



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Programa de posgrado en Ciencias en Bioprocesos

**Aprovechamiento de la vaina de mezquite para la producción
de etanol utilizando *Z. mobilis***

Tesis para obtener el grado de:

Maestro En Ciencias En Bioprocesos

Presenta:

Balderas Hernández Marco Antonio

Directora de Tesis: **Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado**



UASLP-Sistema de Bibliotecas

Repositorio Institucional Tesis Digitales Restricciones de Uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

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



Aprovechamiento de la vaina de mezquite para la producción de etanol utilizando Z. mobilis © 2025 por Balderas Hernández Marco Antonio se distribuye bajo una licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Biorreactores adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en el periodo comprendido entre agosto de 2023 y noviembre de 2025, bajo la dirección de la Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado.

El programa de Maestría Ciencias En Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 000588. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 4010173. Número de CVU: 1317005.

Los datos del trabajo titulado *Aprovechamiento de la vaina de mezquite para la producción de etanol utilizando Z. mobilis* se encuentran bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



Solicitud de Registro de Tesis Maestría

San Luis Potosí SLP a noviembre/ 15 /2025

Comité Académico

En atención a: **Dr. Jaime David Pérez Martínez**

Por este conducto solicito a Usted se lleve a cabo el registro de tema de tesis de Maestría, el cual quedo definido de la siguiente manera: Aprovechamiento de la vaina de mezquite para la producción de etanol utilizando *Z. mobilis* que desarrollará el/la estudiante: I.B.P. **Marco Antonio Balderas Hernández** bajo la dirección de: **Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado**

Asimismo, le comunico que el proyecto en el cual trabajará el alumno involucrará el manejo de animales de experimentación, estudios con seres humanos o muestras derivadas de los mismos, el manejo y/o generación de organismos genéticamente modificados y requiere de aval de Comité de Ética e investigación de la FCQ.

(Complete la opción que aplique en su caso):

() Sí debido a que: _____

() No

(X) No Aplica

Sin otro particular, quedo de Usted.

A T E N T A M E N T E

Marco Antonio Balderas Hernández

Nombre y firma del estudiante

Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado

Nombre y firma de la Directora de Tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Programa de posgrado en Ciencias en Bioprocesos

**Aprovechamiento de la vaina de mezquite para la
producción de etanol utilizando *Z. mobilis***

Tesis que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

Balderas Hernández Marco Antonio

SINODALES:

Presidente:	Dra. Alicia Grajales Lagunes
Secretario:	Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández
Vocal:	Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado
Vocal suplente:	Dr. Enrique Maldonado Cervantes

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

Noviembre 2025

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado: Directora de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Alicia Grajales Lagunes. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández. Profesor invitado adscrito a la división de biología molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a noviembre/ 15 /2025

En la ciudad de San Luis Potosí el día 15 del mes de noviembre del año 2025 El que suscribe Marco Antonio Balderas Hernández Alumno(a) del programa de posgrado en Ciencias en Bioprocesos adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado y cede los derechos del trabajo titulado *Aprovechamiento de la vaina de mezquite para la producción de etanol utilizando Z. mobilis* a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección hernández.marc95@outlook.com o teresita.paz@uaslp.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Marco Antonio Balderas Hernández

Nombre y firma del alumno



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos
Programa de Maestría

Formato M28

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a noviembre / 07 /2025

L.B. Reyna Nayeli Ortiz Quintero
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada **Aprovechamiento de la vaina de mezquite para la producción de etanol utilizando *Z. mobilis*** presentada por el autor **Marco Antonio Balderas Hernández**. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias en Bioprocesos. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 9% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dr. Jaime David Pérez Martínez
Coordinador Académico
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

**La vida sólo puede ser comprendida mirando hacia atrás,
pero ha de ser vivida mirando hacia adelante.**

Søren Kierkegaard

AGRADECIMIENTOS

A Ana Laura Rostro Noyola, mi mujer y compañera de vida. Este logro es, en gran medida, también tuyo. Quiero agradecerte por ser mi soporte incondicional y mi refugio durante este camino. Me brindaste apoyo en cada aspecto de mi vida; desde la motivación diaria para continuar hasta la comprensión en los momentos de mayor presión. Gracias por tu paciencia infinita, por tus palabras de aliento y, sobre todo, por amarme profundamente. Tu amor y tu fe en mí fueron la fuerza que me impulsó a la meta final. Eres mi mayor inspiración y fuente inagotable de fortaleza.

A mi madre, por enseñarme a nunca rendirme. Gracias por tu apoyo inquebrantable desde el inicio de mi trayectoria académica. Cada día, tus palabras de ánimo fueron un motor crucial, especialmente cuando la frustración parecía dominar. Tu confianza en mis capacidades me dio la energía para terminar esta tesis. Gracias por tu sacrificio, por tu cariño y por creer en mí más de lo que yo mismo lo hacía.

A la Señora Esperanza Noyola Landaverde y el Señor Juan Valente Rostro Maldonado. Su apoyo se extendió a aspectos vitales fuera de lo académico, brindándome una estabilidad y ayuda invaluable. Gracias por su hospitalidad, su cariño familiar y por el apoyo incondicional que me permitió concentrarme plenamente en la finalización de esta tesis. Su generosidad me brindó la paz mental necesaria en los momentos más exigentes.

Mi profundo y sincero agradecimiento a mi comité asesor y colaboradores. En primer lugar, a la Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado, por su aceptación, paciencia inmensurable y la guía constante que me condujo a la culminación de este trabajo. . A la Dra. Alicia Grajales Lagunes, por sus atinadas recomendaciones y comentarios críticos, los cuales fueron esenciales para pulir y mejorar la calidad final de este trabajo. Finalmente, al Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández, no solo por sus valiosos consejos y recomendaciones académicas, sino también por su apoyo técnico y dedicación al auxiliarme en la etapa de análisis por HPLC. Su esfuerzo combinado fue fundamental para el éxito de esta investigación.

A mi compañera I.B.P. Mariana Janet Aguilar Estrada, mi más profundo agradecimiento. Su apoyo fue fundamental e indispensable para la realización de este trabajo. A lo largo de la investigación, tu ayuda desinteresada no solo aligeró mi carga, sino que también fue una lección de generosidad y compañerismo. Muchas gracias por tu valiosa colaboración y por tu amistad.

A mi compañera de generación la M.C. Gabriela Reyes González. Agradezco sinceramente su valiosa ayuda y el compañerismo que compartimos. Su amistad incondicional y su perspectiva como colega fueron un gran apoyo moral y académico durante este periodo.

A la Dra. Ana Silvia Pérez Martínez y al Dr. José Luis Martínez Salgado. Su apoyo profesional fue significativo para el avance de este trabajo. Agradezco sinceramente los valiosos consejos y la orientación experta que generosamente me brindaron a lo largo de la investigación. Su experiencia fue clave para clarificar ideas y sortear obstáculos, proporcionando una mentoría crucial para el desarrollo de esta tesis.

Extiendo mi gratitud a los alumnos Leslie Elizabeth González Castillo, Stephania Margarita Gallardo Narváez y Héctor Ariel Juárez Correa. Agradezco la confianza que depositaron en mi criterio y mi trabajo al basar sus propios proyectos en el desarrollo de esta tesis. Su entusiasmo y dedicación al replicar y expandir los fundamentos de esta investigación no solo fue un honor, sino también una motivación adicional. Les deseo mucho éxito en sus futuras trayectorias académicas.

A todos los aquí nombrados, mi profunda gratitud. Su apoyo incondicional y sus contribuciones fueron la fuerza motriz detrás de este proyecto. Esta tesis no es solo la materialización de un esfuerzo individual, sino el fruto de un compromiso y una colaboración colectiva. Gracias por haber creído en este trabajo. El logro de esta meta les pertenece tanto como a mí.

RESUMEN

Los mezquites (*Prosopis* spp.) son leguminosas ampliamente distribuidas en zonas áridas y semiáridas de América. En México ocupan cerca de 4 millones de hectáreas produciendo en promedio 4.5 t/ha de vaina al año representando una fuente local importante de productos. Su aprovechamiento constituye una alternativa viable para la producción de bioetanol y el desarrollo de cadenas de valor sostenibles. En este estudio se evaluó la producción de etanol a partir de harina de vaina de mezquite (HVM) utilizando *Zymomonas mobilis* como biocatalizador. Realizando una comparación con *Saccharomyces cerevisiae*, empleando medios definidos y a base de HVM. Durante la fase de generación de biomasa, *Z. mobilis* alcanzó una densidad óptica máxima de 9.9 a las 6 h de cultivo, manteniendo su viabilidad durante 96 h, con velocidades de consumo de azúcares de 5.98 ± 1.86 g/L·h en medio definido y 4.66 ± 0.67 g/L·h en HVM, sin diferencias significativas respecto a *S. cerevisiae*. Mediante un diseño Box–Behnken y la Metodología de Superficie de Respuesta se optimizaron pH, concentración de azúcares, fuente de nitrógeno y densidad óptica inicial. Las condiciones óptimas (pH 6, 200 g/L de azúcares, 0.5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{OD}_{600} = 8$) permitieron alcanzar 33.5 g/L de etanol en el sobrenadante y 478.2 g/L en el destilado, con una recuperación del 13.7 %. Los resultados demuestran la eficiencia de *Z. mobilis* para la producción de etanol a partir de HVM, resaltando su potencial como biocatalizador para el aprovechamiento de recursos locales y el desarrollo de bioprocesos sostenibles.

Palabras clave: valor agregado, vaina de mezquite, solventes, Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

ABSTRACT

Mesquite trees (*Prosopis* spp.) are legumes widely distributed in arid and semi-arid areas of America. In Mexico, they occupy nearly 4 million hectares, producing an average of 4.5 t/ha of pods per year, representing an important local source of products. Their use is a viable alternative for bioethanol production and the development of sustainable value chains. This study evaluated ethanol production from mesquite pod meal (MPM) using *Zymomonas mobilis* as a biocatalyst. A comparison was made with *Saccharomyces cerevisiae*, using defined and HVM-based media. During the biomass generation phase, *Z. mobilis* reached a maximum optical density of 9.9 at 6 h of culture, maintaining its viability for 96 h, with sugar consumption rates of 5.98 ± 1.86 g/L·h in defined medium and 4.66 ± 0.67 g/L·h in HVM, with no significant differences compared to *S. cerevisiae*. Using a Box–Behnken design and the Response Surface Methodology, pH, sugar concentration, nitrogen source, and initial optical density were optimized. The optimal conditions (pH 6, 200 g/L of sugars, 0.5 g/L of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and $\text{OD}_{600} = 8$) allowed 33.5 g/L of ethanol to be achieved in the supernatant and 478.2 g/L in the distillate, with a recovery of 13.7%. The results demonstrate the efficiency of *Z. mobilis* for ethanol production from HVM, highlighting its potential as a biocatalyst for the use of local resources and the development of sustainable bioprocesses.

Keywords: added value, mesquite pod, solvents, Response Surface Methodology (RSM)

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Bioetanol	1
1.2	Bioetanol como combustible	4
1.3	Bioetanol como materia prima para la producción de otros compuestos orgánicos.	5
1.4	Clasificación y potencial de las materias primas para la producción de bioetanol	6
1.5	Disponibilidad de materias primas en México.	12
1.6	Síntesis química del etanol.	14
1.7	Consideraciones de las materias primas de segunda generación.	19
1.7.1	Presencia de lignina	19
1.7.2	Pretratamientos	20
1.8	<i>Zymomonas mobilis</i>	20
1.8.1	Estrategias para la fermentación para <i>Z. mobilis</i>	21
1.9	Vaina de mezquite para la producción de etanol.....	21
1.10	Contribución a los Objetivos de Desarrollo Sostenible.....	24
1.11	Optimización de procesos.....	25
1.11.1	Metodología de superficie de respuesta y Diseño Box-Behnken	25
1.11.2	Diseño Box-Behnken	26
2	Antecedentes.....	28
3	Justificación	29
4.1	Objetivo general	30
4.2	Objetivos específicos	30
5	Metodología	31
5.1	Obtención del macerado de harina de vaina de mezquite	31
5.2	Cuantificación de azúcares	32
5.3	Cultivo de <i>Z. mobilis</i>	32
5.4	Ensayos de fermentación <i>Z. mobilis</i> vs <i>S. cerevisiae</i>	33
5.5	Generación de biomasa previo a la fermentación	35

5.6	Fermentación para los ensayos del diseño de experimentos	36
5.7	Fermentación en biorreactor	37
5.8	Destilación y cuantificación de etanol producido.....	38
6	Resultados y discusión	38
6.1	Consumo de azúcares y viabilidad celular de <i>Z. mobilis</i> durante el proceso fermentativo.	38
6.2	El crecimiento acelerado de <i>Z. mobilis</i> en condiciones controladas	39
6.3	El crecimiento inicial de <i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i> en HVM en comparación con medio definido	44
6.3.1	Eficiencia fermentativa de <i>Z. mobilis</i> : rápida asimilación de azúcares y su comparación con <i>S. cerevisiae</i>	46
6.4	Optimización de las condiciones operacionales mediante MSR	48
6.5	La optimización de los parámetros operacionales mediante el diseño Box–Behnken permitió establecer las condiciones que maximizan la producción de etanol 55	
6.5.1	Consumo rápido de sacarosa en las primeras 12 h y agotamiento de la fracción fermentable en HVM	57
6.6	Resultados experimentales de producción de etanol a partir de HVM y comparación frente a estudios previos.....	58
7	Conclusiones	62
8	Referencias.....	65
9	ANEXOS.....	77
9.1	Determinación de proteínas: Método micro-Kjeldahl.....	77
9.2	Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores presentes en medios de fermentación utilizando dextrosa como patrón.....	79
9.3	Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores en fase I del crecimiento diauxico en biorreactor.	79
9.4	Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores en fase II del crecimiento diauxico en biorreactor.	80
9.5	Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> expresada en densidad óptica (OD _{600nm}).....	81

9.6	Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores por <i>Z. mobilis</i> en ensayo (medio definido).	82
9.7	Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores por <i>Z. mobilis</i> en ensayo (HVM).....	82
9.8	Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores por <i>S. cerevisiae</i> en ensayo (medio definido).	83
9.9	Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores por <i>S. cerevisiae</i> en ensayo (HVM).....	83
9.10	Cinética de consumo de azúcares (equivalente de °Bx a g/L de sacarosa), en HVM utilizando <i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	84
9.11	Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares (equivalente de °Bx a g/L de sacarosa) por <i>Z. mobilis</i> en ensayo (HVM).	84
9.12	Gráfico para determinación de velocidad específica de consumo de azúcares (equivalente de °Bx a g/L de sacarosa) por <i>S. cerevisiae</i> en ensayo (HVM).....	85
9.13	Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> en medio definido y en HVM, expresada en términos de densidad óptica a 600 nm.	85
9.14	Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en medio definido y en HVM, expresada en términos de densidad óptica a 600 nm.	86
9.15	Diagrama de Pareto de efectos estandarizados que identifican los factores que afectan la concentración de etanol.....	87
9.16	Diagrama de Pareto de efectos estandarizados que identifican los factores que afectan la velocidad de producción volumétrica.....	88
9.17	Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores de HVM en biorreactor por <i>Z. mobilis</i> (condiciones optimizadas)	89
9.18	Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares (equivalente de °Bx a g/L de sacarosa) por <i>Z. mobilis</i>	89

Índice de figuras

Figura 1. Etanol y su potencial de valorización	2
Figura 2. Producción global de etanol en 2024.....	3
Figura 3. Producción de plantas de etanol en EUA y uso de maíz por año comercial	3
Figura 4. Diagrama esquemático de conversión termoquímica y conversión bioquímica de etanol.	16
Figura 5. Fotografía de las vainas de mezquite (<i>Prosopis spp.</i>).	22
Figura 6. Alineación de la investigación a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).	25
Figura 7. Representación esquemática del diseño experimental Box-Behnken para tres factores.	28
Figura 8. Cinéticas de consumo de azúcares reductores por <i>Z. mobilis</i> en cultivo Fed-Batch	39
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i>	41
Figura 10. Cinéticas de consumo de azúcares reductores para <i>Z. mobilis</i> y <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> en el medio definido y en HVM	43
Figura 11. Cinética de crecimiento de <i>Z. mobilis</i> en medio definido y en HVM.	45
Figura 12. Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en medio definido y en HVM ...	46
Figura 13. Gráficas de superficie de respuesta separar las de producción de las de velocidad.....	55
Figura 14. Cinética de consumo de azúcares reductores utilizando condiciones optimizadas.....	56
Figura 15. Cinética de consumo de azúcares utilizando las condiciones optimizadas.	58
Figura 16. Concentraciones máximas de etanol alcanzadas en estudios previos y en la presente investigación.	61

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades típicas del etanol y gasolina.	1
Tabla 2. Derivados químicos del etanol, propiedades de reacción y características económicas.	5
Tabla 3. Producción de etanol en <i>S. cerevisiae</i> utilizando diferentes tipos de materia prima y condiciones de operación.	7
Tabla 4. Producción de etanol en <i>Z. mobilis</i> utilizando diferentes materias prima bajo distintas condiciones de cultivo.	8
Tabla 5. Volumen de etanol producido por tonelada de materia prima.	10
Tabla 6. Disponibilidad de diferentes tipos de materias primas.	12
Tabla 7. Estudios reportados en México referentes a la producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales.	13
Tabla 8. Comparación de resultados de tratamientos biológicos contra termoquímicos para la producción de etanol.	15
Tabla 9. Lista de microorganismos modificados empleados en la mejora de la producción de etanol.	17
Tabla 10. Contenido de azúcares en harinas de vaina de <i>P. laevigata</i>	23
Tabla 11. Composición química de la harina de vainas de mezquite.	23
Tabla 12. Medio definido para el cultivo de <i>Z. mobilis</i>	33
Tabla 13. Composición de medios definidos.	34
Tabla 14. Composición de medio de cultivo	35
Tabla 15. Composición de medio definido para <i>Z. mobilis</i>	35
Tabla 16. Tabla de diseño Box-Behnken	36
Tabla 17. Diseño experimental Box-Behnken niveles codificados.	36
Tabla 18. Diseño experimental Box-Behnken.	48
Tabla 19. Coeficientes del modelo cuadrático para la determinación de etanol.	50
Tabla 20. Coeficientes del modelo cuadrático para determinar la velocidad de producción volumétrica de etanol.	51
Tabla 21. Comparación de la producción de etanol con otros estudios.	60

1. Introducción

1.1 Bioetanol

En el contexto actual de transición energética, la búsqueda de compuestos renovables que puedan sustituir parcial o totalmente a los compuestos derivados del petróleo se ha vuelto fundamental. Entre estos, el bioetanol se ha consolidado como una sustancia versátil con múltiples aplicaciones energéticas e industriales, debido a su disponibilidad, facilidad de producción a partir de biomasa y propiedades fisicoquímicas favorables. El bioetanol es un compuesto de alto valor, por sus características (**Tabla 1**) y múltiples aplicaciones (**Figura 1**) que incluyen el uso como combustible (bioetanol, fuente de energía en pilas, en sistemas de cogeneración), la generación de energía mediante combustión térmica, y como materia prima en la industria química. Una de las aplicaciones de mayor interés es mezclarlo con una pequeña cantidad de gasolina; como las mezclas E5G, E26G y E85G (Kohler, 2019).

Tabla 1. Propiedades típicas del etanol y gasolina. Adaptado de Pang et al. (2019).

