the complete fermentation of the sugars in less than 12 h. The ethanol yields were close to those obtained when yeast extract was used as the supplement, but the optimized mineral-based medium was six times cheaper, which favorably impacts the process economics and makes the supplement more attractive from an industrial viewpoint (164).

The addition of nutrients can be performed by an immobilization process with good results. In general immobilization confers several advantages so is briefly described.

Immobilization

Yeast immobilization improved product yield due to better ethanol tolerance and major cell activity. Using immobilized cells is advantageous over free cell due to enhanced yield, ease to separate cell mass from the bulk liquid, reduced risk of contamination, better operational stability and cell viability for several cycles of operations, enhanced substrate utilization and fermentation productivity, feasibility of continuous processing, lower cost of recovery, downstream processing and protection of cells against shear force, less susceptible to the effect of inhibitory compounds and nutrient depletion.

There are 4 immobilization techniques: (a) surface adsorption of a carrier or solid material (for example cellulose) where the biocatalyst or microorganism is attached by ionic or covalent bonds, biospecific coupling or by adsorption to a carrier insoluble in water, (b) entrapment in a porous matrix (eg alginate) where the cells penetrate the matrix until their mobility is obstructed by other cells, or the material is formed in situ with the culture medium. The cells are in a rigid medium to prevent their diffusion to the surroundings but there is also a transfer of nutrients and metabolites, (c) flocculation naturally or with

artificially induced crosslinking, where flocculation is defined as aggregation of cells to form a long unit that sediments or precipitates rapidly and (d) cell containment behind a barrier such as a microporous membrane or in a microcapsule [(88).

Among the different immobilization technologies, entrapment of microbial cells within the polymeric matrices such as agar agar, calcium alginate, gelatin, k-carrageenan, etc. have been studied widely. Two most suitable carriers for cell immobilization are entrapment in calcium alginate bead and agar agar cubes, because these techniques are simple, cost effective and nontoxic [(165).

An improvement to the yeast immobilization process with alginate beads is the regeneration of beads. Before reutilization, beads are suspended in yeast broth for 12 h after each cycle to allow for reactivation, supplied with vitamins and microelements in this period, the yeast cells regained their integrity and catalytic efficiency in terms of cell multiplication, production of enzymes, and metabolic activities [(159).

Biofilms are natural forms of cell immobilization, microbial cells are attached on solid surfaces or support materials to form the biofilms. These allow to have higher concentration of microorganisms that improve the yield of the reaction. In the case of the fermentation a yield of 2.14 g/L/h, 24 g/L and 12 h of reaction was obtained, a small time compared with others greater than 24 h [(129).

Mulko (2016), proved with macroporous hydrogels. Matrices were produced by in-situ polymerization of acrylamide around a live yeast suspension under cryogelation conditions. Similar ethanol yield and productivity than free yeasts were obtained but larger than those reached with yeasts immobilized in compact hydrogels. Five reaction cycles were able and process conditions were 42 °C and 90h (166).

Kuruvilla (2013) compared Cells either entrapped in alginate beads or Lentikat[®] discs or immobilized as a biofilm on spent grains, Leca, or reticulated foam to identify the most suitable immobilization technique in terms of bioethanol yield and longevity of the immobilized cell system. Cell entrapment in alginate beads and Lentikat[®] discs resulted in significantly higher bioethanol yields compared to when cells were free in suspension or immobilized as a biofilm on a support material (167)].

A novel yeast immobilization technique using renewable poly-L-lactic acid (PLLA) microtube array membrane (MTAM) was thoroughly evaluated for bioethanol

fermentation. PLLA-MTAM was shown to be stable in 15% (v/v) ethanol solution during shaking cultivation. A yeast encapsulation efficiency of 67–70% was obtained, and the yeasts in MTAMs with greater porosity showed greater bioethanol productivity. The MTAM-immobilized *Kluyveromyces marxianus*, prepared using *in situ* and siphon methods, were evaluated using 5% (w/v) glucose fermentation. Improved glucose consumption and bioethanol production were observed in batch bioethanol fermentation. In 7 cycles during repeated-batch fermentation, the immobilized yeasts enhanced bioethanol productivity [(168)].

Immobilization is an available technique that in general improve ethanol yield due to cell protection. According to data mining of metabolomic analysis in a study showed that several compounds such as trehalose, valine, inositol and proline contributed highly to ethanol tolerance. Accumulation of valine and reduction of inositol significantly enhance ethanol tolerance [(169)].

Another study determined that during fermentation, yeast membrane go through changes when it pass from lag phase to exponential and stationary phase. Ergosterol and oleic acid contents increase and authors propose that due to these acids are insaturated, fluidity membrane increase and ethanol enter more easily (170)].

Immobilization is effective in most cases nevertheless is necessary to consider that for an industrial process the cost of the material and the type or reactor are relevant.