Propiedades	Etanol	Gasolina
Formula química	C ₂ H ₅ OH	C _{6.75} H _{12.99} (C ₄ -C ₁₂)
Peso molecular (g/mol)	46.07	100-105
Densidad de energía (MJ/L)	19.6	39-46
Densidad (g/m ³)	0.79	0.72-0.76
Solubilidad en agua (g/L a 20°C)	79	Inmiscible
Numero de octanos (R+M)/2 ^a	99.1	86-94
Temperatura de ebullición (°C)	78.3	25-275
Calor latente de vaporización (25 kJ/Kg)	904	380-500
Temperatura de autoignición (°C)	422	257
Relación estequiométrica aire/combustible	9.0	14.7
Temperatura de llama adiabática (K)	2310	2370
Límite de volumen agregado (v%)	ca. 10	-

^a(R+M)/2 indica el promedio entre el número de octano de investigación (RON) y el número de octano motor (MON), utilizado como valor estándar para reportar el índice de octano.

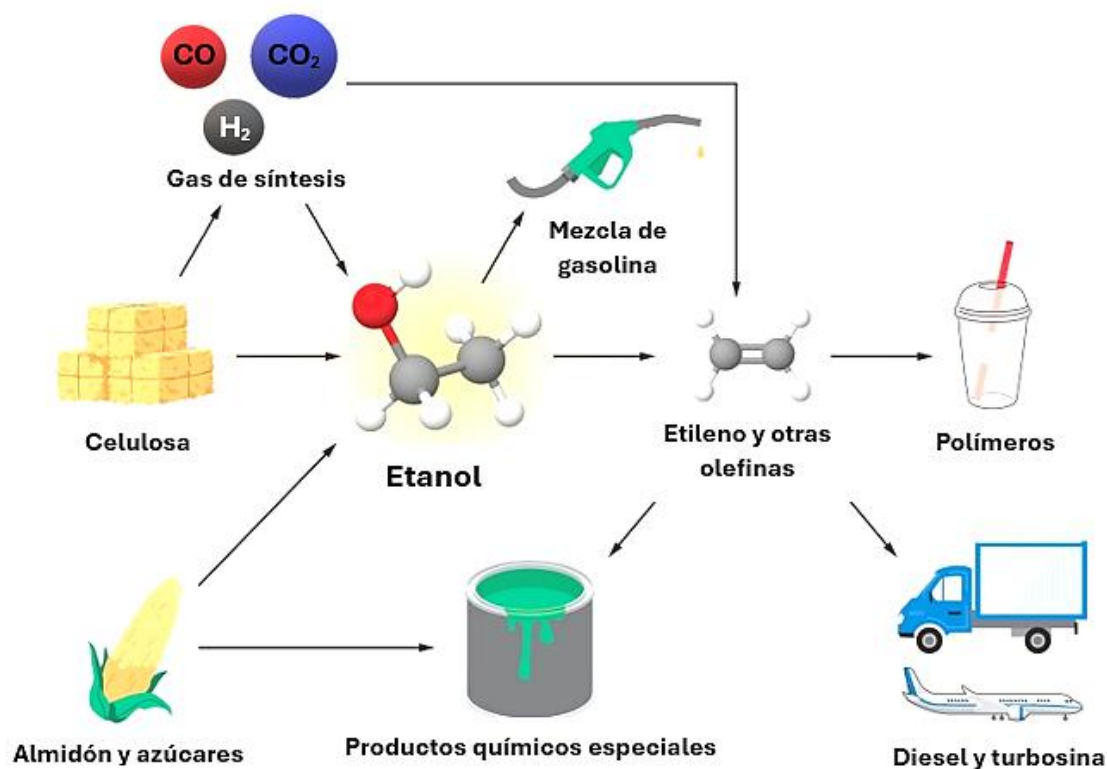


Figura 1. Etanol y su potencial de valorización (Rosales-Calderón & Arantes, 2019).

Es por ello que países como Estados Unidos y Brasil son líderes en la producción de bioetanol a nivel mundial, con 53% y 28%, respectivamente (**Figura 2**), siendo sus principales materias primas para su elaboración, el maíz y la caña de azúcar, respectivamente. Aproximadamente el 40% del maíz del total producido por Estados Unidos es destinado a la síntesis de bioetanol (**Figura 3**) (Mumm et al., 2014; Ramsey et al., 2023; Saavoss et al., 2021), datos de 2010 del Servicio de Investigación Económica del Departamento de Agricultura de Estados Unidos indicaron que el 55.4% de la caña cosechada se destina a la producción de etanol y el restante para la producción de azúcar (Valdes, 2021). Mientras que, una última estimación de zafra en Brasil en 2024 confirmó una producción de caña de azúcar histórica de un total de 713.2 millones de toneladas (CONAB, 2024) que es destinada a la producción de etanol.

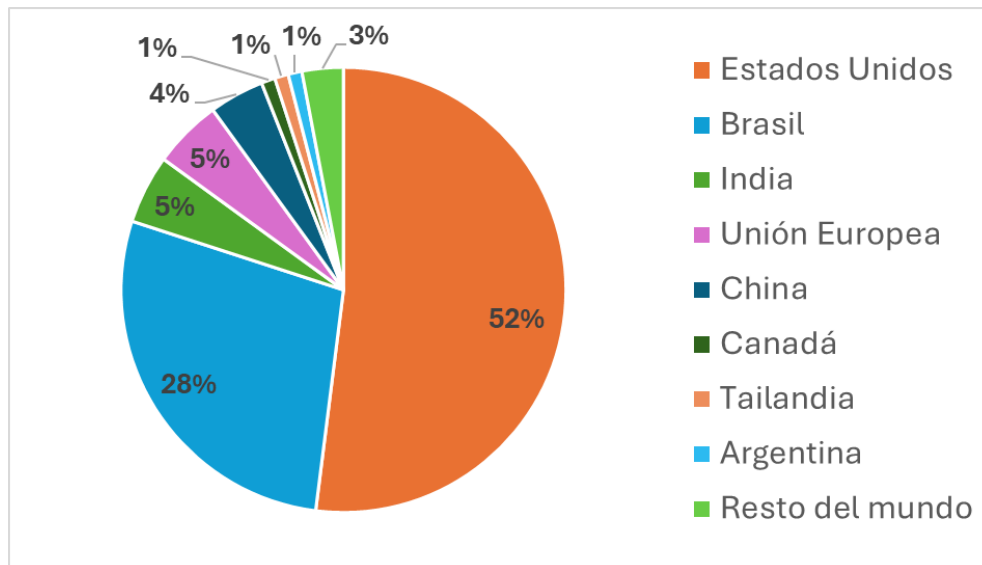
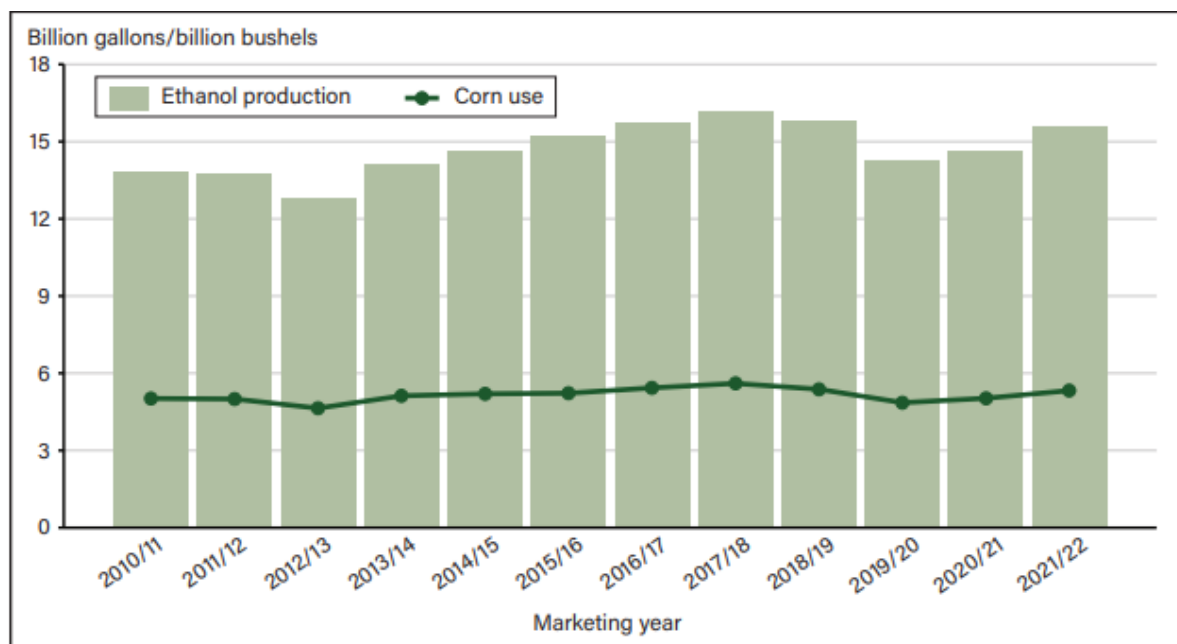


Figura 2. Producción global de etanol en 2024 (Renewable fuels association, 2024).



Source: USDA, Economic Research Service using data from U.S. Department of Energy, Energy Information Administration and USDA, National Agricultural Statistics Service.

Figura 3. Producción de plantas de etanol en EUA y uso de maíz por año comercial 2010/11-2021/22 (Ramsey et al., 2023).

Considerando la relevancia del bioetanol en la matriz energética global, resulta pertinente profundizar en su papel como combustible. En la siguiente sección se describe su consumo y las propiedades que lo posicionan como alternativa a los combustibles fósiles.

1.2 Bioetanol como combustible

La producción mundial total de etanol durante 2009-2010 fue de aproximadamente 100 mil millones de litros. El consumo mundial como combustible fue del 68%, 21% para uso industrial y 11% para uso en la industria de alimentos (Vohra et al., 2014). De acuerdo con datos de la Renewable Fuels Association, en 2023 la producción mundial de etanol fue de 29,590 millones de galones, y aproximadamente 80 % es utilizado como combustible mientras que entre el 13 y 20 % restante es destinado para la producción de bebidas alcohólicas, medicamentos y cosméticos, entre otros usos industriales (CEDRSSA, 2020, Ramsey et al., 2023).

El bioetanol es deseable como combustible por sus características, entre las que se encuentran: a) el tener un número de octanaje alto, b) límites de inflamabilidad más amplios, c) velocidades de llama más altas y d) calores de vaporización más altos que la gasolina, también se ha estimado que el bioetanol puede reducir hasta el 90% de las emisiones de CO₂ y entre el 60% y el 80% de las emisiones de SO₂ cuando se mezcla con un 95% de gasolina. Estas propiedades permiten una relación de compresión más alta y un tiempo de combustión más corto, lo que deriva en ventajas teóricas de eficiencia sobre la gasolina en un motor de combustión interna. La utilización del bioetanol como sustituto de combustibles fósiles pueden potencialmente mitigar los efectos del cambio climático provocado por el calentamiento global (Balat, 2009, Halder et al., 2019). Aunque el bioetanol destaca por sus propiedades como biocombustible, su estructura química lo convierte también en una plataforma versátil para la síntesis de compuestos orgánicos de alto valor, lo que amplía significativamente su relevancia industrial más allá del sector energético.

1.3 Bioetanol como materia prima para la producción de otros compuestos orgánicos.

El empleo del etanol como materia prima es sumamente atractivo debido a la extensa cantidad de productos que pueden elaborarse mediante su transformación (**Tabla 2**) por ejemplo el reformado con vapor de etanol (ESR) que deriva en la formación de gas de síntesis mezcla de CO e H₂ siendo este último de gran interés por su potencial para la fabricación de celdas de combustible (Xiang et al., 2022). Por otro lado, el bioetanol también puede ser usado para la síntesis directa de otros productos químicos importantes de valor agregado como butanol, etileno, butadieno y ácido acético que se generan a partir de reacciones de deshidratación, deshidrogenación, condensación, eterificación u oxidación (Rass-Hansen et al., 2007).

Tabla 2. Derivados químicos del etanol^a, propiedades de reacción y características económicas (Dagle et al., 2020).

Producto	Reacción nominal	ΔH° reacción/kJ mol ⁻¹	Consumo/Mt y ⁻¹ (año)	Precio promedio/USD kg ⁻¹ (2015-2018)	(producción ÷ C ₂ H ₅ OH)/% ^c
Combustible destilado^b	5C ₂ H ₅ OH + H ₂ ⇌ C ₁₀ H ₂₂ + 5H ₂ O	-350	4540 (2019)	0.59	8500
Etileno	C ₂ H ₅ OH ⇌ C ₂ H ₄ + H ₂ O	43	146 (2016)	0.81	278
BTX^d	3.6C ₂ H ₅ OH ⇌ C _{7.2} H _{8.7} + 3.6 H ₂ O + 3H ₂	3	120 (2015)	0.90	240
Propeno	C ₂ H ₅ OH + CO + 2 H ₂ ⇌ C ₃ H ₆ + 2H ₂ O	-165	96 (2015)	1.28	122
Hidrógeno	C ₂ H ₅ OH + 3H ₂ O ⇌ 6H ₂ + 2CO ₂	366	85 (2018)	1.99	375
Butenos mixtos	2CH ₃ CH ₂ OH ⇌ CH ₃ C(CH ₂)CH ₃ + 2H ₂ O	-38	43 (2015)	0.86	81
Etilenglicol	C ₂ H ₅ OH + 1/2O ₂ ⇌ HOCH ₂ -CH ₂ OH	-184	25 (2016)	0.95	32
Isobuteno	2C ₂ H ₅ OH ⇌ C ₄ H ₈ + 2H ₂ O	-38	14 (2019, est)	1.9	27
Acetona	2C ₂ H ₅ OH + H ₂ O ⇌ CH ₃ C(O)CH ₃ + CO ₂ + 4H ₂	235	6.4 (2016)	1.00	12
Óxido de etileno	C ₂ H ₅ OH + 1/2O ₂ ⇌ CH ₂ OCH ₂ + H ₂ O	-62	26 (2015)	1.34	32
Ácido acético	C ₂ H ₅ OH + O ₂ ⇌ CH ₃ COOH + H ₂ O	-443	14.0 (2016)	0.57	12
1,3-butadieno	2CH ₃ CH ₂ OH ⇌ CH ₂ CHCHCH ₂ + 2H ₂ O+H ₂	89	10.1 (2016)	1.07	20

1-butanol	$2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	-11	5.5 (2014)	3.20	8
Ácido acrílico	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_2\text{CHCOOH} + \text{H}_2\text{O}$	43	5.0 (2013)	1.63	4
	$\text{C}_3\text{H}_6 + 1.5\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_2\text{CHCOOH} + \text{H}_2\text{O}$	-637			
Acetato de etilo	$2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OH}_5\text{C}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-465	3.1 (2017)	0.97	4
Acetaldehído	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 1/2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{CHO} + \text{H}_2\text{O}$	-181	0.9 (2016)	1.86	1
Etilen Carbonato	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CO}_2 + 1/2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O}$	-125	0.2 (2019)	1.50	0.1
Éter dietílico	$2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \rightleftharpoons \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_5\text{C}_2 + \text{H}_2\text{O}$	14	0.04 (2018)	3.30	0.1

^aTasas de consumo global y precios del IHS. Las tasas de consumo tienen unidades de Mt/año = 109 kg/año. Se calculó la termodinámica a partir de valores obtenidos del NIST Chemistry Webbook utilizando la estequiometría indicada. ^bPrecios de los combustibles y tamaño del mercado de destilados (estequiometría representada como decano) de https://www.eia.gov/petroleum/weekly/archive/2019/190911/includes/analysis_print.php. ^cProducción global del producto/producción global de etanol. ^dEstequiometría aproximada de la oferta mundial de benceno, tolueno y xilenos.

Dado el potencial del bioetanol como plataforma para la síntesis de compuestos de alto valor, resulta indispensable analizar las fuentes de biomasa empleadas en su producción. Identificar y comparar las materias primas disponibles permitirá dimensionar la viabilidad técnica y económica de su aprovechamiento a distintas escalas.

1.4 Clasificación y potencial de las materias primas para la producción de bioetanol

El etanol puede producirse mediante síntesis química y por medio de procesos fermentativos. Entre los microorganismos utilizados, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* destacan por su alta eficiencia fermentativa. La **Tabla 3** resume diversos casos de estudio sobre la producción de etanol a partir de distintas materias primas utilizando *S. cerevisiae*, bajo diferentes condiciones de operación. Esta información permite comparar la producción en función del tipo de sustrato y los parámetros del proceso.

Tabla 3. Producción de etanol en *S. cerevisiae* utilizando diferentes tipos de materia prima y condiciones de operación (Latif et al., 2023).

Materia prima	Parámetros			Concentración de etanol (g/L)
	Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de incubación (h)	
Galactosa	30	200	28	96.90
Cáscara de arroz	43	150	96	15.63
Hoja de palma aceitera	30	152	15	4.79
Celulosa y sacarosa/xilosa	30	200	96	4.30
Cáscaras de papaya	30	200	48	0.51
Hojas de piña	30	150	72	9.75
Cáscara de granada	30	100	24	5.58
Sorgo dulce	30	150	18	97.54
Residuos de destilería de caña de azúcar	30	150	48	49.77
Almidón de maíz	30	300	192	98.13
Paja de arroz	30	150	72	18.07
Melaza de caña de azúcar	30	200	56	114.71
Rastrojos de maíz	34	150	48	21.47
Tronco de palma aceitera	30	150	18	44.25
Biomasa de microalgas	30	150	48	52.10
Melaza de remolacha azucarera	30	140	112	79.60

Almidón de yuca	30	200	72	81.86
Almidón de suweg	37	80	78	99.52
Residuos de frondas	50	150	96	33.15

De acuerdo con los datos mostrados, la concentración de etanol más alta se obtuvo a partir de melaza de caña de azúcar (114.71 g/L), almidón de ñame pata de elefante (99.52 g/L), almidón de maíz (98.13 g/L) y sorgo dulce (97.54 g/L), como se observa en la tabla 3 estas materias primas tienen un alto contenido de carbohidratos fermentables. En particular, la melaza y los almidones demostraron ser sustratos altamente eficientes para *S. cerevisiae* bajo condiciones relativamente moderadas de temperatura y agitación, lo que los establece como candidatos viables para procesos a escala industrial.

Por otro lado, *Z. mobilis* es un microorganismo con características metabólicas distintas que le permiten alcanzar elevadas tasas de conversión de diferentes tipos de azúcares a etanol. En la **Tabla 4** se presentan diversos estudios donde se evaluó la capacidad fermentativa de diferentes cepas de *Z. mobilis* utilizando distintas materias primas, estrategias de cultivo y condiciones operativas.

Tabla 4. Producción de etanol por *Z. mobilis* a partir de diferentes tipos de materia prima bajo distintas condiciones de cultivo (Yang et al., 2016).

Cepa	Sustrato	Carbón inicial	Estrategia de fermentación	Condiciones (pH, temperatura, rpm)	Tiempo (h)	Concentración de etanol (g/L)
ATCC 10988	Glucosa	100	Lote	pH: 4.5, 37°C	12	50.6
MCC 24277	Melaza de caña de azúcar	216	Lote	pH: 5.1, 3°C	44	58.4

10225	Residuos de cocina	70	Lote	pH: 4.0, 30°C	40	52
NRRL-806	<i>Eucalyptus globulus</i>	79.5	Lote	pH: 5.5, 30°C, 150 rpm	27	37
CP4	Bagazo de caña de azúcar	80	Lote-SSF	pH: 5.0, 30°C	36	60
8b	Lodo de papel		Lote-SSCF	pH: 5.8, 30°C, 300 rpm	120	46.3
PTCC 1718	Vainas de algarrobo	180	Lote-ASSF	pH: 5.3, 30°C	40	1.8
CP4	Glucosa	295	Lote-VHG	pH: 6.0, 32°C	60	78
TMY-GHPX	Glucosa	295	-	-	-	136
TMY-GHPX	Glucosa	295	-	-	-	145
TMY-GHPX	Xilosa	60	-	-	-	20.5
TMY-GHPX	Xilosa y glucosa	Glucosa: 170; xilosa: 60	-	-	-	110
8b	Rastrojos de maíz	-	Ciclo celular en lotes, RaBIT	pH: 6.0, 30°C	24	43.4
CICC 10225	Glucosa	100	Lote repetido con células inmovilizadas	pH: 7.0, 30°C, 140 rpm	24	49.3
B-4286	Glucosa	80	Lote alimentado	30°C, 150 rpm	29	113
WR6	Glucosa	100	Continuo con células floculantes	pH: 5.5, 30°C, 100 rpm	-	47.6
ZM4	Fructosa	150	Continuo con células inmovilizadas	pH: 5.0, 30°C	-	72
ZM4	Fructosa	200	-	-	-	78.2

SSF: sacarificación y fermentación simultáneas; SSCF: sacarificación y cofermentación simultáneas); ASSF: tecnología avanzada de fermentación en estado sólido; VHG: gravedad muy alta; RaBIT: bioconversión rápida con tecnología de reciclaje integrada

De acuerdo con la tabla 4 la mayor concentración de etanol reportada fue 145 g/L y se obtuvo utilizando glucosa como sustrato y con cepas mejoradas de *Z. mobilis* (TMY-GHPX). También se observaron altos rendimientos con bagazo de caña de azúcar (60 g/L) y residuos de cocina (52 g/L), lo que resalta su versatilidad en el aprovechamiento de biomasa celulósica y residuos orgánicos.

Además de la concentración final de etanol, el rendimiento volumétrico por unidad de masa de materia prima constituye un parámetro relevante. La **Tabla 5** presenta datos de literatura en los que se comparan diferentes sustratos en términos de litros de etanol producidos por tonelada de biomasa procesada, lo cual es fundamental para evaluar la viabilidad económica de la producción de etanol.

Tabla 5. Volumen de etanol producido por tonelada de materia prima (Manochio et al., 2017 y Tse et al., 2021).

Materias primas	Rendimiento de etanol (L/t)
Remolacha azucarera	100–110
Caña de azúcar	70–90
Arroz	430
Maíz	360–460
Rastrojos de maíz	362–456
Paja de trigo	406
Bagazo de caña de azúcar	318–500
Sorgo	268–380
Microalgas	167–501
Algas pardas (macroalgas)	12–1128
Pastos marinos (macroalgas)	747
Algas verdes (macroalgas)	72–608

Las materias primas lignocelulósicas presentes en la naturaleza representan una fuente potencial para la producción de etanol debido a su alta disponibilidad y bajo costo. Entre estas se incluyen residuos agrícolas como rastrojo de maíz y paja de trigo, así como residuos forestales como madera de pino, bambú y diversos tipos de pastos (Deshavath et al., 2019). De manera adicional, la biomasa de algas y microalgas ha sido propuesta como una materia prima prometedora por su elevada productividad y además que no compite con cultivos alimentarios (**Tabla 5**).

En este contexto, las algas pardas presentan el rango de rendimiento más amplio (12–1128 L/t), seguidas por los pastos marinos (747 L/t) y las microalgas (167–501 L/t). No obstante, materias primas más convencionales como el maíz, los rastrojos de maíz y la paja de trigo también muestran rendimientos consistentes, dentro de un rango de 360 a 460 L/t. Estas diferencias reflejan tanto la naturaleza del sustrato como la eficiencia de los pretratamientos aplicados y las condiciones fermentativas empleadas en cada estudio.

La caña de azúcar, el maíz y la remolacha azucarera son algunas de las materias primas de primera generación más utilizadas para la producción de etanol. Estas presentan ventajas significativas, como un alto rendimiento de azúcares por unidad de área cultivada y procesos de conversión relativamente simples, lo que se traduce en bajos costos de producción. No obstante, una limitación importante de estas materias primas es que también forman parte de la cadena alimentaria humana y animal, por lo que su uso para fines energéticos genera un conflicto ético y económico relacionado con la seguridad alimentaria. Debido a ello, existe un debate sobre si estos recursos debiesen destinarse prioritariamente a la alimentación o a la producción de biocombustibles. A pesar de esta discusión, algunos países, como Estados Unidos y Brasil, han optado por utilizar maíz y caña de azúcar, respectivamente, tanto para el consumo alimentario como para la obtención de etanol, como se describió anteriormente (Jambo et al., 2016; Manochio et al., 2017).

En resumen, a nivel internacional se ha reportado una amplia variedad de materias primas con alto potencial para la producción de bioetanol, su aprovechamiento

depende en gran medida de factores regionales como la disponibilidad de biomasa, el contexto agrícola, las condiciones económicas y las políticas energéticas locales. En este sentido, resulta fundamental analizar cuáles de estas materias primas son accesibles en el territorio nacional, así como los esfuerzos y limitaciones que enfrenta México para consolidar una industria de bioetanol basada en recursos propios.

1.5 Disponibilidad de materias primas en México.

En México se ha propuesto el aprovechamiento de diversas materias primas para la producción de bioetanol, particularmente aquellas disponibles a gran escala como subproductos de actividades agrícolas, forestales e industriales. La **Tabla 6** presenta un resumen de la disponibilidad anual estimada de diferentes residuos orgánicos generados en el país, los cuales han sido considerados como potenciales sustratos para procesos fermentativos.

Como se observa, los rastrojos de maíz, el bagazo de caña de azúcar, paja de trigo y cascara de naranja destacan por su alta disponibilidad, superando el millón de toneladas anuales, lo que los convierte en materias primas particularmente atractivas en términos de operatividad y viabilidad económica. Estos datos son fundamentales para orientar el desarrollo de procesos biotecnológicos enfocados en el aprovechamiento local de biomasa residual.

Tabla 6. Disponibilidad de diferentes tipos de materias primas (Carrillo-Nieves et al., 2019, Hernández et al., 2019 y Sadhukhan et al., 2019).

Materia prima	Disponibilidad (toneladas/año)
Grano de cerveza gastado	661480
Bagazo de agave	*79378 - 114638
Cascara de naranja	2009712
Cáscara de nopal	402645.6
Maíz	*173349 - 658928
Paja de trigo	2984000
Bagazo de caña de azúcar	3752700

Pino de Durango	64020
Rastrojos de maíz	16517310
Pulpa de café	109440
*Valores de producción dependiendo de la locación en México	

La **Tabla 7** recopila algunos estudios realizados en México en los que se evaluó el rendimiento de etanol a partir de distintas materias primas residuales. Estos estudios permiten valorar no solo la disponibilidad de los sustratos, sino también su viabilidad técnica y su eficiencia en términos de conversión bioquímica a etanol.

Con base en lo anterior, se debe priorizar qué residuos agroindustriales pueden escalarse hacia procesos piloto o industriales en función tanto de su disponibilidad como de su rendimiento.

Tabla 7. Estudios reportados en México referentes a la producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales (Carrillo-Nieves et al., 2019).

Materia prima	Rendimiento de etanol
Bagazo de agave azul (<i>Agave tequilana</i> Weber var.)	58 (galón/tonelada métrica)
Bagazo de caña de azúcar	48 (galón/tonelada métrica)
Muestras de residuos de pinos	0.46 ± 0.03 g/g
Residuos de corteza de mango	84,5% de rendimiento teórico

Pese al potencial identificado, la consolidación de la industria del bioetanol en México ha enfrentado diversos obstáculos. En 2008 se promulgó la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, con el objetivo de impulsar fuentes renovables como parte de una estrategia de diversificación energética y sostenibilidad (Diario Oficial de la Federación, 2008). Sin embargo, a pesar de los antecedentes legislativos, el desarrollo del bioetanol en México no ha logrado consolidarse debido a barreras de tipo económico, técnico, regulatorio, social y ambiental, identificadas por instituciones como la CFE, CRE y CENACE (Maciel-Torres, 2024).

En el caso específico del etanol como aditivo oxigenante para combustibles, uno de los principales obstáculos ha sido la falta de actualización de la NOM-016-CRE-2016,

la cual limita su uso a un máximo de 5.8 % en mezclas con gasolina, restringiendo así su integración en el mercado nacional (Comisión Reguladora de Energía, 2016).

En síntesis, México dispone de una abundante variedad de biomasa proveniente de residuos de diferentes industrias con potencial para la producción de bioetanol, de igual manera existen rutas termoquímicas de síntesis, capaces de convertir tanto corrientes fósiles como gas de síntesis obtenido a partir de la propia biomasa disponible. Adicional a la síntesis biológica, está la síntesis química que se describe brevemente en la siguiente sección.

1.6 Síntesis química del etanol.

Existen técnicas termoquímicas para la síntesis de etanol que no requieren microorganismos, como la hidratación del etileno en presencia de catalizadores ácidos (Pang et al., 2019). También se emplean rutas con gas de síntesis (vía ácido acético, oxalato de dimetilo o carbonilación) usando catalizadores heterogéneos, especialmente basados en rodio (Spivey et al., 2007; Shang et al., 2019). Un ejemplo es el catalizador Rh Li Mn/TiO₂, cuya arquitectura favorece la formación de enlaces C–C y la selectividad hacia etanol al estabilizar nanopartículas de rodio con óxidos promotores (Wang et al, 2022).

A pesar del desarrollo de rutas termoquímicas a partir de gas de síntesis, la fermentación microbiana continúa siendo la vía predominante en la producción de etanol. Su relevancia radica en operar bajo condiciones energéticamente favorables (30–40 °C y presión atmosférica), garantizando procesos más sostenibles. Los microorganismos exhiben una alta selectividad en la conversión de azúcares, alcanzando rendimientos cercanos al límite teórico y minimizando subproductos. Además, la fermentación aprovecha de manera directa materias primas renovables y residuos agroindustriales, impulsando la valorización de biomasa local. Estas ventajas tecnológicas y económicas consolidan a la fermentación como la estrategia más eficiente y competitiva frente a alternativas termoquímicas (Tabla 8). La **Tabla 8** resume parámetros clave (productividad, eficiencia energética, costos, etc.) reportados para la producción de etanol que comparan ambas rutas.

Tabla 8. Comparación de resultados de tratamientos biológicos contra termoquímicos para la producción de etanol (Accardi et al., 2015, Aresta 2022 y Foust et al., 2009).

Parámetros	Proceso biológico	Proceso termoquímico
Productividad (L EtOH/tonelada de biomasa seca)	312 - 347.6	203,5 - 303,2
Eficiencia energética %	39 - 53.2	29 – 47
Costo total de producción (USD/L EtOH)	0.65	1.07
Temperatura	Baja	Alta
Presión	Baja	Alta
Energía necesaria	Baja	Alta
Producción de etanol (MM Gal/año)	69.3	61.8

Mu et al. (2010) compararon la producción de etanol de rutas bioquímicas y termoquímicas, considerando distintos escenarios tecnológicos y materias primas a través de un análisis de ciclo de vida. Sus resultados indican que el proceso bioquímico genera menores emisiones netas de gases de efecto invernadero en comparación con los combustibles fósiles. Esta ventaja se atribuye principalmente a la mayor exportación de electricidad asociada al proceso bioquímico, la cual compensa en parte su huella ambiental.

La **Figura 5** ilustra esquemáticamente ambas rutas de conversión: en la vía bioquímica, la biomasa lignocelulósica se somete a pretratamiento y fermentación para obtener etanol, mientras que los residuos se destinan a cogeneración de energía eléctrica. En contraste, la vía termoquímica implica la gasificación de la biomasa, síntesis catalítica de etanol y menor aprovechamiento de subproductos. La mayor aportación de la figura es que, a pesar de la complejidad técnica de la fermentación, esta ruta permite una mayor recuperación energética y una menor carga ambiental, lo que la posiciona como una alternativa más sostenible para la producción de etanol.

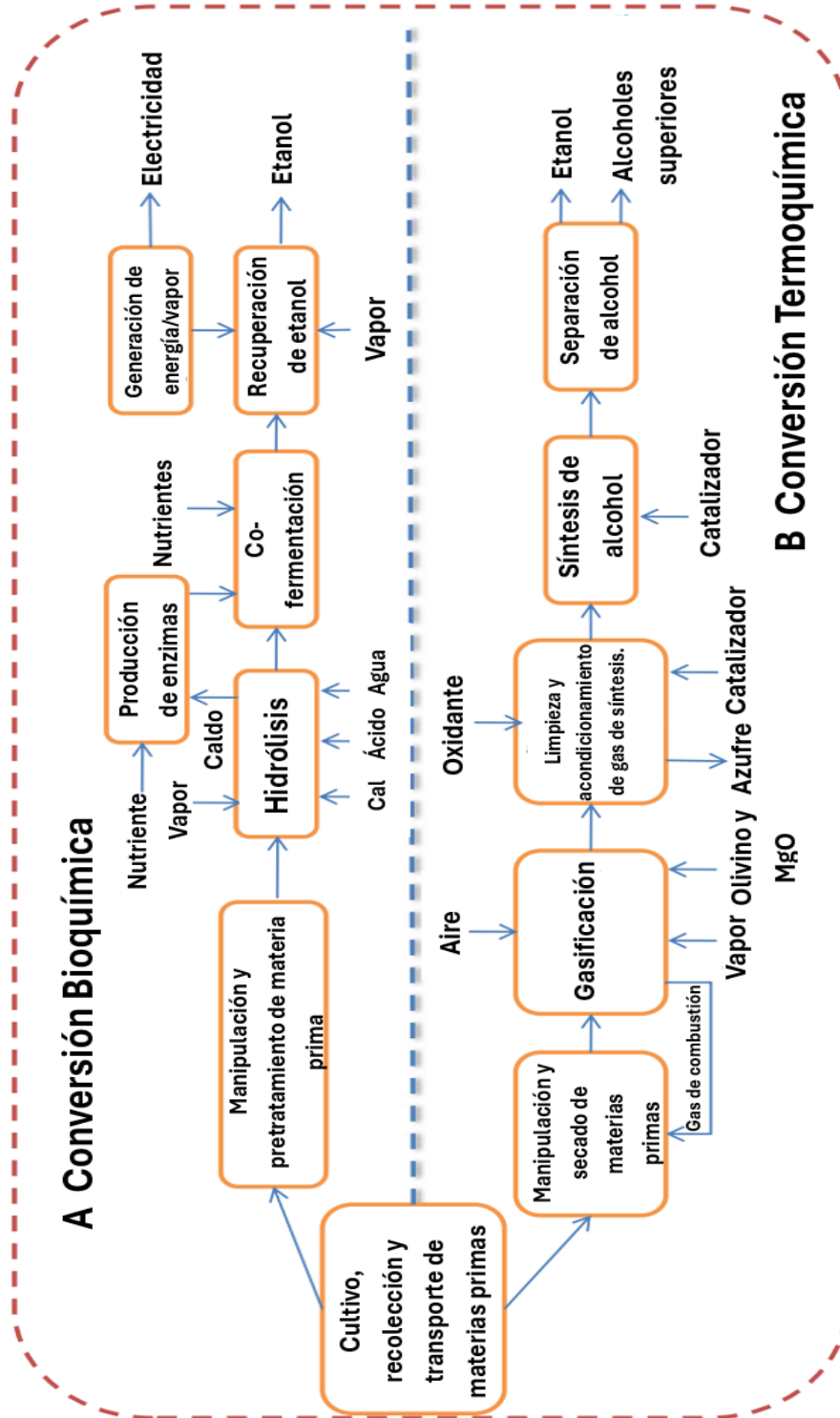


Figura 4. Diagrama esquemático de conversión termoquímica y conversión bioquímica de etanol (Mu et al., 2010).

En los últimos años se han desarrollado tecnologías para la conversión catalítica de etanol, como la reducción electroquímica, la síntesis a partir de dimetil éter, la reacción RWGS y la hidrogenación catalítica (Latif et al., 2023), ampliando su potencial industrial. Paralelamente, la producción de bioetanol se ha optimizado mediante hidrólisis enzimática más eficiente, células inmovilizadas, fermentaciones de muy alta gravedad (VHG), procesos en estado sólido y reactores de membrana (Duque et al., 2021; Senatore et al., 2020; Zabed et al., 2017; Zhang et al., 2019). Asimismo, la valorización de materias lignocelulósicas, el bloqueo de rutas metabólicas y el uso de microorganismos genéticamente modificados han permitido aumentar rendimientos y tolerancia al etanol (Liu et al., 2022). En conjunto, estas innovaciones promueven procesos integrados, sostenibles y competitivos para la producción y aprovechamiento del bioetanol.

La **Tabla 9** muestra diferentes organismos e incluye a cepas de cepas de *Zymomonas mobilis* modificadas con alto potencial en fermentación etanólica. La cepa ZM4(pZB5) fue diseñada para fermentar eficientemente xilosa de hidrolizados lignocelulósicos, mientras que AX101 destaca por su tolerancia a inhibidores como ácido acético y por su elevada productividad (3.54 g/L·h en ausencia de inhibidores). Estas características consolidan a *Z. mobilis* como plataforma prometedora para la producción de bioetanol a partir de materias primas lignocelulósicas abundantes y de bajo costo.

Tabla 9. Lista de microorganismos modificados empleados en la mejora de la producción de etanol (Aditiya et al., 2016).

Microorganismo	Tiempo de operación	Condiciones de operación	Rendimientos
<i>Candida shehatae</i> NCL-3501	24 h	Fermentación por lote, pH 5.5, 30°C y agitación a 150 rpm.	0.45 g/g de azúcar por autohidrólisis
<i>Clostridium thermocellum</i> DSM1313	48 h	Fermentación por lote anaerobia, 55°C, pH 7.0	0.8 g/L a 0.5 g/L celobiosa

<i>Escherichia coli</i> KO11	48 h	Fermentación por lote anaerobia pH 7.0 y 30 °C	31.5 g/L o teóricamente 91.5 %
<i>Escherichia coli</i> FBR5	-	pH 4.5, 32 C	2.25% (w/v)
<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	80 – 120 h	Fermentación por lote bajo condición microaerófila a 0.02 vvm, pH 6.5±0.1, 28±0.5°C y agitación a 350 rpm.	0.35 g _p /g _s
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D5a	96 h	32 °C, pH 4.5	0,58 % (w/v) o 100 % de rendimiento teórico
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 590. E1	96 h	Fermentación por lote, pH 5.0 y 30 °C	63% de etanol teórico
<i>Zymomonas mobilis</i> ZM4(pZB5)	20 – 80 h	Fermentación por lote, pH 5, 30 °C y agitación a 200 rpm.	11 g/L con suplementación con 10 g/L de glucosa
<i>Zymomonas mobilis</i> AX101	45 – 50 h	Fermentación por lote, pH 5.0 o 5.5, 30°C y agitación a 200 rpm	3.54 g/L.h (sin presencia de ácido acético)
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i> BG1L1	24 h (lote), 7 días (continuo)	Fermentación por lote - continuo, pH 7.0, 70°C	0.39–0.42 g/g de azúcares

Los avances en el diseño de cepas como *Z. mobilis* resaltan la relevancia de aprovechar fuentes lignocelulósicas para la producción de bioetanol, un aspecto particularmente importante en el contexto del creciente desafío energético y ambiental a nivel global.