Another area of improvements is bioengineering. Every day, technology gives new opportunities to create processes with genetically modified organisms. These although are complex they have proved to be very important due to achievements.

Engineered yeast

Engineered cells are genetic modified to improve consumption, reduce time reaction, produce another compound or use another metabolite.

For example, a systemic analysis was performed with *Saccharomyces cerevisiae* strains with variant phenotypes to construct strains with improved multi-stress tolerance. An improve of 10.55% of ethanol yield was reached also under increased heat and high gravity fermentation conditions (171).

Another option is to use genetically modified yeast enabled to xylose utilization [(144). Due to differences between the optimal temperature for cellulose activity in a SSF process thermotolerant strains are a solution for an efficient process. Advantages of processing at higher temperatures include a more-efficient simultaneous saccharification and fermentation, significant reduction of contamination and a continuous shift from fermentation to distillation (85).

In other study Tomoya (2011) improved ethanol production in the presence of fermentation inhibitors, such as acetic and formic acids through metabolic engineering successfully conferred resistance to weak acids in a recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain (172).

An engineered *S. cerevisiae* strain (EJ2) capable of fermenting cellobiose can also ferment lactose. Lactose is an inevitable byproduct of the dairy industry. In addition to cheese manufacturing, the growing Greek yogurt industry generates excess acid whey, which contains lactose (141).

Engineered cells allow producing value added products. For example D-psicose that can be made from D-fructose through a bioreaction using a microbial enzyme, epimerase. To achieve this goal, Song (2017) investigated the possibility of processing biosugars for dual production of bioethanol and D-psicose (142).

Other factors to take into account

Microbial contamination is one of the challenges for ethanol fermentation operations due to contaminants cause considerable economic losses until the system is completely cleaned. Therefore, microbial contamination needs to be controlled in bioethanol fermentation processing steps. Traditionally, nonbiological inhibitory agents and antibiotics have been implemented as contamination control agents in fermenters. The most commonly products used are the cell wall active antibiotic penicillin and the protein synthesis inhibitor virginiamycin. In the last years, using biodegradable products such as chitosan, curcumin (*Curcuma longa*) as carriers to efficiently deliver anti-microbial compounds against contaminant bacteria in bioethanol fermenters is an ideal improvement to control contamination with lower cost [(173)

Another point is ultrasound. It reduces fermentation process temperature and time, which eventually improves the energy utilization for sustainable production (Cynthia Ofori-Boateng, 2014) Besides increase the ethanol concentration (174).

Additionally, for industrial purposes, the use of flocculating yeasts is one of the most interesting ways to provide an increase of the efficiency of bioethanol production process as a significant reduction of capital costs is achieved with the elimination of centrifugation, making the process more competitive. The flocculation of yeast cells is a reversible, asexual and calcium-dependent process in which cells adhere to form flocs consisting of thousands of cells, the use of high cell density systems that present several advantages as reduced downstream processing costs, reuse of the biomass for extended periods of time, higher productivity, protection against ethanol stress and resistance to contamination by another microorganism. (85, 175).

Conclusion

Performance of bioethanol fermentation process using *S. Cerevisiae* can be improve modifying many factors like additions of nutrients, ultrasound, selection of fermentation strategy, immobilization or bioengineering cells. However, it is essential to point out that whatever the process is, bioethanol production needs to be considered as an industrial process and not just for research as climatic and economic problems continue to rise. Further is a process from which great advantages can be obtained as the production of biogas that can be used as energy in the same cycle or the production of value-added products.

Acknowledgments

Authors acknowledges CONACyT support.

References

1. Thangavelu SK, Ahmed AS, Ani FN. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016;56:820-35.
2. Rius de Riepen M, Mauricio CA. El consumo de energía en el siglo XXI http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/10/htm/sec_9.html1997
[

3. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy conversion and Management*. 2011:858-75.
4. Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012;38(4):522-50.
5. Menon V, Rao M. Trend in bioconversion of lignocellulose; Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012:1-29.
6. Shen DK, Gu S. The mechanism for thermal decomposition of cellulose and its main products. *Bioresource Technology*. 2009;100(24):6496-504.
7. Mamleev V, Bourbigot S, Yvon J. Kinetic analysis of the thermal decomposition of cellulose: The main step of mass loss. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2007;80(1):151-65.
8. Daorattanachai P, Viriya-empikul N, Laosiripojana N, Faungnawakij K. Effects of Kraft lignin on hydrolysis/dehydration of sugars, cellulosic and lignocellulosic biomass under hot compressed water. *Bioresour Technol*. 2013;144:504-12.
9. Yoon SY, Han SH, Shin SJ. The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. *Energy*. 2014;77(0):19-24.
10. García García JL. Ciencias de Joseleg [Internet]2015. [cited 2015 nov 10, 2015]. Available from: <http://cienciasdejoseleg.blogspot.mx/2015/01/la-lignina-como-material-de-sosten.html>.
11. Binod P, Singhu R, Singhania RR, Vikran S, Devi L, Nagalakshmi S, et al. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology*. 2010:4767-74.
12. Liu S-Y, Lin C-Y. Development and perspective of promising energy plants for bioethanol production in Taiwan. *Renewable Energy*. 2009, vol. 34:1902-7.
13. Polycarpou P. Bioethanol production from *Asphodelus aestivus*. *Renewable Energy*. 2009:2525-7.
14. Romao BB, Silva FBd, Resende MMd, Cardoso VL. Ethanol Production from the Soybean Molasses Hydrolysed. *Energy and Fuels*. 2012.
15. Binod P, Kuttiraja M, Archana M, Janu KU, Sindhu R, Sukumaran RK, et al. High temperature pretreatment and hydrolysis of cotton stalk for producing sugars for bioethanol production. *Fuel*. 2012:340-5.
16. Rabelo SC, Carrere H, R. Maciel Filho ACC. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in biorefactory concept. *Bioresource Technology*. 2011:7887-95.
17. Sassner P, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*. 2008:422-30.
18. Mohanty SK, Behera S, Swain MR, Ray RC. Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. *Applied Energy*. 2009:640-4.
19. Boluda Aguilar M, Vidal García L, Castañeda Gonzalez FdP, Gómez López A. Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2010:3506-13.
20. Rodriguez LA, Toro ME, Vazquez F, Daneri MLC, Gouiric SC, Vallejo MD. Bioethanol production from grape and suhar beet pomaces by solid-state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010:5914-7.

21. Ruangviriyachai C, Niwaswong C, Kosaikanon N, Chanthai S, Chaimart P. Pineapple Peel Waste for Bioethanol Production. 2010.
22. Deepa Shenoy AP, Vikas RK, Neeraja HS, Deeksha JS, Nayak C, Rao CV. A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. *Biomass and Energy*. 2011:4107-11.
23. Arredondo HIV, Colorado AAR, junior SDO. Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis. *Energy*. 2010:3081-7.
24. John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. Micro and macroalgal biomass; A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*. 2011:186-93.
25. Lee JW, Koo BW, Choi JW, Choi DH, Choi IG. Evaluation of waste mushroom logs as a potential biomass resource for the production of bioethanol. *Bioresource Technology*. 2008:2736-41.
26. Dubey Ak, Gupta PK, Garg N, Naithani S. Bioethanol production from waste paper acid pretreated hydrolyzate with xylose fermenting *Pichia stipitis*. *Carbohydrate Polymers*. 2012:825-9.
27. Mussatto S, Machado E, Martins S, Teixeira J. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues 2011. 661-72 p.
28. Hernandez CC, Lara SG, Saldivar SOS. Conversion into bioethanol of insect (*Sitophilus zeamais* Motschulsky), mold (*Aspergillus flavus* Link) and sprout-damaged maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Journal of Cereal Science*. 2012:1-12.
29. Kamei I, Hirota Y, Mori T, Hirai H, Meguro S, Kondo R. Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresource Technology*. 2012:137-42.
30. Uncu ON, Cekmecelioglu D. Cost effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology. *Waste Management*. 2011:636-43.
31. Arredondo Velásquez HI, Colorado Ruiz AA, Junior De Oliveira S. Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis. *Energy*. 2010:3081-7.
32. Chung BY, Lee JT, Bai HW, Kim UJ, Bae HJ, Wi SG, et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of poplar bark by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production. *Radiation Physics and Chemistry*. 2012.
33. Vucurovic VM, Razmovski RN. Sugar beet pulp as support for *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bioethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2012:128-34.
34. Pourbafrani M, Talebnia F, Niklasson C, Taherzadeh MJ. Protective Effect of Encapsulation in Fermentation of Limonene-contained Media and Orange Peel Hydrolyzate. *International Journal of Molecular Sciences*. 2007;8(8):777-87.
35. México SdIAyPd. Reporte especial naranja <http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100602-reporte-naranja.pdf> 2009 [
36. Fruit and tree nuts situation and outlook yearbook FTS2005 [Internet]. Department of Agriculture. Economic Research Service. 2005 [cited 28/feb/2006]. Available from: www.ers.usda.gov.
37. Widmer W, Zhou W, Grohmann K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 2010:5242-9.