La demanda mundial de energía en 2018 fue de 14,282 millones de toneladas de petróleo equivalente, de las cuales cerca del 88 % provino de combustibles fósiles (Ahmad et al., 2020). Se proyecta que esta demanda aumentará 48 % en los próximos 20 años, impulsada por el crecimiento poblacional, lo que acelerará el agotamiento de reservas fósiles y eleva las emisiones de gases de efecto invernadero (IEA, 2020; Mat

Aron et al., 2020; Moodley et al., 2021). Sin una reducción de las emisiones antropogénicas de CO₂, CH₄, N₂O y SO₂, se prevé un aumento de la temperatura global de hasta 2 °C para 2050 y 4 °C para 2100, así como impactos negativos en seguridad alimentaria, recursos hídricos, salud y ecosistemas, incrementando la vulnerabilidad de bosques a incendios forestales (Yoro et al., 2020). Ante este escenario, la selección de materias primas sostenibles es crucial para la producción de bioetanol. La biomasa lignocelulósica se perfila como alternativa frente a materias primas de primera generación, aunque aún enfrenta desafíos técnicos y ambientales para su implementación a gran escala.

1.7 Consideraciones de las materias primas de segunda generación.

Las materias primas de segunda generación, a pesar de no lidiar con el debate de su utilización como materia prima o alimento sí que cuenta con ciertas desventajas que pueden llegar a disminuir su viabilidad.

Entre los diversos factores que afectan la viabilidad del aprovechamiento de materias primas de segunda generación, uno de los más críticos está relacionado con su estructura química y su composición. En particular, ciertos componentes estructurales de estas biomásas representan una barrera significativa para su conversión eficiente en productos de valor agregado como el bioetanol. Por ello, es esencial examinar con mayor detalle las limitaciones técnicas que impone uno de estos componentes clave: la lignina.

1.7.1 Presencia de lignina

La lignina es uno de los principales obstáculos en el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol, ya que limita el acceso de las enzimas hidrolíticas a la celulosa y hemicelulosa, reduciendo la liberación de azúcares fermentables. Además, provoca adsorción no productiva de enzimas y puede inhibir su actividad, lo que disminuye la eficiencia del proceso y eleva los costos (Yuan et al., 2021; Broda et al., 2022). Para superar esta barrera se han desarrollado métodos de

pretratamiento orientados a reducir el contenido de lignina o modificar su estructura, de modo que se incremente la accesibilidad enzimática y se favorezca la conversión de azúcares fermentables.

1.7.2 Pretratamientos

Las estrategias de pretratamiento de biomasa lignocelulósica se clasifican en métodos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos, cada uno con ventajas y limitaciones. Los métodos físicos, como la molienda y la extrusión, implican altos consumos energéticos; los métodos químicos, basados en el uso de ácidos o álcalis, pueden generar compuestos inhibitorios y requieren equipos resistentes a la corrosión; los métodos fisicoquímicos, como la explosión de vapor y el pretratamiento con amoníaco (AFEX), pueden degradar parcialmente los carbohidratos; y los métodos biológicos presentan bajas tasas de reacción y menores rendimientos de azúcares (Kumar et al., 2020; Singhvi et al., 2019; Zabed et al., 2016). La selección del pretratamiento más adecuado depende de la composición de la biomasa y de la minimización de subproductos que puedan inhibir la fermentación. Además, es fundamental que el microorganismo empleado tenga tolerancia a los compuestos residuales y capacidad de convertir los azúcares liberados en etanol de manera eficiente, siendo *Zymomonas mobilis* un candidato destacado por su alta eficiencia fermentativa.

1.8 *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis es una bacteria Gram negativa anaerobia facultativa, aislada de bebidas fermentadas como el pulque, que destaca como biocatalizador por su alta productividad específica, elevada tasa de consumo de azúcares, conversión casi estequiométrica de glucosa a etanol y CO₂, y menor producción de biomasa en comparación con *S. cerevisiae*. Además, tolera altas concentraciones de azúcares, presenta amplia resistencia a variaciones de pH y puede ser modificada genéticamente para ampliar su rango de sustratos y desacoplar el crecimiento de la producción de

etanol, duplicando la productividad (Baeyens et al., 2015; Nouri et al., 2020; Todhanakasem et al., 2020; Yang et al., 2016). Estos atributos han impulsado el desarrollo de cepas recombinantes capaces de fermentar pentosas, incrementando el aprovechamiento de azúcares de biomasa lignocelulósica (Sarkar et al., 2021; Yang et al., 2020; Zhang, 2007).

1.8.1 Estrategias para la fermentación para *Z. mobilis*

La optimización del proceso de fermentación es determinante para maximizar la producción de bioetanol a escala industrial. Entre las estrategias más empleadas se encuentra la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), que integran la hidrólisis enzimática y la fermentación en un mismo reactor, reduciendo tiempos y costos. Además, se han desarrollado otras plataformas de bioprocesos y métodos de cultivo, como la fermentación en lotes, en lotes alimentados y en cultivo continuo, que han demostrado mejorar los rendimientos de etanol al adaptarse a las características del sustrato y a la fisiología de la cepa empleada (Todhanakasem et al., 2020). La implementación de estas estrategias, junto con la selección adecuada de materias primas, es esencial para mejorar la productividad del proceso, siendo la vaina de mezquite un sustrato con alto potencial por su abundancia y composición.

1.9 Vaina de mezquite para la producción de etanol.

El mezquite (*Prosopis* spp.; Fabaceae) es un árbol leguminoso, ampliamente distribuido en las zonas áridas, semiáridas y subhúmedas de México, particularmente en las tierras altas de San Luis Potosí. Debido a su fijación de nitrógeno y su adaptabilidad a las estaciones de sequía, también proporciona alimento a muchas especies de animales salvajes que se alimentan de su néctar, polen, hojas y vainas (**Figura 6**). Esta planta es una excelente fuente de proteínas, fibra, azúcares y compuestos fitoquímicos como alcaloides, taninos, fenólicos, esteroides, terpenos y

flavonoides. el uso de la vaina de mezquite está dirigido a la alimentación del ganado, la producción de carbón, la extracción de miel, la extracción de caucho, cercas vivas y muebles ornamentales, sin embargo, su uso solo se ha limitado a aplicaciones domésticas. Aunado a esto, el creciente desconocimiento de sus usos por parte de la población ha ocasionado que se le considere un material prácticamente de desecho (Almanza et al., 1986, Pérez-Serrano et al., 2021, Ruiz-Nieto et al., 2020).



Figura 45. Fotografía de las vainas de mezquite (*Prosopis* spp.)

La vaina de mezquite, por su elevado contenido de azúcares, representa una materia prima con alto potencial para la producción de bioetanol. Según Díaz-Batalla et al. (2018) (**Tabla 10**), la composición de azúcares varía según la sección de la vaina, siendo la harina de mesocarpio (MF) la fracción más prometedora al alcanzar 447.8 g/kg, con predominio de sacarosa. De forma complementaria, Aguiar et al. (2020) (**Tabla 11**) reportaron en la harina de vainas un contenido de azúcares totales de 844.0 g/kg de masa seca, incluyendo hexosas fermentables (glucosa y fructosa) y pentosas como xilosa (15.8 g/kg) y arabinosa (11.8 g/kg), relevantes para maximizar la productividad del bioetanol. Asimismo, su aporte de nitrógeno (12.8 g/kg) favorece el crecimiento microbiano, reforzando la viabilidad del mezquite como sustrato renovable.

Tabla 100. Contenido de azúcares en harinas de vaina de *P. laevigata* (g/kg) (Díaz-Batalla et al., 2018).

Muestra	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Xilosa	Total
MF	308.6 ± 4.7	77.6 ± 0.7	47.9 ± 1.1	13.5 ± 0.5	447.8
MSF	256.1 ± 4.2	26.8 ± 0.3	14.3 ± 0.6	7.6 ± 0.2	304.9
SF	69.7 ± 0.6	13.4 ± 0.6	10.8 ± 1.1	1.9 ± 0.0	95.9

MF = harina de mesocarpo; MSF = harina de semilla y mesocarpo; SF = harina de semilla. Valores expresados como la media ± la desviación estándar (n = 3). Medias con la misma letra en la misma columna, indica que no existe diferencia significativa entre muestras ($p < 0.05$)

Tabla 111. Composición química de la harina de vainas de mezquite (Aguilar et al., 2020).

Nutrientes	Contenido (g/kg de masa seca)
N	12.8
Ceniza	60.0
ADF	<30.0
EE	20.0
Azúcares (mono y disacáridos)	≥844.0
Fructosa	88.8
Glucosa	262.9
Rafinosa	<0.05
Sacarosa	492.3
Maltosa	<0.05
Arabinosa	11.8
Fucosa	1.4
Galactosa	7.5
Manosa	<0.05
Ramnosa	2.2
Xilosa	15.8
Pectina (expresada como pectato de calcio)	8.9
Retenido en tamiz ABNT 200 (0.075 mm)	76.02
Retenido en la bandeja inferior (≤0.075 mm)	58.20
Densidad (g/L)	399.98

N = Sustancias nitrogenadas; ADF = Fibra detergente acida; EE = extracto de éter.

El elevado contenido de azúcares y nutrientes de la vaina de mezquite no solo la posiciona como un sustrato ideal para la producción de bioetanol, sino que también abre la oportunidad de relacionar su aprovechamiento con estrategias de desarrollo sostenible. Este enfoque permite integrar el presente proyecto dentro de iniciativas que buscan energía renovable, producción responsable y conservación ambiental.

1.10 Contribución a los Objetivos de Desarrollo Sostenible

Este proyecto de investigación se alinea directamente con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la ONU al proponer un uso innovador y sostenible para la vaina de mezquite, una biomasa con alto potencial. Específicamente, la producción de bioetanol a partir de este sustrato contribuye de la siguiente manera a los ODS 7, 12, 13 y 15 (**Figura 7**):

- ODS 7: Energía asequible y no contaminante. Al transformar los azúcares presentes en la vaina de mezquite en bioetanol, el proyecto promueve directamente el desarrollo de combustibles a partir de fuentes renovables. Esto apoya la meta de aumentar significativamente la proporción de energía renovable en el conjunto de fuentes energéticas globales.
- ODS 12: Producción y consumo responsables. El proyecto revaloriza la vaina de mezquite, un recurso natural abundante y actualmente subutilizado. Al crear un proceso para su aprovechamiento industrial, se fomenta una gestión más eficiente y sostenible de los recursos naturales, convirtiendo lo que a menudo se considera un desecho en una materia prima valiosa y reduciendo el impacto ambiental.
- ODS 13: Acción por el clima. La producción de bioetanol a partir de la biomasa del mezquite ofrece una alternativa a los combustibles de origen fósil. El uso de este bioetanol tiene el potencial de reducir la dependencia de los hidrocarburos y, por consiguiente, mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero que contribuyen al calentamiento global.
- ODS 15: Vida de ecosistemas terrestres. El mezquite es una especie clave en los ecosistemas áridos y semiáridos. Al generar un valor económico sostenible a partir de su vaina sin comprometer la integridad del árbol, se crea un incentivo para la conservación y el manejo sostenible de los mezquites. Este enfoque promueve la relevancia de la especie no solo desde una perspectiva ambiental,

sino también económica y social, contribuyendo a la protección de la biodiversidad y a la lucha contra la desertificación.



Figura 56. Alineación de la investigación a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

1.11 Optimización de procesos

La producción de metabolitos y el crecimiento microbiano se ven fuertemente afectados por la composición del medio, como las fuentes de carbono y nitrógeno y los oligoelementos, además de las condiciones de cultivo como la aireación y agitación, el pH, el tiempo de incubación y la temperatura. Por lo tanto, se requiere la evaluación y escrutinio del efecto de estos factores para mejorar la producción de metabolitos en los microorganismos. La estrategia de optimización de estos factores es esencial para la ingeniería de bioprocesos, que se logra mediante métodos clásicos de un factor a la vez (OFAT) o métodos estadísticos (Breig et al., 2021). Entre las estrategias estadísticas mencionadas, la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) destaca como una de las herramientas más eficientes para optimizar bioprocesos, ya que permite evaluar el efecto de múltiples factores y sus interacciones simultáneamente. Este enfoque se describe en detalle a continuación.

1.11.1 Metodología de superficie de respuesta y Diseño Box-Behnken

Los principales métodos para la optimización de variables de respuesta son: metodología de superficie de respuesta (MSR) y diseño robusto de Taguchi. En la metodología de superficies de respuesta (RSM), los modelos se construyen a partir de datos en un diseño experimental, describiendo la relación entre los factores

(parámetros independientes) y la respuesta (parámetro dependiente). Estos modelos (correlacionales) se utilizan para evaluar la influencia de los factores, las interacciones sobre la respuesta y la optimización del proceso.

Para construir estos modelos de manera eficiente, la MSR se apoya en diferentes tipos de diseños experimentales. Los más notables son el Diseño Compuesto Central (DCC) y el Diseño Box-Behnken (DBB). El DCC es muy utilizado y se caracteriza por su flexibilidad, utilizando puntos factoriales, axiales y centrales para construir un modelo cuadrático robusto. Por su parte, el Diseño Box-Behnken presenta ventajas significativas: generalmente requiere un menor número de corridas experimentales que un DCC para la misma cantidad de factores (típicamente de 3 a 5) y, crucialmente, evita las combinaciones de todos los factores en sus niveles extremos (altos o bajos). Esta última característica es de gran valor práctico, pues previene la realización de experimentos en condiciones extremas que pueden ser inviables, costosas o degradar el producto de interés disminuyendo la eficiencia del diseño experimental.

En general, los resultados se describen mediante un gráfico 3D o un gráfico de contorno 2D. El uso de la metodología de superficies de respuesta como herramienta de optimización requiere varias etapas que involucran, en primer lugar, la elección de los factores, el método de experimentación, la selección del modelo adecuado, la verificación de la adecuación del modelo, la representación del modelo mediante un gráfico y finalmente la optimización para obtener la condición óptima (Breig et al., 2021). La MSR ofrece la ventaja de reducir el número de combinaciones posibles, ya que utiliza solo una fracción del número total de combinaciones entre factores.

1.11.2 Diseño Box-Behnken

Estos diseños se recomiendan cuando el número de factores y niveles es pequeño. Es una combinación de un diseño factorial con bloques incompletos, ya que no posee puntos en los vértices del cubo definido para los límites inferior y superior de cada factor, que es deseable cuando los extremos son difíciles de analizar. En la **Figura 8** los ejes representan el rango de operación de cada factor a evaluar (desde su nivel

bajo, -1, hasta su nivel alto, +1). Los puntos indican las combinaciones experimentales que se deben realizar:

- Punto central (azul): Representa el experimento donde todos los factores se encuentran en su nivel intermedio (0).
- Puntos en los bordes (rojo): Representan los experimentos donde un factor se mantiene en su nivel intermedio (0), mientras los otros dos se combinan en sus niveles extremos (-1 y +1). La principal ventaja visualizada en este esquema es la ausencia de puntos en los vértices del cubo, lo que significa que se evitan las combinaciones simultáneas de todos los factores en sus niveles extremos, una condición que, como se mencionó en el texto, puede ser costosa o difícil de analizar en la práctica.

La ventaja de este diseño es que reduce el número de experimentos necesarios para evaluar los efectos de los factores sobre la variable de respuesta y este número de experimentos es mucho menor a los experimentos que se realizarían mediante los diseños factoriales. Este tipo de diseño es seleccionado cuando existe información de los factores que afectan y rangos que limitan el crecimiento de los microorganismos ya que pueden ajustarse a un sistema con restricciones en temperatura, pH, fuentes de nutrientes entre otros.

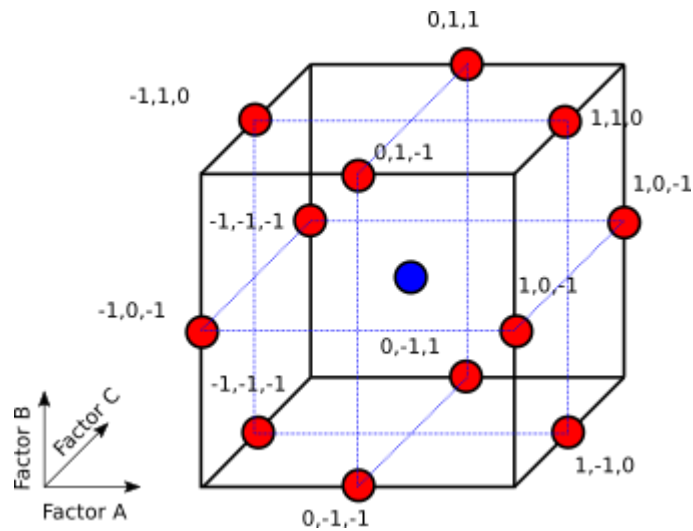


Figura 7. Representación esquemática de un diseño experimental Box-Behnken para tres factores.

2 Antecedentes

Li et al., 2019 evaluaron el comportamiento fermentativo de *Z. mobilis* 8b bajo distintas condiciones nutricionales y densidad inicial del inoculo para evaluar su efecto en la producción en etanol. Los autores observaron que la bacteria presentó un crecimiento significativamente mayor en medio YP con glucosa (YPG) que en medio con xilosa (YPX), a concentraciones de 60 y 90 g/L de glucosa, la densidad óptica alcanzó valores de 6.7 y 9.1 con 60 y 90 g/L de glucosa, respectivamente, mientras que con las mismas concentraciones de xilosa los valores fueron de 3.9 y 5.4, es decir, aproximadamente 1.7 veces menores. En todos los ensayos con glucosa, se consumió completamente, con rendimientos metabólicos superiores al 94.5 %, indicando que concentraciones inferiores a 120 g/L de glucosa no afectan significativamente su conversión a etanol. En contraste, el consumo de xilosa es indirectamente proporcional a la su concentración inicial, siendo el valor de 90 g/L de xilosa lo que se traduce en un 89% de conversión, debido a la acumulación de etanol y a la generación de intermediarios tóxicos como el xilitol.

En medios con mezclas de azúcares (glucosa 120 g/L y xilosa 60 g/L), el consumo de xilosa se redujo hasta 38 %, reflejando una inhibición asociada tanto a la presencia de glucosa como al incremento en la concentración de etanol. Al evaluar el efecto de la densidad celular inicial, los autores encontraron que una $OD_{600} = 4.0$ mejoró el consumo de xilosa hasta 64.8 % y elevó el rendimiento metabólico a 97.6 % de etanol, sin observarse incrementos posteriores a mayores densidades. Este comportamiento sugiere que la influencia de fenómenos de *quorum sensing* característicos de bacterias Gram negativas, los cuales favorecen la eficiencia fermentativa a altas densidades celulares.

Posteriormente, al estudiar la influencia de la fuente de nitrógeno (extracto de levadura y triptona), se observó que al incrementar estos componentes de 2.5/5 g/L hasta 5/10 g/L se elevó el consumo de xilosa de 73.5 % a 95.8 % y la concentración de etanol a 45.7 g/L, con un rendimiento metabólico de 96.9 %. Un aumento adicional de nutrientes no mejoró significativamente el desempeño, lo que indicó que 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de triptona son condiciones suficientes para la fermentación eficiente de mezclas de glucosa y xilosa. Estos resultados evidencian que la composición del medio, en especial su contenido de nitrógeno ejerce un papel determinante sobre la velocidad de consumo de azúcares y la productividad en etanol de *Z. mobilis* 8b.

3 Justificación

Considerando la vasta extensión de mezquite (*Prosopis* spp.) en México, estimada en 4 millones de hectáreas con una producción de hasta 4.5 ton/ha (Andrade-Montemayor et al., 2011), y el hecho de que su vaina es una materia prima de fácil acceso y bajo valor agregado, el desarrollo de este proyecto se justifica desde diferentes perspectivas.

Este trabajo permitiría a México desarrollar una alternativa para la producción de bioetanol a partir de un recurso nativo y abundante en sus regiones áridas y semiáridas; un claro ejemplo es el estado de San Luis Potosí, donde estos ecosistemas cubren el 71% del territorio y cuya producción media de vaina de

mezquite (*Prosopis laevigata*) en el altiplano se ha estimado en hasta 3.7 toneladas por hectárea (García-López et al., 2019). Esto contribuye a la diversificación de la matriz energética nacional con un compuesto, obtenido a partir de una materia prima de primera generación, con potencial de utilizarse como combustible renovable que, a diferencia de otras materias primas de primera generación, no compite de manera significativa con cultivos destinados a ser utilizados como alimento.

Adicionalmente, la transformación de la vaina de mezquite, cuyo uso actual se centra mínimamente en la alimentación y el forraje para ganado (Almanza et al., 1986), en productos de alto valor agregado como el bioetanol, impulsaría el desarrollo económico en regiones rurales y semiáridas del país. Desde una perspectiva biotecnológica, la optimización de la fermentación con *Zymomonas mobilis* constituye una aportación relevante, al validar su eficiencia en el aprovechamiento de un sustrato no convencional como la harina de vaina de mezquite. Este avance genera conocimiento aplicado de alto valor para el desarrollo de biotecnologías sostenibles en el país. Por lo tanto, la relevancia de esta investigación trasciende la mera utilización de un recurso. Representa una oportunidad tangible para fortalecer la seguridad energética de México, fomentar la economía de sus zonas áridas y generar nuevas soluciones tecnológicas para la industria del bioetanol.

3. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Producir etanol bajo condiciones controladas a partir de vaina de mezquite con el fin de utilizar un producto subutilizado como materia prima utilizando *Z. mobilis* como biotransformador.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de azúcares presentes en la materia prima.

- Evaluar y comparar el comportamiento cinético de *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* durante la fermentación de la HVM, contrastando su capacidad de aprovechamiento de este sustrato.
- Convertir los azúcares fermentables a etanol de acuerdo con el diseño de experimentos, siendo los factores de diseño la temperatura, el pH y la concentración inicial de azúcares y la concentración inicial de sulfato de amonio.
- Escalar de nivel matraz a nivel reactor la producción de etanol con las condiciones que maximicen la producción de etanol utilizando *Z. mobilis*

5 Metodología

5.1 Obtención del macerado de harina de vaina de mezquite

La obtención del macerado a partir de harina de vaina de mezquite (HVM) se realizó siguiendo la metodología descrita por Vaheed et al. (2011) y Yalimkaya et al. (2022), con algunas modificaciones. La HVM se maceró en agua destilada ajustando la relación agua/harina para controlar la concentración de sólidos solubles totales (°Brix). La mezcla se mantuvo en agitación constante durante 200 min a 24 °C (temperatura ambiente) y posteriormente se filtró con tela fina, seguida de una centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró nuevamente con papel filtro y bomba de vacío. Finalmente, el macerado fue pasteurizado a 63 °C por 30 minutos (Bhadekar et al. 2019, Deak 2013, Dubey et al. 2022; Kelly et al. 2022), y se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su utilización. En paralelo, se cuantificó el contenido de nitrógeno total en la HVM y en el macerado final mediante el método de micro-Kjeldahl (**Anexo 9.1**). Asimismo, se preparó un segundo macerado bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura, que fue pasteurizado, como se describió anteriormente.

5.2 Cuantificación de azúcares

La determinación de azúcares totales en el extracto se realizó con un refractómetro digital, utilizando 300 μL de muestra para cada medición. Para los azúcares reductores se aplicó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959), el cual se basa en la oxidación del grupo aldehído del azúcar a un grupo carboxílico, acompañada de la reducción de un grupo nitro del DNS a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, de color rojo-marrón. La intensidad de este color, proporcional a la concentración de azúcares reductores, se midió en un espectrofotómetro a 540 nm. La cuantificación se efectuó mediante interpolación en una curva de calibración elaborada con soluciones estándar de glucosa de concentraciones conocidas. Para el ensayo, se tomaron alícuotas de 100 μL del macerado, previamente diluido 1:200 en agua destilada, y se adicionaron 100 μL del reactivo DNS en tubos Eppendorf. La mezcla se incubó a 95 °C durante 4 min en un termociclador y posteriormente se enfrió a 4 °C para detener la reacción.

Finalmente, la concentración de azúcares reductores se determinó midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva de calibración, previamente estandarizada con dextrosa como azúcar patrón (**Anexo 9.2**), para calcular la concentración final. Para el análisis del macerado que contenía los sólidos de la HVM, la preparación de la muestra requirió un paso previo de separación. Se tomaron alícuotas de 1 mL, las cuales se centrifugaron a 13,000 rpm. El sobrenadante resultante fue cuidadosamente separado y, a partir de este, se realizó la cuantificación de azúcares reductores aplicando el mismo protocolo de DNS descrito anteriormente.

5.3 Cultivo de *Z. mobilis*

La cepa de *Zymomonas mobilis* que se utilizó para la conversión de azúcares en etanol es una cepa comercial adaptada para consumir xilosa y fue proporcionada por el laboratorio de Ingeniería de Biorreactores de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Para asegurar la viabilidad de la cepa a lo largo del proyecto, se estableció un protocolo para la propagación y manejo de las cepas de trabajo. Este consistió en la resiembra mensual de *Z. mobilis* en un medio líquido, formulado con las concentraciones de nutrientes recomendadas por el proveedor (**Tabla 12**). A partir de una muestra del cultivo en medio sólido, se inoculó el medio líquido y se incubó durante 24 h a 30°C. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1 mL de este cultivo líquido para sembrar dos cajas Petri con medio sólido, las cuales se incubaron por 24 h a 30°C. Transcurrido este periodo, las placas se almacenaron a 4°C hasta la siguiente resiembra.

Tabla 122. Medio de cultivo para *Z. mobilis* (Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, 2007).

Reactivo	Cantidad
KH ₂ PO ₄	1 g
(NH ₄)SO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g
Agua	1000 mL
pH	6
Esterilización a 121°C durante 15 min	

5.4 Ensayos de fermentación *Z. mobilis* vs *S. cerevisiae*

Se realizaron ensayos para determinar la cantidad de etanol que produce *Zymomonas mobilis*, las soluciones se prepararon de acuerdo con la formulación propuesta por Li et al, 2019. Como control positivo se utilizó una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (SafTeq) cultivada en medio YP y como control negativo se utilizó el medio para *Z. mobilis* sin el microorganismo. La cantidad de azúcares reductores presentes en las soluciones para ambos microorganismos fue de 135 g/L; 90 g/L de dextrosa y 45 g/L de xilosa para *Z. mobilis* y 135 g/L de dextrosa para *S. cerevisiae*. La

composición de los medios definidos para cada caso se muestra en la **Tabla 13**, cada medio definido se separó en dos soluciones para su esterilización, la primera conteniendo la fuente de carbono (dextrosa y xilosa para *Z. mobilis* y dextrosa para *S. cerevisiae*) y la segunda la fuente de nitrógeno (triptona y extracto de levadura) con la finalidad de evitar la caramelización de los azúcares presentes en el medio durante la esterilización. El pH inicial del medio fue de 5.5 para *Z. mobilis* y 6.0 para *S. cerevisiae*. El inóculo de *S. cerevisiae* fue de 0.025–0.05 g/100 mL ($OD_{600} = 5$), mientras que para *Z. mobilis* se realizó un precultivo para alcanzar $OD_{600} = 4$. Los ensayos se llevaron a cabo en frascos de anaerobiosis con 100 mL de volumen de trabajo, a 30 °C, 150 rpm y muestreo a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 h para evaluar las cinéticas de consumo de azúcares, crecimiento celular (OD_{600} , peso húmedo) y producción de biomasa. Se realizaron pruebas adicionales sustituyendo la fuente de carbono por extracto de vaina de mezquite (13.5 °Brix). Todos los ensayos se efectuaron por triplicado y los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar. El análisis estadístico incluyó ANOVA y prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$, utilizando Minitab™ v19.

Tabla 133. Composición de medios definidos. El medio para *Z. mobilis* 8b fue adaptado del propuesto por Li et al, 2019, mientras que el medio para *Saccharomyces cerevisiae* corresponde a una formulación YP estándar (Sherman, F., 2002), suplementada con dextrosa.

	<i>Z. mobilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Reactivo	g/L	g/L
Dextrosa	90	135
Xilosa	45	
Extracto de levadura	5	10
Triptona	10	20

5.5 Generación de biomasa previo a la fermentación

Para la fermentación Fed-Batch en un biorreactor de 1.5 L, se cultivó *Z. mobilis* previamente en 200 mL de medio de cultivo cuya composición se detalla en la **Tabla 14**. La composición del medio de cultivo para la generación de biomasa necesaria para los ensayos de fermentación se muestra en la **Tabla 15** de acuerdo con la formulación propuesta reportada por Li et al, (2019). La OD₆₀₀ inicial propuesta fue de 6.6, 150 rpm, 30°C y pH de 5.8 y un volumen de trabajo inicial de 500 mL. El oxígeno al interior del biorreactor fue depletado con nitrógeno durante 5 minutos. Se alimentaron 200 mL de medio a las 24 y 48 h y 100 mL a las 72 h. El tiempo total de cultivo fue de 96 h y la toma de muestra se realizó a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 h y se construyó una cinética de consumo de azúcares, producción de biomasa y concentración de etanol. Tras finalizar el tiempo de cultivo se recuperó el medio y se separó la biomasa del sobrenadante mediante centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se inocularon los frascos de anaerobiosis para alcanzar la densidad óptica necesaria acorde al diseño de experimentos (DOE).

Tabla 144. Composición de medio de cultivo (Li et al, 2019).

Reactivo	Concentración g/L
Dextrosa	50
Xilosa	20
KH ₂ PO ₄	2
Extracto de levadura	10
Triptona	20

Tabla 155. Composición de medio definido para *Z. mobilis* (Li et al, 2019).

Reactivo	Concentración g/L
Dextrosa	60
Xilosa	30
Extracto de levadura	10

Triptona	20
-----------------	----

5.6 Fermentación para los ensayos del diseño de experimentos

Para optimizar la producción de etanol con *Z. mobilis* a partir de vaina de mezquite se implementó un diseño experimental Box-Behnken con 27 ensayos (**Tablas 16 y 17**), evaluando como factores la concentración inicial de azúcares, el pH, la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) y la cantidad de inóculo (OD_{600}), cada una en tres niveles: inóculo (4, 6 y 8 OD_{600}), sulfato de amonio (5, 7.5 y 10 g/L), sacarosa (100, 150 y 200 g/L) y pH (4, 5 y 6). Se incluyeron controles positivo y negativo, y la maceración de la harina permitió trabajar con la fase líquida conservando los sólidos para favorecer la adhesión de *Z. mobilis*. Los resultados se analizaron mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con Minitab™ v19, ajustando a un modelo polinómico de segundo orden mediante el método de mínimos cuadrados y evaluando su significancia con ANOVA ($p < 0.05$). El modelo validado permitió generar superficies de respuesta y determinar numéricamente las condiciones óptimas que maximizan la producción de etanol.

Tabla 166. Tabla de diseño Box-Behnken: factores y niveles

Factor	Símbolo	Niveles codificados		
		-	0	+
OD_{600}	X_1	4	6	8
Sulfato de amonio (g/L)	X_2	5	7.5	10
Concentración de sacarosa (g/L)	X_3	100	150	200
pH	X_4	4	5	6

Tabla 17. Diseño experimental Box-Behnken niveles codificados

Factores

Corrida	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	0	0	-	+
2	0	-	+	0
3	-	+	0	0
4	0	0	+	-
5	-	0	+	0
6	-	0	-	0
7	0	-	0	+
8	0	+	0	-
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	+	0	+
12	+	0	-	0
13	0	+	-	0
14	0	0	0	0
15	-	0	0	-
16	0	-	0	-
17	+	-	0	0
18	+	0	+	0
19	0	-	-	0
20	+	0	0	+
21	0	+	+	0
22	+	0	0	-
23	0	0	+	+
24	-	-	0	0
25	-	0	0	+
26	0	0	-	-
27	+	+	0	0

5.7 Fermentación en biorreactor

Se realizó una fermentación en biorreactor de acuerdo con las condiciones optimizadas obtenidas por la metodología de superficie de respuesta. El tiempo de fermentación fue de 96 h. Adicionalmente se construyó una cinética de crecimiento celular, consumo de azúcares y producción de etanol. Se tomaron muestras cada 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas durante el tiempo de fermentación. Las muestras se centrifugaron y se separaron del sobrenadante. El pellet utilizó para construir la curva de peso húmedo. Los azúcares se cuantificaron por medio de medición en refractómetro y prueba de DNS y la producción de etanol por HPLC.

5.8 Destilación y cuantificación de etanol producido

Para la cuantificación del etanol producido la biomasa y los sólidos residuales de la HVM se separaron del medio definido mediante centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos en un equipo Centurion.

Posteriormente, el sobrenadante recuperado se sometió a una destilación simple, manteniendo la temperatura a 78°C durante 30 minutos para separar el etanol.

Finalmente, la concentración de etanol en el destilado fue cuantificada por HPLC. Este análisis se realizó en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

6 Resultados y discusión

6.1 Consumo de azúcares y viabilidad celular de *Z. mobilis* durante el proceso fermentativo.

Para la generación de la biomasa necesaria para los ensayos posteriores, se monitoreó el crecimiento de *Z. mobilis* y el consumo de azúcares en biorreactor.

En la **Figura 9** se presenta la cinética de consumo de azúcares reductores a lo largo del tiempo. Se observó un comportamiento diáuxico en el consumo durante las primeras 24 horas, caracterizado por dos fases distintas. La primera fase, que transcurrió durante las primeras 6 horas de cultivo, fue la de mayor actividad, con una velocidad de consumo de sustrato de 8.22 ± 0.97 g/(L h). Posteriormente, la segunda fase (de 6 a 24 horas) presentó una velocidad de consumo menor, de 0.82 ± 0.13 g/(L h). La determinación detallada de las velocidades de consumo de azúcares reductores se encuentra disponible en los **Anexos 9.3 y 9.4**.

Antes de cada realimentación del biorreactor (a las 24, 48 y 72 horas), la concentración de azúcares se redujo, siendo la mínima concentración de azúcares cercanos a los 20

g/L indicando un consumo importante del sustrato disponible. Tras cada adición de sustrato, *Z. mobilis* reanudó el consumo de manera inmediata, demostrando la robustez y viabilidad del cultivo a lo largo de las 96 horas del proceso.

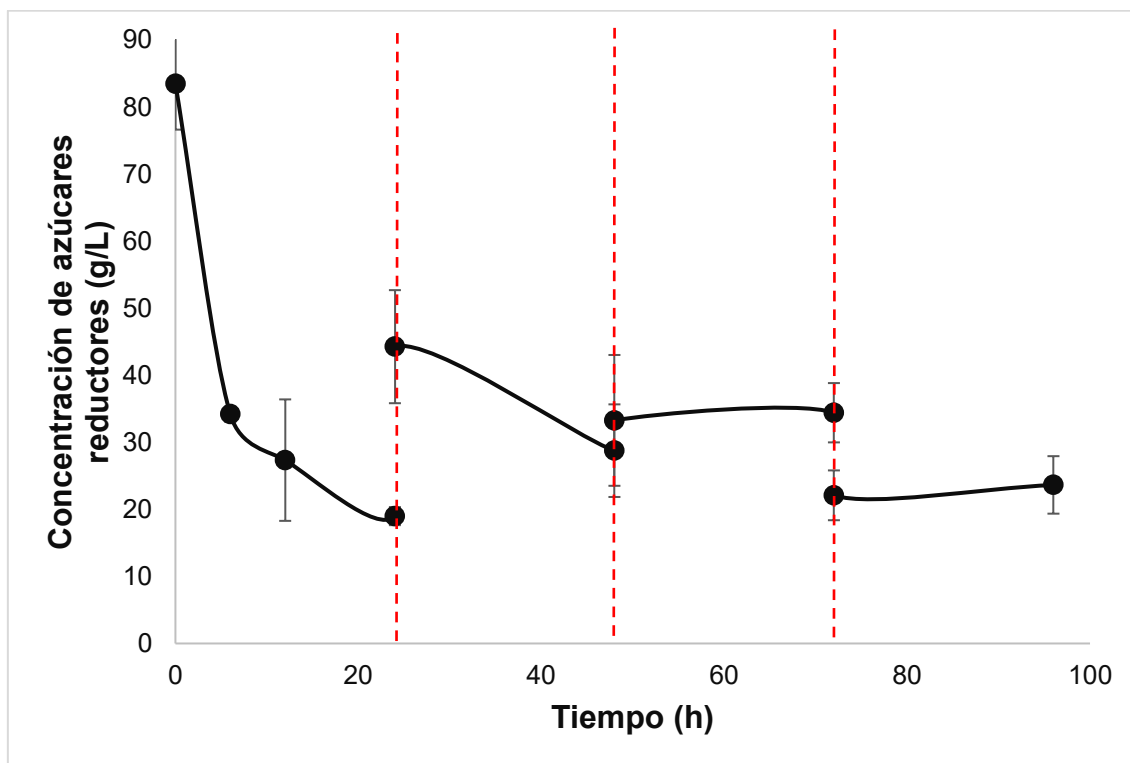


Figura 8. Cinética de consumo de azúcares reductores por *Z. mobilis* en cultivo Fed-Batch para generación de biomasa.

6.2 El crecimiento acelerado de *Z. mobilis* en condiciones controladas

Los resultados indican que *Z. mobilis* alcanzó una biomasa máxima destacable, reflejando un crecimiento eficiente bajo las condiciones experimentales. Durante las primeras 6 h, el cultivo exhibió una fase logarítmica, alcanzando una densidad óptica (OD_{600}) máxima de 9.9 (**Anexo 9.5**), seguida de una fase estacionaria sin incremento adicional de biomasa. La **Figura 10** confirma este comportamiento mediante la medición de biomasa en peso húmedo, con un máximo de 26.7 g/L. A partir de estos datos se calcularon parámetros cinéticos relevantes: la productividad volumétrica de biomasa alcanzada fue de $2.25 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$, mientras que la velocidad específica de

crecimiento fue de 0.118 h^{-1} . Estos hallazgos evidencian el potencial de *Z. mobilis* para alcanzar altos niveles de crecimiento celular en tiempos cortos, información crucial para la optimización de modelos cinéticos y procesos fermentativos industriales. La velocidad específica de crecimiento (μ) determinada en este trabajo, calculada a partir de biomasa húmeda durante la fase exponencial de cultivo en biorreactor, resultó inferior a la reportada en estudios previos. Herrera et al. (2021) calcularon μ a partir de la pendiente de $\ln(\text{densidad celular})$ vs. tiempo utilizando $\text{OD}_{600\text{nm}}$, obteniendo un valor de $0.47 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ para la cepa ZM4 BXL en medio RM modificado a 30°C y 200 rpm, bajo condiciones óptimas de disponibilidad de sustrato. De manera similar, Zikmanis et al. (1997) reportaron valores de μ superiores a 0.4 h^{-1} para *Z. mobilis* ATCC 29191 en condiciones aeróbicas y con adecuada aireación. Las diferencias observadas pueden atribuirse a las metodologías empleadas, ya que el uso de biomasa húmeda puede subestimar el crecimiento celular por el contenido de agua en la muestra, y a las condiciones de cultivo, que en este estudio no fueron diseñadas para maximizar la tasa de crecimiento sino para generar biomasa suficiente para los ensayos posteriores de fermentación. Estos resultados, por tanto, se consideran representativos de un crecimiento controlado y estable, adecuado para la obtención de inóculo en las condiciones experimentales propuestas.