38. Mejia CC, Gutierrez AJ, Halwagi ME. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection*. 2011.
39. Soresen A, Teller PJ, Hilstrom T, Ahring BK. Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pretreatment and enzymatic treatment. *Bioresource Technology*. 2008;6602-7.
40. Chen H, Qiu W. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnology Advances*. 2010;556-62.
41. Converti Attilio PP, Del Borgui Marco, Ferraiolo Giuseppe. Pretreatment Operations and Alcohol Fermentation of Orange Wastes. *JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING*. 1989;277-81.
42. Santi G, Crognale S, D'Annibale A, Petruccioli M, Ruzzi M, Valentini R, et al. Orange peel pretreatment in a novel lab-scale direct steam-injection apparatus for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2014;61(0):146-56.
43. Bicu I, Mustata F. Optimization of isolation of cellulose from orange peel using sodium hydroxide and chelating agents. *Carbohydrate Polymers*. 2013;98(1):341-8.
44. Monavari S, Galbe M, Zacchi G. Influence of impregnation with lactic acid on sugar yields from steam pretreatment of sugarcane bagasse and spruce, for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2011;3115-22.
45. Singh Oberoi H, Venkata Vadlani P, Madl RL. Ethanol Production from Orange Peels: Two-Stage Hydrolysis and Fermentation Studies Using Optimized Parameters through Experimental Design. *J Agric Food Chem*. 2010;3422-9.
46. Kotarska K, Świerczyńska A, Dziemianowicz W. Study on the decomposition of lignocellulosic biomass and subjecting it to alcoholic fermentation: Study on the decomposition of lignocellulosic biomass. *Renewable Energy*. 2015;75(0):389-94.
47. Jung YH, Kim IJ, Kim HK, Kim KH. Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2013;132(0):109-14.
48. Ruiz HA, Silva DP, Ruzene DS, Lima LF, Vicente AA, Teixeira JA. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain - Effect of process conditions. *Fuel*. 2012;95(1):528-36.
49. Abushammala H, Hashaikeh R. Enzymatic hydrolysis of cellulose and the use of TiO₂ nanoparticles to open up the cellulose structure. *Biomass and Bioenergy*. 2011.
50. Tanimu A, Jaenicke S, Alhooshani K. Heterogeneous catalysis in continuous flow microreactors: A review of methods and applications. *Chemical Engineering Journal*. 2017;327(Supplement C):792-821.
51. Tong DS, Xia X, Ping Luo X, Mei Wu L, Xiang Lin C, Hua Yu W. Catalytic hydrolysis of cellulose to reducing sugar over acid-activated montmorillonite catalysts. *Applied Clay Science*. 2012.
52. Suárez LMC. *Introducción a la Catálisis Heterogénea*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2002.
53. Tan IS, Lam MK, Lee KT. Hydrolysis of Macroalgae Using Heterogeneous Catalyst for Bioethanol Production. *Carbohydrate Polymers*. 2010.
54. Caia H, Changzhi L, Wanga A, Xua G, Zhang T. Zeolite-promoted hydrolysis of cellulose in ionic liquid, insight into the mutual behavior of zeolite, cellulose and ionic liquid. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2012;333-8.

55. Zhou L, Shi M, Cai Q, Wua L, Hua X, Yang X, et al. Hydrolysis of hemicellulose catalyzed by hierarchical H-USY zeolites – The role of acidity and pore structure. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013:54-9.
56. Marzo M, Gervasini A, Carniti P. Hydrolysis of disaccharides over solid acid catalysts under green conditions. *Carbohydrate Research*. 2012:23-31.
57. Yamaguchi D, Kitano M, Suganuma S, Nakajima K, Kato H, Hara M. Hydrolysis of Cellulose by a Solid Acid Catalyst under Optimal Reaction Conditions. *J Phys Chem*. 2009:3181-8.
58. Suganuma S, Nakajima K, Kitano M, Yamaguchi D, Kato H, Hayashi S, et al. Hydrolysis of Cellulose by Amorphous Carbon Bearing SO₃H, COOH, and OH Groups. *J AM CHEM SOC*. 2008:12787-93.
59. Zakzeski J, Ruud J. H G, Arjan TS, Weckhuysen BM. Solid Acid-Catalyzed Cellulose Hydrolysis Monitored by In Situ ATR-IR Spectroscopy. *ChemSusChem*. 2012:430-7.
60. Vandana S, Ashutosh T, Premlata K, Stuti T. Microwave-promoted hydrolysis of plant seed gums on alumina support. *Carbohydrate Research*. 2006.
61. Lourvanij K, Rorrer GL. Dehydration of glucose to organic acids in microporous pillared clay catalysts. *Applied Catalysis A: General*. 1994:147-65.
62. Besoain E. *Mineralogía de arcillas de suelos: Bib. Orton IICA / CATIE*; 1985.
63. Zhang H, Wu S. Enhanced enzymatic cellulose hydrolysis by subcritical carbon dioxide pretreatment of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 2014:161–5.
64. Narayanaswamy N, Faik A, Goetz DJ, Gu T. Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. 2011;102(13):6995-7000.
65. Won Lee J, W. Jeffries T. Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. *Bioresource Technology*. 2011;102:5884–90.
66. Rogalinski T, Ingram T, Brunner G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2008;47(1):54-63.
67. Ibbett R, Gaddipati S, Davies S, Hill S, Tucker G. The mechanisms of hydrothermal deconstruction of lignocellulose: New insights from thermal–analytical and complementary studies. *Bioresource Technology*. 2011;102(19):9272-8.
68. Santos ALF, Kawase KYF, Coelho GLV. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2011;56(3):277-82.
69. Fernández-Bolaños J, Felizón B, Heredia A, Rodríguez R, Guillén R, Jiménez A. Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*. 2001;79(1):53-61.
70. Cuevas M, García JF, Hodaifa G, Sánchez S. Oligosaccharides and sugars production from olive stones by autohydrolysis and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*. 2015;70(0):100-6.
71. Nabarlantz D, Ebringerová A, Montané D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 2007;69(1):20-8.

72. Batalha LAR, Han Q, Jameel H, Chang H-m, Colodette JL, Borges Gomes FJ. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. *Bioresource Technology*. 2015;180(0):97-105.
73. Buruiana C-T, Vizireanu C, Garrote G, Parajó JC. Optimization of corn stover biorefinery for coproduction of oligomers and second generation bioethanol using non-isothermal autohydrolysis. *Industrial Crops and Products*. 2014;54:32-9.
74. Relvas FM, Morais ARC, Bogel-Lukasik R. Kinetic modeling of hemicellulose-derived biomass hydrolysis under high pressure CO₂-H₂O mixture technology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2015;99(0):95-102.
75. Roque RMN, Baig MN, Leeke GA, Bowra S, Santos RCD. Study on sub-critical water mediated hydrolysis of *Miscanthus* a lignocellulosic biomass. *Resources, Conservation and Recycling*. 2012;59(0):43-6.
76. Boluda Aguilar M, Lopez Gomez A. Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*. 2013:188-97.
77. Cantero DA, Dolores Bermejo M, José Cocero M. High glucose selectivity in pressurized water hydrolysis of cellulose using ultra-fast reactors. *Bioresource Technology*. 2013;135(0):697-703.
78. Sasaki C, Sumimoto K, Asada C, Nakamura Y. Direct hydrolysis of cellulose to glucose using ultra-high temperature and pressure steam explosion. *Carbohydrate Polymers*. 2012;89(1):298-301.
79. Okuda N, Ninomiya K, Katakura Y, Shioya S. Strategies for reducing supplemental medium cost in bioethanol production from waste house wood hydrolysate by ethanologenic *Escherichia coli*: Inoculum Size Increase and cocultura with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2008:90-6.
80. Dionisi D, Anderson JA, Aulenta F, McCue A, Paton G. The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2015;90(3):366-83.
81. Hsu CL, Chang KS, Lai MZ, Chang TC, Chang YH, Jang HD. Pretreatment and hydrolysis of cellulosic agricultural wastes with a cellulase producing *Streptomyces* for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2011:1878-84.
82. Neel PI, Gedanken A, Schwarz R, Sendersky E. Mild sonication accelerates ethanol production by yeast fermentation. *Energy and Fuels*. 2012.
83. Werle LB, Garcia JC, Kuhn RC, Schwaab M, Foletto EL, Cancelier A, et al. Ultrasound-assisted acid hydrolysis of palm leaves (*Roystonea oleracea*) for production of fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*. 2013;45(0):128-32.
84. Wu KJ, Chang CF, Chang Js. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized bed and packed bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. *Process Biochemistry*. 2007:1165-71.
85. Ruiz HA, Silva DP, Ruzene DS, Lima LF, Vicente AA, Teixeira JA. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain - Effect of process conditions. *Fuel*. 2012:528-36.
86. Peinado RA, Moreno JJ, Villalba JM, González-Reyes JA, Ortega JM, Mauricio JC. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;40(1):79-84.