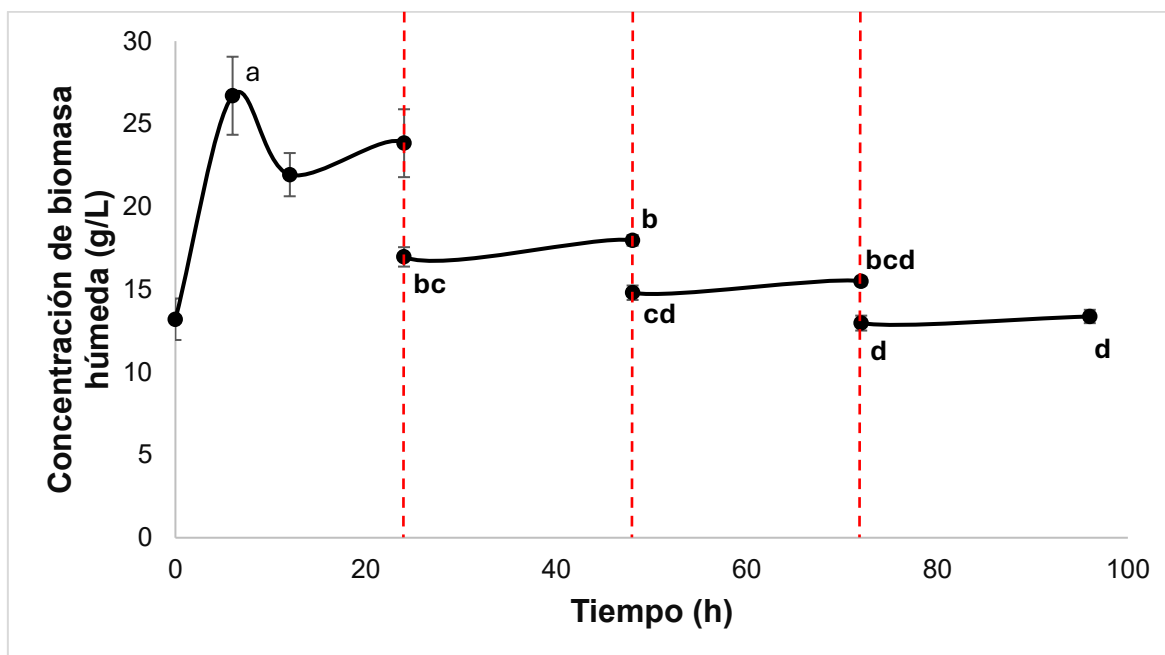


Figura 9. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* para generación de biomasa. Medias con la misma letra, indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las concentraciones de biomasa húmeda, de acuerdo con la prueba de Tukey.

En conjunto, los resultados de la cinética de crecimiento y del consumo de sustrato en el biorreactor demuestran que *Z. mobilis* presentó un patrón caracterizado por una fase exponencial breve presente en las primeras 6 horas de cultivo, seguida de una rápida entrada a la fase estacionaria. La coherencia entre las mediciones de densidad óptica y biomasa húmeda confirma la validez de las fases observadas, mientras que la respuesta inmediata del cultivo tras cada realimentación pone de manifiesto su viabilidad y robustez durante las 96 horas de operación. Las velocidades de consumo de azúcares de *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* son estadísticamente equivalentes en medio definido y HVM

En la **Figura 11** se presenta la comparación de las cinéticas de consumo de azúcares reductores para *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* en el medio definido y en la HVM. El análisis de varianza aplicado a las velocidades de consumo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro sistemas evaluados ($F = 1.19$; $p =$

0.375). De acuerdo con la prueba de Tukey, todos los tratamientos quedaron agrupados en la misma categoría, confirmando que las velocidades de consumo fueron estadísticamente equivalentes. La determinación detallada de estas velocidades de consumo de azúcares se encuentra disponible en los **Anexos 9.6, 9.7, 9.8 y 9.9**.

A pesar de la equivalencia estadística en las velocidades promedio, los perfiles cinéticos revelaron comportamientos distintos. En la HVM, se observó que el consumo por *Z. mobilis* fue más rápido, comenzando con aproximadamente 29 g/L de azúcares reductores y consumiendo los azúcares hasta su mínimo (5.4 g/L aproximadamente) en 6 horas, mientras que a *S. cerevisiae* le tomó 12 horas comenzando con 26 g/L hasta un mínimo de 3.6 g/L aproximadamente. En contraste, en el medio definido, *S. cerevisiae* demostró un consumo más completo, continuando hasta las 24 horas y alcanzando un mínimo de aproximadamente 3 g/L de azúcares remanentes; por su parte, *Z. mobilis* detuvo su consumo a las 12 horas, dejando cerca de 30 g/L de azúcar sin consumir.

Estos resultados demuestran la excelente capacidad de la HVM de utilizarse como sustrato, ya que permite velocidades de fermentación estadísticamente indistinguibles de las obtenidas en un medio de cultivo ideal. La ausencia de diferencias estadísticas, a pesar de las distintas cinéticas, refleja que ambos microorganismos presentan eficiencias comparables en el aprovechamiento de azúcares tanto en el medio enriquecido como en la HVM.

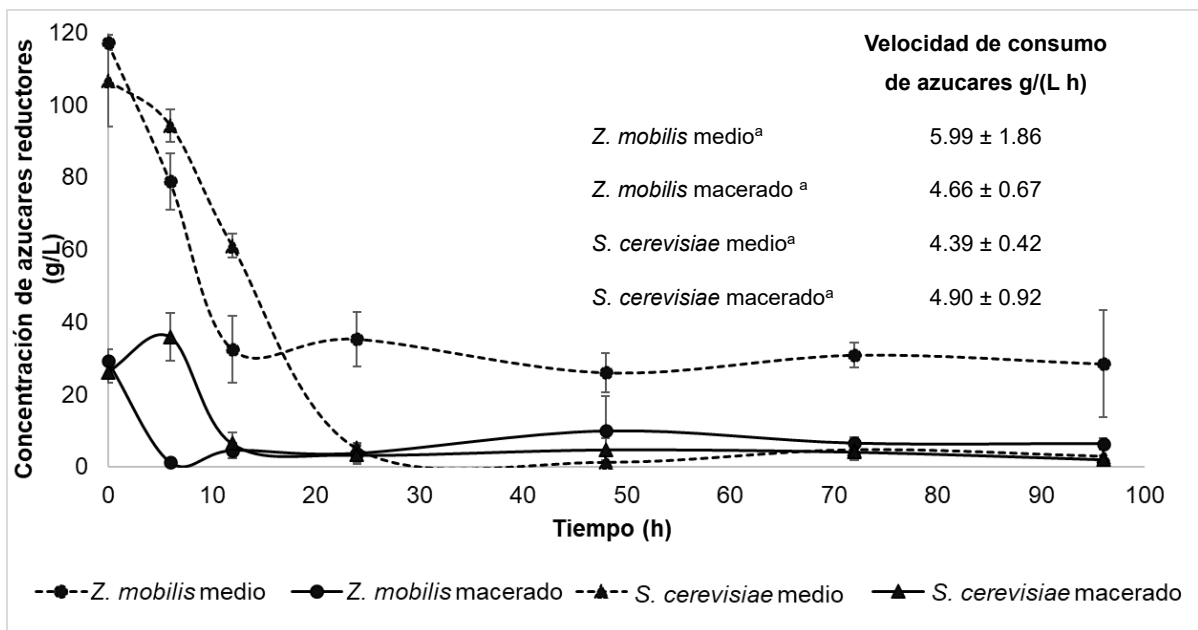


Figura 10. Cinéticas de consumo de azúcares reductores para *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* en el medio definido y en HVM. Medias con la misma letra, indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las velocidades de consumo de azúcares, de acuerdo con la prueba de Tukey.

En el **Anexo 9.10** se compara la cinética de consumo de sólidos solubles totales, expresados como g/L de sacarosa equivalente, para *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* en la HVM. El análisis de varianza aplicado a las velocidades de consumo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos microorganismos ($F = 1.17$; $p = 0.340$), y la prueba de Tukey confirmó este resultado al agrupar ambos tratamientos en la misma categoría. La determinación detallada de estas velocidades de consumo de azúcares se encuentra disponible en los **Anexos 9.11 y 9.12**.

No obstante, a pesar de la equivalencia estadística en las velocidades promedio, los perfiles cinéticos revelaron estrategias de consumo marcadamente diferentes. *Z. mobilis* demostró un consumo inicial más rápido, disminuyendo los sólidos solubles totales hasta aproximadamente 77 g/L en solo 6 horas; sin embargo, a partir de ese punto cesó el consumo y mantuvo dicha concentración constante hasta las 96 horas de fermentación. En contraste, a *S. cerevisiae* le tomó 12 horas alcanzar una

concentración similar, pero continuó con la metabolización de azúcares hasta las 24 horas, logrando una mayor reducción al alcanzar una concentración final de aproximadamente 68 g/L.

Otro aspecto relevante fue la variabilidad de los datos: *Z. mobilis* presentó una cinética uniforme y reproducible en sus tres réplicas ($9.67 \pm 0 \text{ g (L h)}^{-1}$), mientras que *S. cerevisiae* mostró una mayor dispersión ($9.05 \pm 0.98 \text{ g (L h)}^{-1}$). El hecho de que ambos microorganismos alcanzaran velocidades de consumo elevadas confirma que la HVM es una fuente de nutrientes eficiente. En conclusión, aunque *Z. mobilis* es más rápido inicialmente, *S. cerevisiae* es constante en el consumo de azúcares a lo largo de la fermentación, evitando dejar azúcares sin fermentar en la HVM.

6.3 El crecimiento inicial de *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* en HVM en comparación con medio definido

La cinética de crecimiento de *Z. mobilis* (**Anexo 9.13**) mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el medio definido de fermentación y la HVM, según la prueba de Tukey, en los tiempos de 0, 6, 12, 24 y 96 h, siendo la HVM la que presentó valores de densidad celular más altos. En los tiempos de 48 y 72 h no se observaron diferencias significativas, indicando que ambos sustratos sostuvieron un crecimiento equivalente en ese intervalo. Esto refleja una ventaja inicial de la HVM en términos de densidad celular, aunque hacia las fases finales las diferencias se igualan y reaparecen a las 96 h, donde la densidad sigue siendo mayor en HVM.

En el caso de *S. cerevisiae* (**Anexo 9.14**), no se encontraron diferencias a 0 y 6 h, lo que sugiere un arranque similar en ambos sustratos y un tiempo de adaptación mayor que en *Z. mobilis*. Sin embargo, se observaron diferencias significativas a 12, 72 y 96 h, con valores superiores en la HVM, alcanzándose la mayor densidad celular a las 12 h de fermentación. En 24 y 48 h, las diferencias entre medias no fueron significativas. En conjunto, estos resultados indican que *S. cerevisiae* se adapta mejor a la HVM durante la fase de crecimiento activo y en etapas tardías, posiblemente debido a la

disponibilidad sostenida de nutrientes complejos presentes en la harina de vaina de mezquite. Mientras que la HVM favorece un crecimiento inicial más rápido y sostenido de *Z. mobilis* en comparación con el medio definido, reflejando su potencial como sustrato fácilmente metabolizable, haciéndola atractiva como materia prima para la producción de etanol.

En la **Figura 12**, el crecimiento en términos de peso húmedo presentó diferencias significativas a las 6 y 12 h, con mayor acumulación en la HVM, evidenciando un crecimiento acelerado durante las fases iniciales de la fermentación. Entre las 24 y 72 h, ambos tratamientos alcanzaron niveles de biomasa comparables, mostrando un crecimiento sostenido en las etapas intermedias. A las 96 h, el medio definido de fermentación presentó una concentración de biomasa superior a la HVM, lo que podría relacionarse con cambios fisiológicos celulares o ajustes en el contenido de agua intracelular hacia el final del proceso.

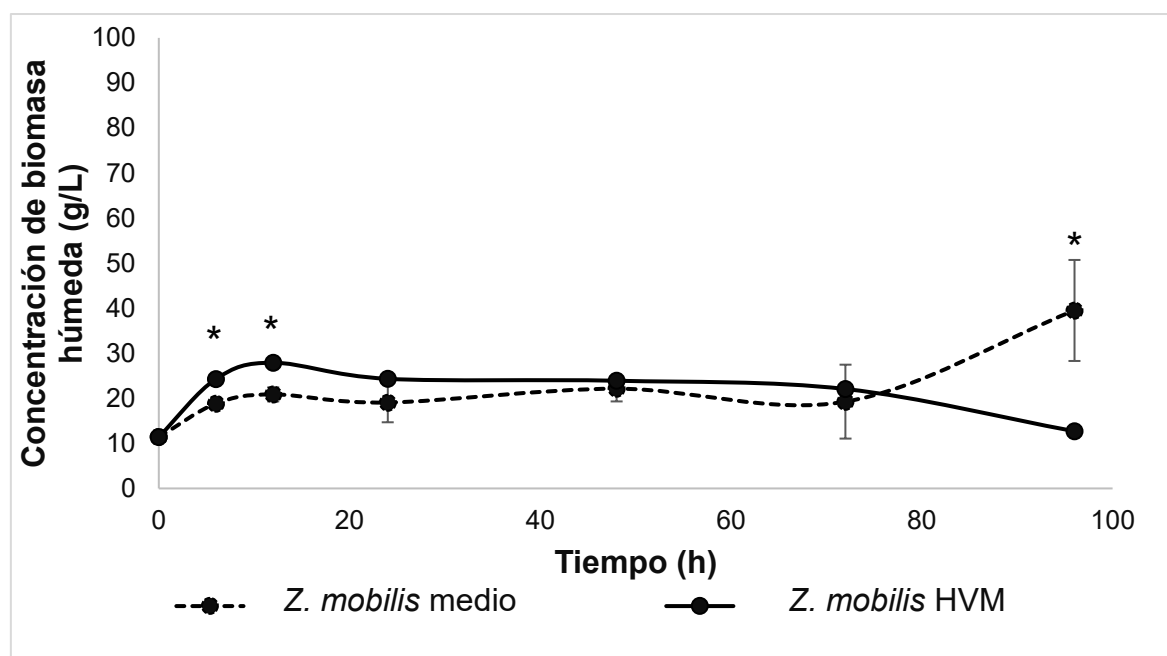


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* en medio definido y en HVM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ambos tratamientos en el mismo tiempo de muestreo, de acuerdo con la prueba de Tukey.

6.3.1 Eficiencia fermentativa de *Z. mobilis*: rápida asimilación de azúcares y su comparación con *S. cerevisiae*

La cinética de *S. cerevisiae* mostrada en la **Figura 13** evidencia un crecimiento similar en 0 y 6 h, concordando con el **Anexo 9.14**. Entre 6 y 12 h, la HVM presentó una diferencia significativa a favor de la levadura. Durante la fase de crecimiento entre las 24 y 48 h, la biomasa en HVM fue mayor y estadísticamente significativa según la prueba de Tukey. En las fases finales (72–96 h), la biomasa alcanzada en HVM fue comparable a la del medio definido, indicando que este sustrato ofrece ventajas sostenidas para el crecimiento de *S. cerevisiae* durante las etapas tempranas e intermedias de la fermentación.

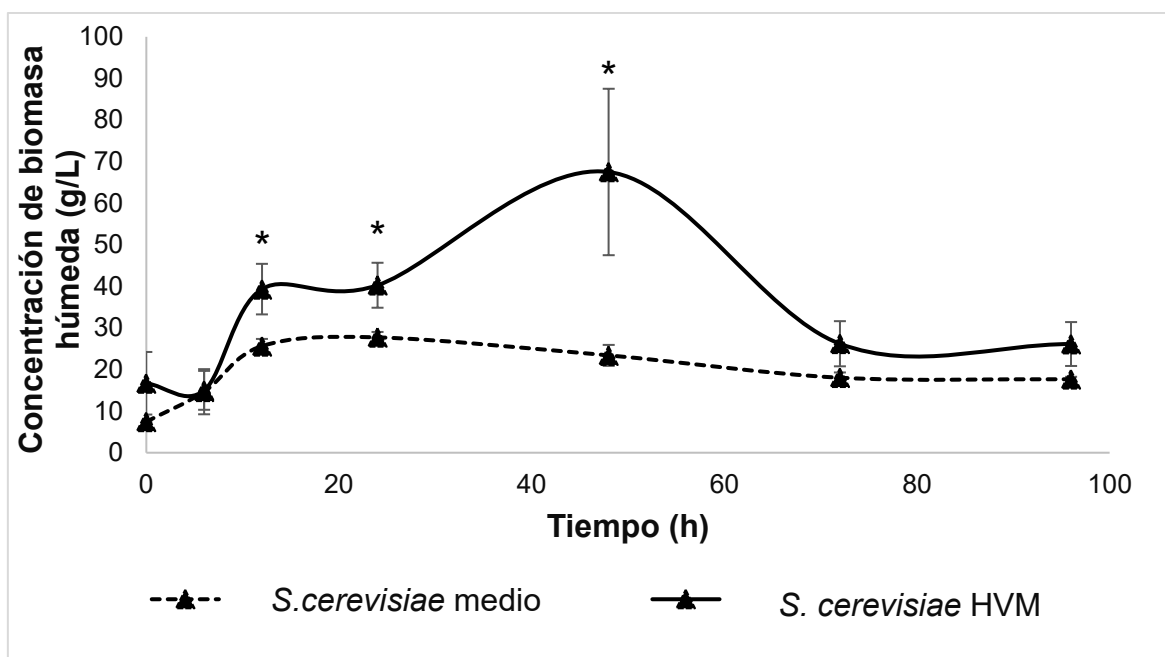


Figura 12. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* en medio definido y en HVM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ambos tratamientos en el mismo tiempo de muestreo, de acuerdo con la prueba de Tukey.

El análisis comparativo de las cinéticas de crecimiento en densidad óptica (**Anexos 9.13 y 9.14**) y peso húmedo (**Figuras 12 y 13**) de *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* en medio

definido y en HVM mostró diferencias significativas en la forma en que cada microorganismo utiliza los recursos del sustrato.

En *Z. mobilis*, se observaron ventajas iniciales en la HVM, con mayores valores de crecimiento durante las primeras 0–12 h, tanto en densidad óptica como en biomasa. Sin embargo, en fases intermedias (48–72 h) las diferencias se redujeron y al final del cultivo (96 h) el medio definido registró valores mayores de biomasa. A pesar de esto, el comportamiento de *Z. mobilis* es consistente con un modelo fermentativo eficiente: consume rápidamente los azúcares disponibles, priorizando su canalización hacia la producción de etanol en lugar de destinar grandes cantidades de carbono a la formación de biomasa.

Por su parte, *S. cerevisiae* mostró una tendencia opuesta. A partir de las 6 h del proceso fermentativo la HVM favoreció significativamente el crecimiento celular, tanto en densidad óptica como en peso húmedo. Si bien este incremento de biomasa refleja una mejor adaptación de la levadura a la HVM, no implica necesariamente una mayor eficiencia fermentativa. De hecho, una alta acumulación de biomasa es poco deseable en procesos de producción de etanol, ya que implica que una fracción considerable de los azúcares consumidos se desvió hacia el metabolismo anabólico y no hacia la fermentación alcohólica.