87. Wang HL, In Seong C, Young Gyu K, Duck Joo Y, Hyeun Jong B. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. *Bioresource Technology*. 2011;102:8191–8.
88. Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 2004;21(4):377-97.
89. Poreda A, Tuszyński T, Zdaniewicz M, Sroka P, Jakubowski M. Support materials for yeast immobilization affect the concentration of metal ions in the fermentation medium. *Journal of the Institute of Brewing*. 2013;119(3):164-71.
90. Zohar-Perez C, Chet I, Nussinovitch A. Unexpected distribution of immobilized microorganisms within alginate beads. *Biotechnol Bioeng*. 2004;88(5):671-4.
91. Behera Shuvashish, Shaktimay K, Rama Chandra M, Ramesh Chandra R. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. *Applied Energy*. 2010:96-100.
92. Bekatorou A, Koutinas AA, Kaliafas A, Kanellaki M. Freeze-dried *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on gluten pellets for glucose fermentation. *Process Biochemistry*. 2001;36(6):549-57.
93. Kourkoutas Y, Kanellaki M, Koutinas AA. Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. *LWT - Food Science and Technology*. 2006;39(9):980-6.
94. Plessas S, Bekatorou A, Koutinas AA, Soupioni M, Banat IM, Marchant R. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresource Technology*. 2007;98(4):860-5.
95. Singh A, Sharma P, Saran AK, Singh N, Bishnoi NR. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. *Renewable Energy*. 2013;50:488-93.
96. Hamdy MK, Kim K, Rudtke CA. Continuous ethanol production by yeast immobilized on to channeled alumina beads. *Biomass*. 1990;21(3):189-206.
97. Grohmann K, Cameron RG, Buslig BS. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresource Technology*. 1995;54(2):129-41.
98. Vera Garcia MA. Producción de bioetanol a partir de jugo de naranja y piña empleando pretratamiento de ozonólisis y adición de agentes externos (sacarosa, levadura, cáscara de naranja y piña). Toluca, Estado de México, México: Universidad Autónoma del Estado de México; 2010.
99. Madrid Morales E. Obtención de bioetanol a partir de residuos de naranja *Citrus spp.*: Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales; 2011.
100. Mojovic L, Nikolic S, Rakin M, Vukasinovic M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel*. 2006:1750-5.
101. Kaparaju P, Serrano M, Thomsen AB, Kongjan P, Angelidaki I. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 2009:2562-8.
102. Chang YH, Chang KS, Huang CW, Hsu CL, Jang HD. Comparison of batch and fed batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production. *Fuel*. 2012.
103. Roy P, Orikasa T, Tokuyasu K, Nakamura N, Shiina T. Evaluation of the life cycle of bioethanol produced from rice straws. *Bioresource Technology*. 2012:239-44.

104. Dodic S, Popov S, Dodic J, Rankovic J, Zavargo Z, Mucibabic RJ. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. *Biomass and Bioenergy*. 2009;822-7.
105. Chemists AAoOA. Official methods of analysis of the association of analytical chemists. 16th ed. Washington, D.C.1998.
106. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426-8.
107. Zhang H, Wu S. Enhanced enzymatic cellulose hydrolysis by subcritical carbon dioxide pretreatment of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 2014;158(0):161-5.
108. Lanzafame P, Temi DM, Perathoner S, Spadaro AN, Centi G. Direct conversion of cellulose to glucose and valuable intermediates in mild reaction conditions over solid acid catalysts. *Catalysis Today*. 2012;179(1):178-84.
109. Kobayashi H, Ohta H, Fukuoka A. Conversion of lignocellulose into renewable chemicals by heterogeneous catalysis. *Catalysis Science & Technology*. 2012;2(5):869-83.
110. Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2009;100(1):10-8.
111. Vo HT, Widyaya VT, Jae J, Kim HS, Lee H. Hydrolysis of ionic cellulose to glucose. *Bioresource Technology*. 2014;167(0):484-9.
112. Sinitsyn VV, Ponyatovsky EG, Kolesnikov AI, Dahlborg U, Calvo Dahlborg M. Thermodynamic properties and structural features of water at normal and high pressures. *Solid State Ionics*; 2001. p. 415-20.
113. Sambusiti C, Monlau F, Antoniou N, Zabaniotou A, Barakat A. Simultaneous detoxification and bioethanol fermentation of furans-rich synthetic hydrolysate by digestate-based pyrochar. *Journal of Environmental Management*. 2016;183, Part 3:1026-31.
114. Yu J, Stahl H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology*. 2008;99(17):8042-8.
115. Castañón Rodríguez JF, Torrestiana Sánchez B, Montero Lagunes M, Portilla Arias J, Ramírez de León JA, Aguilar Uscanga MG. Using high pressure processing (HPP) to pretreat sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*. 2013;98(1):1018-24.
116. Jin S, Zhang G, Zhang P, Fan S, Li F. High-pressure homogenization pretreatment of four different lignocellulosic biomass for enhancing enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*. 2015;181(0):270-4.
117. Behera S, Arora R, Nandhagopal N, Kumar S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;36(0):91-106.
118. Mohanty SK, Behera S, Swain MR, Ray RC. Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. *Applied Energy*. 2009;86(5):640-4.
119. Costa CE, Romani A, Cunha JT, Johansson B, Domingues L. Integrated approach for selecting efficient *Saccharomyces cerevisiae* for industrial lignocellulosic fermentations: Importance of yeast chassis linked to process conditions. *Bioresource Technology*. 2017;227:24-34.
120. Gonçalves FA, Ruiz HA, Silvino dos Santos E, Teixeira JA, de Macedo GR. Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept. *Renewable Energy*. 2016;94:353-65.