Estos resultados refuerzan que *Z. mobilis* constituye un microorganismo igual o más adecuado que *S. cerevisiae* como modelo de fermentación alcohólica, ya que su estrategia metabólica se centra en la rápida asimilación de azúcares y su conversión directa a etanol, minimizando la formación de biomasa.

En conjunto, nuestros resultados presentan la relevancia de considerar no solo el crecimiento celular como indicador de desempeño, sino la eficiencia global en el aprovechamiento del sustrato. Bajo esta perspectiva, la harina de vaina de mezquite representa un sustrato prometedor, y *Z. mobilis* se confirma como un biocatalizador competitivo para procesos de producción de etanol a partir de fuentes alternativas de azúcares.

6.4 Optimización de las condiciones operacionales mediante MSR

El diseño experimental Box-Behnken, los resultados experimentales y predichos para la producción de etanol en concentración de etanol (g/L) y velocidad de producción volumétrica de etanol (L/h) están resumidos en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Diseño experimental Box-Behnken con los valores de los factores de densidad óptica (factor A), concentración de sulfato de amonio (factor B), concentración de sólidos solubles totales (factor C), pH (factor D) y los resultados para la producción de etanol en concentración de etanol y velocidad de producción volumétrica respectivamente.

Experimento	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Producción de etanol			
					Concentración de etanol (g/L)		Velocidad de producción volumétrica (L/h)	
					Observado	Predicho	Observado	Predicho
	OD ₆₀₀	Concentración de sulfato de amonio (g/L)	Concentración de azúcares (g/L)	pH				
1	6	0.75	100	6	7.9	-2.7	5.2E-06	2.5E-06
2	6	0.5	200	5	29	32	1.7E-05	3.2E-05
3	4	1	150	5	19	17	1.3E-05	1.9E-05
4	6	0.75	200	4	12	19	6.6E-06	2.4E-05
5	4	0.75	200	5	29	24	1.6E-05	2.8E-05
6	4	0.75	100	5	6.7	8	6.2E-06	9.1E-06
7	6	0.5	150	6	16	16	9.4E-06	1.8E-05
8	6	1	150	4	14	9.9	9.0E-06	1.5E-05
9	6	0.75	150	5	15	14	9.5E-06	1.7E-05
10	6	0.75	150	5	10	14	6.7E-06	1.7E-05
11	6	1	150	6	9.7	8.1	6.4E-06	1.4E-05
12	8	0.75	100	5	2.5	2.9	1.8E-06	5.7E-06
13	6	1	100	5	1.8	5	1.6E-06	7.4E-06
14	6	0.75	150	5	17	14	1.1E-05	1.7E-05
15	4	0.75	150	4	6.7	5.5	4.2E-06	1.3E-05
16	6	0.5	150	4	8.4	5.2	5.5E-06	1.2E-05
17	8	0.5	150	5	26	23	1.4E-05	2.1E-05
18	8	0.75	200	5	44	38	2.2E-05	3.5E-05
19	6	0.5	100	5	1.8	5.2	1.5E-06	6.8E-06
20	8	0.75	150	6	7.4	14	5.7E-06	1.7E-05
21	6	1	200	5	27	29	1.4E-05	3.0E-05
22	8	0.75	150	4	11	10	7.5E-06	1.4E-05
23	6	0.75	200	6	37	33	2.4E-05	3.4E-05
24	4	0.5	150	5	10	7.8	7.6E-06	1.4E-05
25	4	0.75	150	6	3.5	10	2.5E-06	1.5E-05
26	6	0.75	100	4	3.41	3.3	3.2E-06	7.5E-06
27	8	1	150	5	12	11	8.0E-06	1.5E-05

El análisis de varianza reveló que la única interacción significativa para la concentración de etanol fue la combinación entre densidad óptica y fuente de nitrógeno ($p = 0.093$), mostrando que la eficiencia de producción depende de cómo estas variables se complementan entre sí (**Tabla 19**). En cuanto a la velocidad de producción volumétrica de etanol, la interacción entre concentración de sólidos solubles y pH ($p = 0.049$) fue significativa, indicando que la máxima velocidad de producción se logra cuando ambos factores se encuentran en niveles óptimos combinados (**Tabla 20**). Estos hallazgos se reflejan en los diagramas de Pareto de efectos estandarizados (**Anexos 9.15 y 9.16**).

Los resultados del diseño de experimentos fueron utilizados para ajustar modelos de segundo orden, cuyos resultados se presentan en las superficies de respuesta de la Figura 14, permitiendo identificar las condiciones óptimas de producción de etanol.

El modelo que describe la concentración de etanol se ajustó a la **Ec. (1)** mediante el método de mínimos cuadrados, donde los factores están especificados en sus unidades originales como sigue:

Ec. (1)

$$Y [Etanol] = -87 + 0.1A + 122B - 0.967C + 40.1D + 0.206A^2 + 6.4B^2 + 0.00151C^2 - 4.37D^2 - 11.02AB + 0.0487AC - 0.09AD - 0.049BC - 12.2BD + 0.1028CD$$

Donde Y es la variable de respuesta (concentración de etanol), A, B, C y D son los factores (OD_{600} , concentración de sulfato de amonio, concentración de azúcares y pH, respectivamente). El error estándar del modelo fue 6.04257 y de acuerdo con el valor de R^2 , el modelo explica el 86.21% de la varianza en la concentración de etanol. Para el conjunto de experimentos, la máxima concentración de etanol se alcanzó, cuando densidad óptica, concentración de sulfato de amonio, concentración de sólidos solubles totales y pH fueron 8, 0.75 g/L, 200 g/L y 5 respectivamente, dando una concentración de etanol de 44.3 g/L.

El modelo matemático que representa la velocidad de producción volumétrica de etanol en la región experimental estudiada es explicado por la **Ec. (2)**., obtenida mediante el método de mínimos cuadrados

Ec. (2)

Y[Velocidad volumétrica]

$$= -0.000031 + 0.00000023A + 0.000072B - 0.000001C + 0.000016D \\ + 0.000000064A^2 + 0.0000001B^2 + 0.000000001C^2 - 0.000002D^2 \\ - 0.000006AB + 0.000000025AC - 0.000000021AD - 0.000000046BC \\ - 0.000007BD + 0.000000078CD$$

El error estándar del modelo fue de 0.0000036 y el coeficiente de correlación (R^2) explica el 83.21% de la varianza en la velocidad de producción volumétrica de etanol. Para este caso, la máxima velocidad volumétrica de producción se alcanzó, cuando la densidad óptica, concentración de sulfato de amonio, concentración de sólidos solubles totales y pH fueron 8, 0.75 g/L, 200 g/L y 5 respectivamente, siendo estas condiciones idénticas a las cuales se obtuvo la máxima concentración de etanol, sin embargo, la velocidad de producción es despreciable siendo de 3.47E-05 L/h. Por lo que se sugiere, optimizar la destilación mediante condiciones adecuadas de temperatura, presión y tiempo, lo que permitiría una separación más completa del etanol, aumentando la fracción recuperada y reduciendo la inhibición por producto, permitiendo así el incremento de la velocidad volumétrica de producción de etanol.

Tabla 19. Coeficientes de regresión de los factores densidad óptica (OD, factor A), concentración de sulfato de amonio (N, factor B), concentración de azúcares (S, factor C), pH (factor D) para la producción de etanol con base en la concentración de etanol.

Término	Coef ^a	EE del coef. ^b	Valor T ^c	Valor p ^d
Constante	289	1906	0.15	0.882
OD	-146.5	81.6	-1.79	0.098
N	210	1413	0.15	0.885
S	-3.5	81.6	-0.04	0.966
pH	-80.0	81.6	-0.98	0.346
OD ²	0.82	2.62	0.31	0.759
N ²	40	262	0.15	0.881
S ²	3.79	2.62	1.45	0.173

pH ²	-4.37	2.62	-1.67	0.120
OD*N	-55.1	30.2	-1.82	0.093
OD*S	4.87	3.02	1.61	0.133
OD*pH	-0.17	3.02	-0.06	0.956
N*S	-6.1	30.2	-0.20	0.844
N*pH	-30.4	30.2	-1.01	0.334
S*pH	5.14	3.02	1.70	0.115

^aCoef: coeficiente estimado, ^bEE del coef: error estándar del coeficiente, ^cValor T: valor de la distribución t-student, ^dP-value: valor de la probabilidad.

Tabla 20. Coeficientes de regresión de los factores densidad óptica (factor A), concentración de sulfato de amonio (factor B), concentración de azúcares (factor C), pH (factor D) para la producción de etanol con base en la velocidad de producción volumétrica.

Término	Coef ^a	EE del coef. ^b	Valor T ^c	Valor p ^d
Constante	0.01	1.13	0.01	0.994
OD	-0.0756	0.0483	-1.57	0.144
N	0.002	0.836	0.00	0.998
S	-0.0090	0.0483	-0.19	0.856
pH	-0.0425	0.0483	-0.88	0.396
OD ²	0.00025	0.00155	0.16	0.872
N ²	0.001	0.155	0.01	0.995
S ²	0.00160	0.00155	1.03	0.321
pH ²	-0.00214	0.00155	-1.38	0.193
OD*N	-0.0283	0.0179	-1.58	0.140
OD*S	0.00251	0.00179	1.40	0.186
OD*pH	-0.00004	0.00179	-0.02	0.982
N*S	-0.0058	0.0179	-0.32	0.751
N*pH	-0.0163	0.0179	-0.91	0.380
S*pH	0.00391	0.00179	2.19	0.049

^aCoef: coeficiente estimado, ^bEE del coef: error estándar del coeficiente, ^cValor T: valor de la distribución t-student, ^dP-value: valor de la probabilidad.

En la superficie de respuesta para la concentración de etanol en función de la densidad óptica inicial y la concentración de sulfato de amonio, se observó que las condiciones que favorecen una mayor concentración de etanol corresponden a la combinación de mínima concentración de sulfato de amonio y máxima OD₆₀₀, o bien a la condición opuesta, es decir, máxima concentración de sulfato de amonio y mínima OD₆₀₀.

En el análisis de la superficie de respuesta en función de la OD_{600} y la concentración de azúcares se observa que la máxima concentración de etanol se localiza en la región de OD_{600} mínima (límite inferior del rango evaluado), con escasa dependencia respecto del consumo de azúcares. Esto sugiere que, bajo las condiciones estudiadas, la densidad óptica inicial domina el comportamiento de la respuesta, y que una menor biomasa inicial favorece la utilización del sustrato hacia etanol en lugar de crecimiento celular. De forma análoga, la superficie de respuesta para la velocidad de producción volumétrica muestra el máximo en OD_{600} mínima, sin un gradiente pronunciado a lo largo del eje de la concentración de sacarosa.

La superficie de respuesta construida con OD_{600} y pH reveló que la mayor concentración de etanol se alcanza en condiciones de mínima OD_{600} combinada con valores mínimos de pH (4). Valores altos de pH resultan desfavorables con una tendencia a disminuir tanto la concentración como la velocidad mientras que OD_{600} controla la magnitud principal de la respuesta.

La superficie de respuesta en función del sulfato de amonio y los azúcares muestra que el máximo se ubica de manera consistente en la región de sacarosa alta, con poca sensibilidad a la concentración de sulfato de amonio dentro del rango evaluado (es decir, el óptimo se mantiene con sulfato de amonio bajo o alto). Esto sugiere que, en este plano, la disponibilidad de sustrato domina la respuesta, mientras que las variaciones de nitrógeno tienen un efecto prácticamente nulo.

La interacción entre el sulfato de amonio y el pH indicó que las condiciones más favorables se alcanzan en un pH intermedio con concentraciones que tiendan a ser las mínimas de nitrógeno, mientras que niveles extremos de pH disminuyen la respuesta. La velocidad volumétrica presentó un patrón equivalente.

La superficie de respuesta de la concentración de sacarosa y el pH muestra que la máxima concentración y velocidad de producción de etanol se alcanzaron en la región de pH mínimo, independientemente del nivel de azúcares. El efecto del pH domina el comportamiento de la superficie, mientras que el gradiente en función de la sacarosa

es menos marcado. Además, el plano resultante no presenta una pendiente pronunciada, por lo que no se observa un valle drástico entre valores extremos de pH; más bien, el incremento hacia condiciones de pH bajo genera una respuesta sostenidamente mayor en todo el rango de sacarosa.

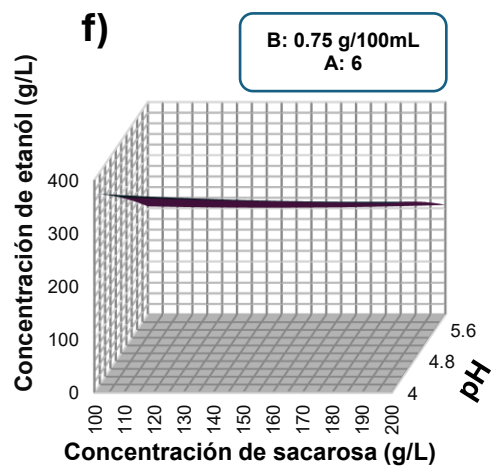
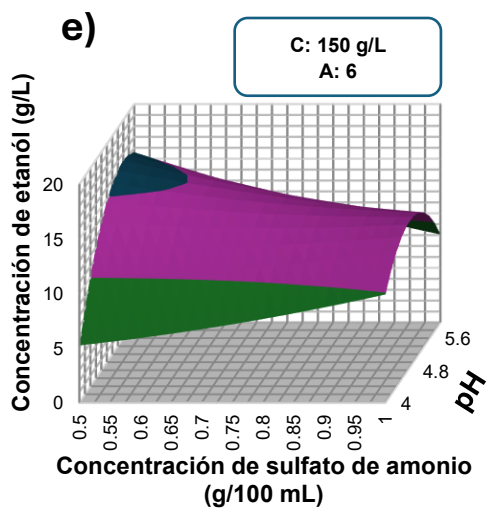
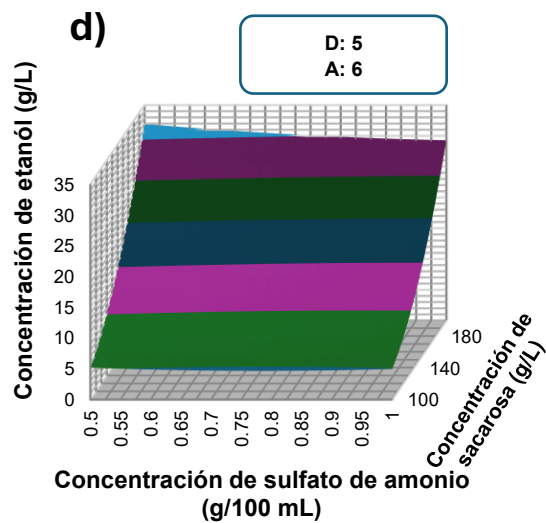
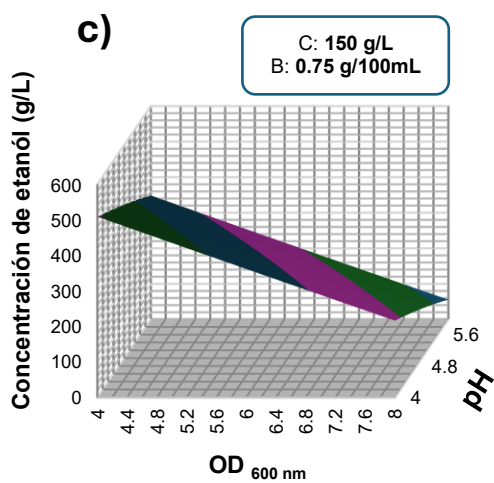
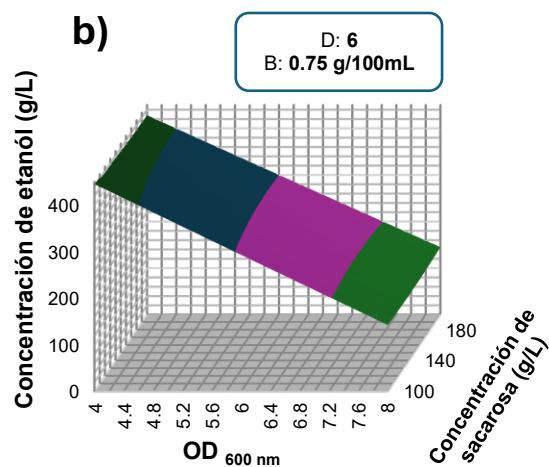
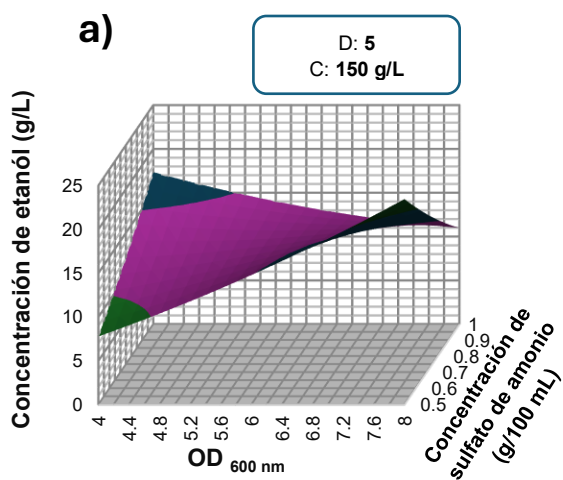


Figura 13. Gráficas de superficie de respuesta de la concentración de etanol en g/L.

La concentración de etanol esta como función de (a) OD_{600nm} y concentración de sulfato de amonio, (b) OD_{600nm} y concentración de azúcares, (c) OD_{600nm} y pH, (d) concentración de sulfato de amonio y concentración de azúcares, (e) concentración de sulfato de amonio y pH y (f) concentración de azúcares y pH. Las superficies de respuesta se generaron manteniendo los dos factores restantes en sus niveles centrales en cada caso.

6.5 La optimización de los parámetros operacionales mediante el diseño Box–Behnken permitió establecer las condiciones que maximizan la producción de etanol

La optimización simultánea de las respuestas: concentración de etanol (g/L) y velocidad de producción volumétrica (L/h), realizada mediante el software Minitab™ v19, estableció como condiciones operacionales óptimas una densidad óptica inicial de 8, una concentración de sulfato de amonio de 0.5 g/L, 200 g/L de sacarosa y un pH de 6. Bajo estas condiciones, el modelo predijo una concentración de etanol de 51.68 ± 9.23 g/L (IC 95%: 31.57–71.79) y una velocidad de producción volumétrica de 0.000029 ± 0.000005 L/h (IC 95%: 0.000015–0.000044).

El valor de deseabilidad compuesta obtenido ($D = 0.0052$) fue muy bajo, lo que refleja que, aunque se alcanzó un nivel elevado en la concentración de etanol al obtener una deseabilidad individual de 1, la velocidad de producción volumétrica se mantuvo en valores bajos ($d=0.00003$).