121. Sukhbaatar B, Hassan EB, Kim M, Steele P, Ingram L. Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*. 2014;101(0):196-202.
122. Pourbafrani M, Forgács G, Horváth IS, Niklasson C, Taherzadeh MJ. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology*. 2010;101(11):4246-50.
123. Zhang Q, Zhang L, Kong L, Yuan G, Zhu X, Liu H, et al. Establishment and assessment of a novel bioethanol and efficient biogas coupling fermentation system integrated with the pretreatment of a cellulolytic microbial consortium. *Journal of Cleaner Production*. 2014;83:142-50.
124. Kim H, Moon S, Abug A, Choi S-C, Zhang R, Oh Y-S. Effect of fermentation conditions on biohydrogen production from lipid-rich food material. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(20):15062-9.
125. Chang HN, Kim N-J, Kang J, Jeong CM. Biomass-derived volatile fatty acid platform for fuels and chemicals. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2010;15(1):1-10.
126. Ferrer P, Cambra-López M, Cerisuelo A, Peñaranda DS, Moset V. The use of agricultural substrates to improve methane yield in anaerobic co-digestion with pig slurry: Effect of substrate type and inclusion level. *Waste Management*. 2014;34(1):196-203.
127. Miron Y, Zeeman G, van Lier JB, Lettinga G. The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. *Water Research*. 2000;34(5):1705-13.
128. Mata-Alvarez J, Dosta J, Romero-Güiza MS, Fonoll X, Peces M, Astals S. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;36:412-27.
129. Germec M, Turhan I, Karhan M, Demirci A. Ethanol production via repeated-batch fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor. *Fuel*. 2015;161:304-11.
130. Wasewar KL. Reactive extraction: an intensifying approach for carboxylic acid separation. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2012;3:249–55.
131. C.B. Huang YA, T.M. Myers JLE. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*. 2011;56:650–4.
132. F.V. Immerseel JDB, F. Boyen LB, J. Volf, M. Sevcik. Medium-chain fatty Acids decrease colonization and invasion through hILASuppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70:3582–7.
133. J. Zentek SB-R, F. Ferrara, W. Vahjen, A.G. Van Kessel, R. Pieper. Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets. *Animal Health Research Reviews*. 2011;12:83–93.
134. Serhan M, Mattar J, Debs L. Concentrated yogurt (Labneh) made of a mixture of goats' and cows' milk: Physicochemical, microbiological and sensory analysis. *Small Ruminant Research*. 2016;138:46-52.
135. S. Yan SW, Z. Qiu,, G. Wei KZ. Application in Chinese Luzhou-flavor liquor brewing. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 2015;7:614-26.

136. Nagao K, Yanagita T. Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacological Research*. 2010;61(3):208-12.
137. Van Eerten-Jansen MCAA, Ter Heijne A, Grootcholten TIM, Steinbusch KJJ, Sleutels THJA, Hamelers HVM, et al. Bioelectrochemical Production of Caproate and Caprylate from Acetate by Mixed Cultures. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2013;1(5):513-8.
138. Skřivanová E, Marounek M. Influence of pH on antimicrobial activity of organic acids against rabbit enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*. 2007;52(1):70-2.
139. A.P. Sathiyagnanam, C.G. Saravanan MG. Hexanol-ethanoldiesel blends on DI-diesel engine to study the combustion and emission. London: IAENG, in: *Proceedings of the World Congress on Engineering*. 2010;2:1-5.
140. pccp, J. Yanowitz EC, R. McCormick. Utilization of Renewable Oxygenates as Gasoline Blending Components. National Renewable Energy Laboratory. 2011:47.
141. Liu J-J, Zhang G-C, Oh EJ, Pathanibul P, Turner TL, Jin Y-S. Lactose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of fermenting cellobiose. *Journal of Biotechnology*. 2016;234:99-104.
142. Song Y, Nguyen QA, Wi SG, Yang J, Bae H-J. Strategy for dual production of bioethanol and d-psicose as value-added products from cruciferous vegetable residue. *Bioresource Technology*. 2017;223:34-9.
143. Schievano A, Pepé Sciarria T, Vanbroekhoven K, De Wever H, Puig S, Andersen SJ, et al. Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications. *Trends in Biotechnology*. 2016;34(11):866-78.
144. Novy V, Krahulec S, Longus K, Klimacek M, Nidetzky B. Co-fermentation of hexose and pentose sugars in a spent sulfite liquor matrix with genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2013;130:439-48.
145. Martínez O, Sánchez A, Font X, Barrena R. Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. *Journal of Cleaner Production*. 2017;158:8-17.
146. Song Y, Li Q, Zhao X, Sun Y, Liu D. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* from enzymatic hydrolyzate of sugarcane bagasse. *BioResources*. 2012;7(4):4517-30.
147. Whiteman JK, Kana EBG. Comparative assessment of the Artificial Neural Network and response surface modelling efficiencies for biohydrogen production on sugar cane molasses. *BioEnergy Research*. 2014;7(1):295-305.
148. M. Shi YY, D. Guan, Y. Zhang, Z. Zhang. Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *Flammulina velutipes*. *Carbohydrate Polymers*. 2012;89:1268–76
149. Thanapimmetha A, Luadsongkram A, Titapiwatanakun B, Srinophakun P. Value added waste of *Jatropha curcas* residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. *Industrial Crops and Products*. 2012;37(1):1-5.
150. Dourou M, Kancelista A, Juszczuk P, Sarris D, Bellou S, Triantaphyllidou I-E, et al. Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products. *Journal of Cleaner Production*. 2016;139:957-69.

151. Q. Li JS, I. Thompson. Succinic acid production from orange peel and wheat straw by batch fermentations of *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied Microbiological Biotechnology*. 2010;88:671-8.
152. A. Parra-Matadamas LM-R, M. Pérez-Chabela. In vitro fermentation of 28 agroindustrial by-products: grapefruit albedo and peel, cactus pear peel and pineapple peel by lactic acid bacteria. *Food Research International*. 2015;22:859-65.
153. T.P. Prabisha RS, P. Binod, S. Sajitha, A. Pandey. Alkali pretreated sugarcane tops hydrolysate for the production of poly-3-hydroxybutyrate by *Comomonas* sp. a dairy effluent isolate. ***Indian Journal of Biotechnology***. 2014;13:306-13.
154. Brexó RP, Sant'Ana AS. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017;73:423-34.
155. Chang Y-H, Chang K-S, Huang C-W, Hsu C-L, Jang H-D. Comparison of batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production. *Fuel*. 2012;97:166-73.
156. Shadbahr J, Khan F, Zhang Y. Kinetic modeling and dynamic analysis of simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to bioethanol. *Energy Conversion and Management*.
157. Fan S, Xiao Z, Tang X, Chen C, Zhang Y, Deng Q, et al. Inhibition effect of secondary metabolites accumulated in a pervaporation membrane bioreactor on ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2014;162:8-13.
158. Qin L, Li X, Liu L, Zhu J-Q, Guan Q-M, Zhang M-T, et al. Dual effect of soluble materials in pretreated lignocellulose on simultaneous saccharification and co-fermentation process for the bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2017;224:342-8.
159. El-Dalatony MM, Kurade MB, Abou-Shanab RAI, Kim H, Salama E-S, Jeon B-H. Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 2016;219:98-105.
160. Pereira FB, Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011;112(2):130-6.
161. Trivedi N, Reddy CRK, Radulovich R, Jha B. Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed *Ulva* for bioethanol production. *Algal Research*. 2015;9:48-54.
162. Uncu ON, Cekmecelioglu D. Cost effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology. *Waste Management*. 2011:636-43.
163. Shahirah MNN, Gimbin J, Pang SF, Zakria RM, Cheng CK, Chua GK, et al. Influence of nutrient addition on the bioethanol yield from oil palm trunk sap fermented by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2015;23:213-7.
164. Comelli RN, Seluy LG, Isla MA. Optimization of a low-cost defined medium for alcoholic fermentation – a case study for potential application in bioethanol production from industrial wastewaters. *New Biotechnology*. 2016;33(1):107-15.
165. Behera S, Kar S, Mohanty RC, Ray RC. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. *Applied Energy*. 2010;87(1):96-100.

166. Mulko L, Rivarola CR, Barbero CA, Acevedo DF. Bioethanol production by reusable *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in a macroporous monolithic hydrogel matrices. *Journal of Biotechnology*. 2016;233:56-65.
167. Mathew AK, Crook M, Chaney K, Humphries AC. Comparison of entrapment and biofilm mode of immobilisation for bioethanol production from oilseed rape straw using *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biomass and Bioenergy*. 2013;52:1-7.
168. Chen C-C, Wu C-H, Wu J-J, Chiu C-C, Wong C-H, Tsai M-L, et al. Accelerated bioethanol fermentation by using a novel yeast immobilization technique: Microtube array membrane. *Process Biochemistry*. 2015;50(10):1509-15.
169. Ohta E, Nakayama Y, Mukai Y, Bamba T, Fukusaki E. Metabolomic approach for improving ethanol stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016;121(4):399-405.
170. Dong S-J, Yi C-F, Li H. Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2015;69:196-203.
171. Zheng D-Q, Wu X-C, Tao X-L, Wang P-M, Li P, Chi X-Q, et al. Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance. *Bioresource Technology*. 2011;102(3):3020-7.
172. Sanda T, Hasunuma T, Matsuda F, Kondo A. Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. *Bioresource Technology*. 2011;102(17):7917-24.
173. Muthaiyan A, Limayem A, Ricke SC. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2011;37(3):351-70.
174. Nikolić S, Mojović L, Rakin M, Pejin D, Pejin J. Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. *Food Chemistry*. 2010;122(1):216-22.
175. Santos LD, Sousa MDB, Guidini CZ, Resende MMd, Cardoso VL, Ribeiro EJ. Continuous ethanol fermentation in tower reactors with cell recycling using flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. 2015;50(11):1725-9.