La fermentación en biorreactor se evaluó utilizando las condiciones encontradas como óptimas y a una temperatura de 30 °C durante 96 horas. Adicionalmente, la velocidad de agitación se ajustó a 200 rpm, superior a la utilizada en la generación de biomasa, para asegurar una completa homogeneización de la HVM. La cinética de consumo de azúcares reductores bajo estas condiciones se presenta en la **Figura 15**. Se partió de una concentración inicial de 37.31 ± 2.59 g/L, la cual disminuyó drásticamente en las

primeras 12 horas hasta alcanzar 1.47 ± 0.56 g/L. Posterior a este punto, la concentración permaneció en aproximadamente 1.26 g/L, indicando un agotamiento casi total del sustrato. A partir de esta cinética, se calculó la velocidad volumétrica de consumo de sustrato de 3 ± 0.2 g/L h (**Anexo 9.17**). Este valor, calculado en el intervalo de 0 a 12 horas, es aparentemente inferior al observado en el ensayo previo con HVM (4.66 ± 0.67 g(L h)⁻¹), el cual se determinó en un periodo más corto de 0 a 6 horas.

Esta diferencia podría no reflejar una menor eficiencia, sino más bien ser un efecto del intervalo de tiempo seleccionado para el cálculo. Es probable que, en el experimento optimizado, la velocidad de consumo inicial haya sido significativamente mayor y que el sustrato se haya agotado en gran medida antes de las 12 horas, similar a lo observado en el ensayo anterior a las 6 horas. Por lo tanto, el valor de 3 ± 0.2 g/L h probablemente subestima la velocidad máxima de consumo real al promediar un periodo que incluye tanto la fase de consumo rápido como una fase posterior de agotamiento de sustrato.

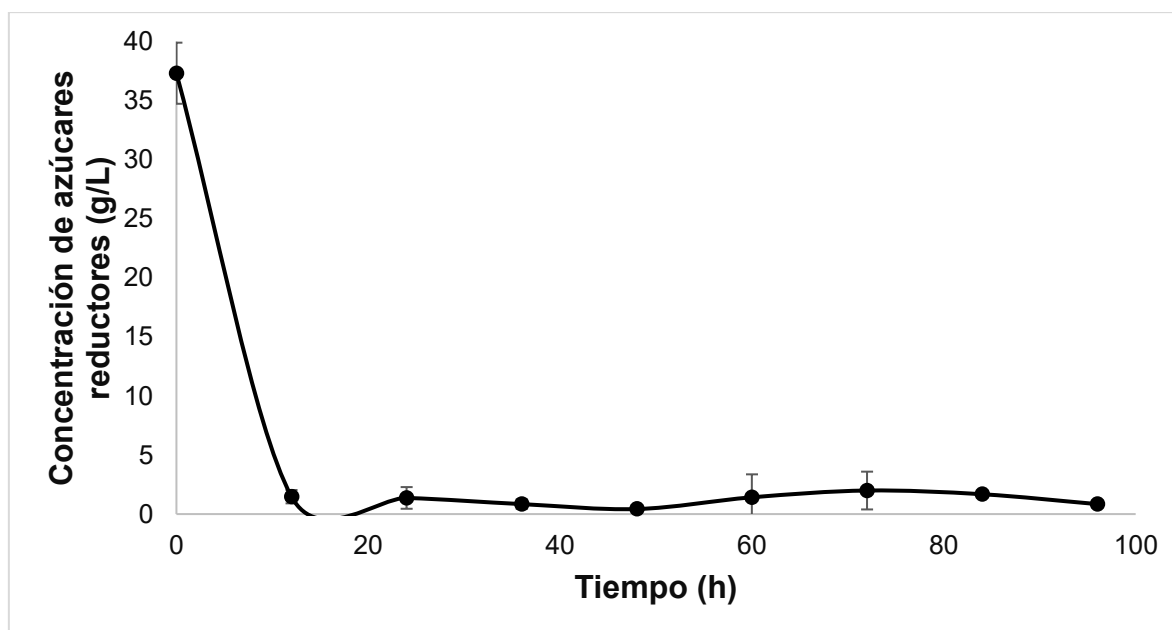


Figura 14. Cinética de consumo de azúcares reductores utilizando condiciones optimizadas.

6.5.1 Consumo rápido de sacarosa en las primeras 12 h y agotamiento de la fracción fermentable en HVM

La cinética de consumo de azúcares, presentada en la **Figura 16**, mostró un comportamiento análogo al observado con los azúcares reductores. La concentración inicial de azúcares fue de 200 g/L, la cual disminuyó a 145 g/L durante las primeras 12 horas de fermentación. Tras este periodo, la concentración se mantuvo prácticamente estable, con un valor cercano a 135.43 g/L hasta el final del ensayo. La velocidad volumétrica de consumo de azúcares, calculada en este intervalo, fue de $4.91 \text{ g (L h)}^{-1}$ (**Anexo 9.18**). Dicha velocidad es aproximadamente la mitad de la obtenida en ensayos previos (9.67 g(L h)^{-1}), lo cual, al igual que con los azúcares reductores, sugiere que el cálculo subestima la velocidad máxima real debido a un rápido agotamiento del sustrato fermentable en las primeras horas.

Además, cabe destacar que el valor final de azúcares en la fermentación es alto ($\sim 135 \text{ g/L}$). Si bien la medición inicial fue de 200 g/L, es muy probable que esta cifra no corresponda en su totalidad a azúcares fermentables. Es probable que la alta turbidez de la HVM, provocada por otros compuestos solubles o coloidales de la vaina de mezquite, interfirió con la medición en el refractómetro, llevando a una sobreestimación de la concentración inicial de azúcares. Por lo tanto, el consumo se detiene no por una inhibición del microorganismo, sino porque quizá la cantidad real de azúcares disponibles era significativamente menor a la medida inicialmente. Para ello se deberá cuantificar mediante HPLC en estudios posteriores a este, para poder validar lo anterior.

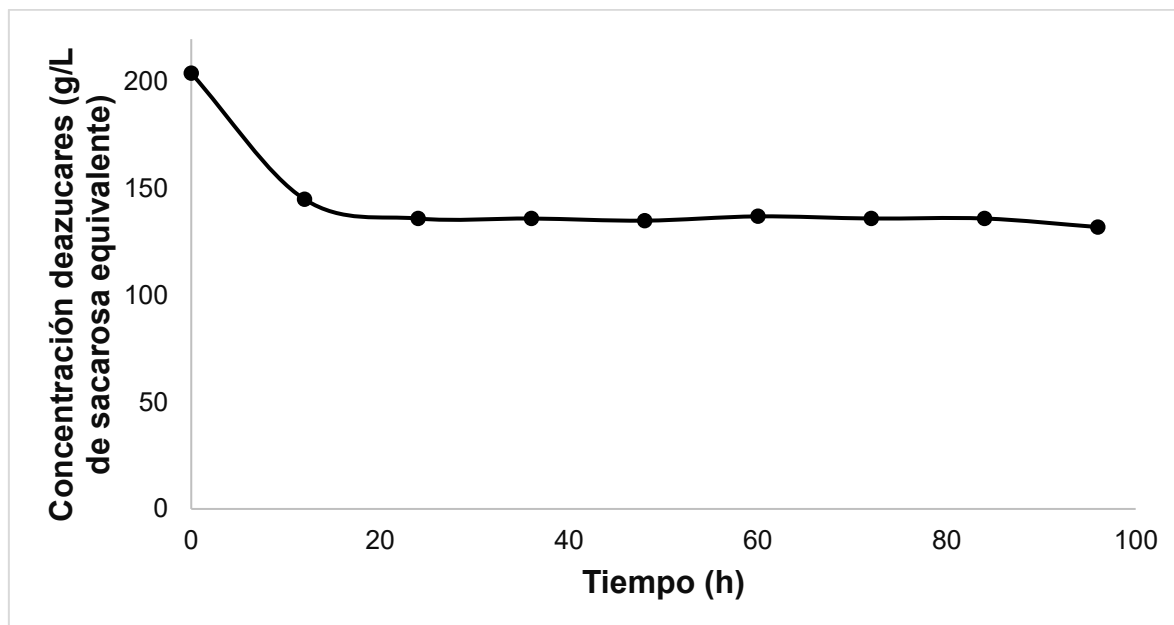


Figura 15. Cinética de consumo de azúcares utilizando las condiciones optimizadas.

6.6 Resultados experimentales de producción de etanol a partir de HVM y comparación frente a estudios previos

La destilación de 135 mL del fermentado (78 °C, 30 min) produjo un destilado con 478.2 g/L de etanol, demostrando la capacidad del proceso para generar fracciones concentradas. La mezcla sin destilar tuvo una acumulación de 33.5 g/L, equivalente a 4.52 g de etanol en los 135 mL, mientras que en el destilado se recuperó solo el 13.75% del total, dejando 86.25% sin separar. Estos resultados evidencian que, aunque la concentración en el destilado es alta, la separación no fue eficiente, indicando la necesidad de optimizar el proceso para aumentar la recuperación y la velocidad volumétrica de producción y extracción de etanol.

Al comparar los resultados experimentales con los valores predichos por el modelo de optimización, se observa la falta de ajuste del modelo, sin embargo, no se atribuyen a un bajo rendimiento de la fermentación, sino a una marcada ineficiencia en la etapa de recuperación del producto. El análisis del proceso de destilación reveló que solo se logró recuperar el 13.75% del etanol total presente en el sobrenadante, por lo que los

valores experimentales, calculados únicamente a partir de esta fracción, subestimaron drásticamente la producción real.

La comparación de los resultados obtenidos en este estudio con los reportes previos (**Tabla 21**) muestra que la concentración de etanol alcanzada en nuestro trabajo fue de 478.2 g/L de etanol en biorreactor siendo mejor que otras investigaciones que utilizaron *Z. mobilis* bajo condiciones optimizadas. Da Silva et al. (2010) reportaron concentraciones de 141.1 g/L empleando vainas de *Prosopis juliflora* como sustrato, mientras que Roukas (1994) obtuvo valores de solo 65–71 g/L utilizando extracto de algarrobo. Es importante señalar que, en el estudio de Roukas, la producción de etanol fue significativamente menor que la de da Silva et al. (2010), aun cuando la concentración inicial de azúcares fue mayor (200 g/L). Sin embargo, siendo objetivos ninguno de los autores proporciona datos volumétricos de recuperación de etanol, es por ello que no solo es importante la fermentación, sino también el proceso de separación de este metabolito con fines de garantizar su escalado eficiente a nivel industrial.

Por su parte, Nuanpeng et al. (2023) emplearon jugo de sorgo dulce, un cultivo con alto contenido de azúcares, y alcanzaron concentraciones máximas de etanol menores a las reportadas por da Silva et al. (2010), a pesar de trabajar con una concentración inicial de azúcares mayor (247 g/L). Este contraste subraya la relevancia del presente estudio, en el que se utilizó una materia prima subutilizada como el mezquite, que representa una alternativa sostenible y de interés biotecnológico.

Finalmente, es importante diferenciar la eficiencia de la fermentación y del proceso de recuperación del etanol. Si bien la concentración de 478.2 g/L obtenida en el destilado refleja la efectividad de la etapa de concentración, la baja tasa de recuperación (~13.7 %) evidencia que la optimización del proceso de destilación constituye un paso crítico para mejorar el rendimiento global y la viabilidad industrial de la producción de etanol a partir de este sustrato.

La comparación de estos resultados con los valores reportados en la literatura se muestra en la **Figura 17** en donde se muestra la concentración de etanol (g/L) reportada en diferentes estudios en función del año de publicación.

La forma de cada símbolo indica el microorganismo utilizado, mientras que el color representa el tipo de materia prima utilizada. Las etiquetas de los símbolos indican la combinación de materia prima, microorganismo y tiempo de fermentación correspondiente. Los resultados obtenidos en este trabajo se representan con estrellas amarillas, permitiendo así la comparación con los valores reportados en la literatura.

Tabla 21. Comparación de la producción de etanol con otros estudios .

Autor/año	Microorganismo (cepa)	Materia prima	Etanol máximo (g/L)	Temp. (°C)	Tiempo (h)	pH inicial	Azúcares iniciales (g/L)	Inóculo inicial
Roukas, 1994	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. siliqua</i>	75	30	72	4.5	200	10 % (v/v)
da Silva et al., 2010	<i>Z. mobilis</i>	<i>P. juliflora</i>	141.1	28–30	18–36	5.4–5.5	161	5 % v/v
Vaheed et al., 2011	UFEPEDA-205; <i>Z. mobilis</i> PTCC 1718	<i>C. siliqua</i>	40.07	30	36	5.2	115.6	0.34 g/L biomasa seca
El-Imam et al., 2022	<i>Pichia kudriavzevii</i> SY4	<i>P. africana</i>	38.26	30	24	7	43.4	1 × 10 ⁷ cel/mL
Nuanpeng et al., 2023	<i>S. cerevisiae</i> DBKKUY-53	Sorgo dulce	101.81	37	36–72	4.5–5.5	247	7.85 × 10 ⁷ cel/mL
Tesis (2025)	<i>Z. mobilis</i>	<i>P. juliflora</i>	33.5 (sobrenadante, 96 h); 478.2 (destilado)	30	96	6	20 °Brx	8 OD _{600nm}

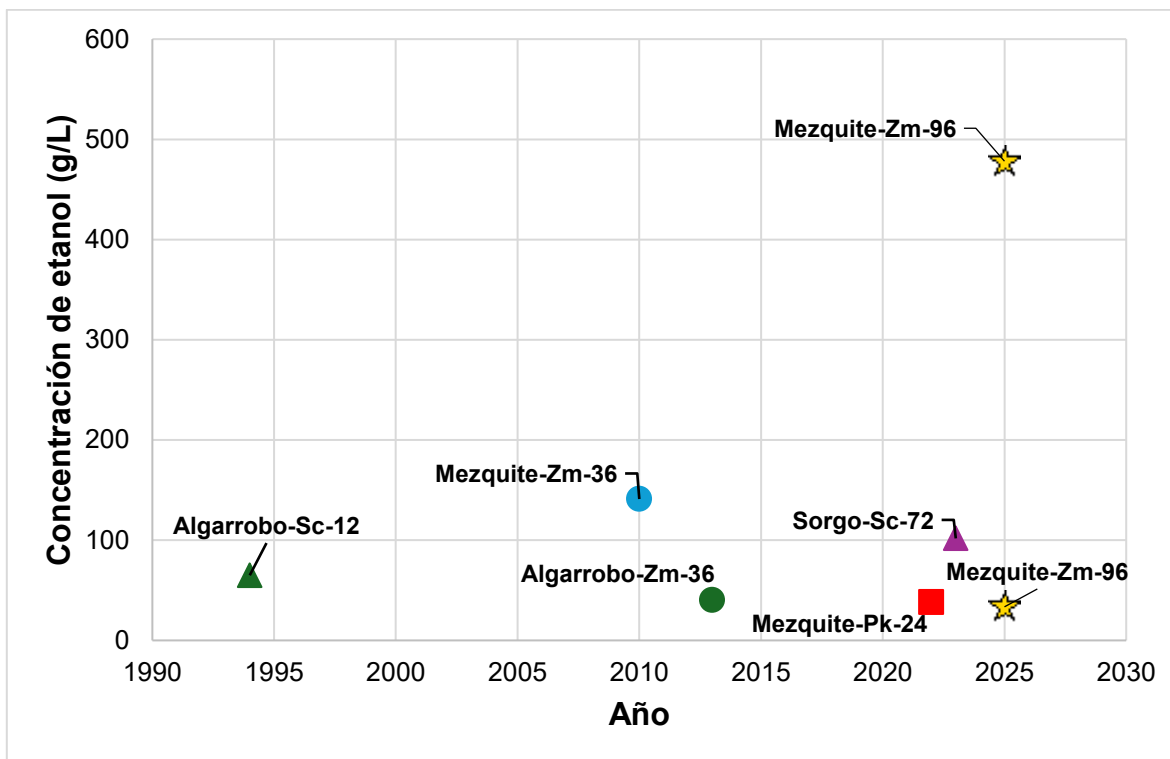


Figura 16. Concentraciones máximas de etanol alcanzadas en estudios previos y en la presente investigación. El símbolo indica el microorganismo utilizado, mientras que el color representa el tipo de materia prima utilizada. Las etiquetas indican la materia prima, microorganismo y tiempo de fermentación. Los resultados obtenidos en este trabajo se representan con estrellas amarillas; la que se encuentra en la parte superior indica la concentración de etanol determinada en el destilado, mientras que la que se encuentra en la parte inferior corresponde al análisis del sobrenadante de la fermentación previo a la destilación.

7 Conclusiones

El presente trabajo de investigación demuestra la viabilidad técnica de utilizar la harina de vaina de mezquite (*Prosopis laevigata*), un recurso nativo y de bajo aprovechamiento, como sustrato para la producción de bioetanol mediante fermentación con la bacteria *Zymomonas mobilis*.

Z. mobilis alcanza su máxima concentración celular durante las primeras horas de cultivo, por lo que no es necesario prolongar el tiempo de cultivo para obtener la biomasa requerida en los ensayos subsecuentes. Cabe destacar que previo al cultivo se realizó una fase de adaptación, la cual debe considerarse dentro del tiempo total del proceso.

Los ensayos comparativos demuestran que la harina de vaina de mezquite (HVM) constituye un medio de cultivo tan eficiente como los medios definidos, sin diferencias significativas en las velocidades de consumo de azúcares ($p > 0.05$). *Z. mobilis* alcanzó tasas de consumo de 5.98 ± 1.86 g/L·h en medio definido y 4.66 ± 0.67 g/L·h en HVM, agotando el sustrato en las primeras seis horas, lo que evidencia su elevada eficiencia metabólica y la preferencia en la canalización del carbono hacia la producción de etanol.

La optimización del proceso mediante un diseño Box–Behnken permite determinar las condiciones que maximizan la producción de etanol en biorreactor, alcanzándose 33.5 g/L en el sobrenadante y 478.2 g/L en el destilado con una recuperación de ~13.7 %. El consumo de sustrato se concentró en las primeras 12 horas de fermentación, destacando la eficiencia de *Z. mobilis* y la necesidad de mejorar la etapa de destilación.

En conjunto, los resultados confirman que *Z. mobilis* es un biocatalizador eficiente para la producción de bioetanol a partir de vaina de mezquite, destacando por su rápido consumo de azúcares y su orientación del metabolismo hacia la formación de etanol. Este estudio contribuye al aprovechamiento de un recurso local y sienta bases para su integración en esquemas sostenibles de producción de bioetanol.

Perspectivas de mejora

El presente estudio permitió identificar diversas oportunidades de optimización que, de ser implementadas, podrían incrementar significativamente la eficiencia y viabilidad del proceso de producción de etanol a partir de HVM.

Disminución del tiempo de generación de biomasa. Reducir el tiempo destinado a la fase de crecimiento a un máximo de 6 horas, dado que las cinéticas de densidad óptica y peso húmedo mostraron que *Z. mobilis* alcanza la fase estacionaria en ese intervalo, sin un incremento significativo de biomasa en tiempos posteriores.

Reducción del tiempo de fermentación. Limitar la fermentación a periodos no mayores de 12 horas, ya que bajo condiciones optimizadas se observó que los azúcares fueron consumidos completamente en ese lapso, lo que hace innecesario prolongar el proceso hasta 96 horas.

Concentración de nitrógeno. Emplear la mínima concentración de nitrógeno posible o prescindir de su suministro, puesto que no se evidenció un efecto positivo sobre la producción de etanol. El ligero efecto compensatorio observado sugiere que el contenido natural de nitrógeno en la HVM es suficiente para sostener la fermentación.

Eliminación de la harina residual. Evitar la fermentación con la harina presente en el medio, ya que su permanencia incrementa la viscosidad, dificulta la homogeneización (requiriendo hasta 200 rpm) y reduce el volumen efectivo de líquido disponible. La separación previa de la harina favorecería un mayor volumen de líquido y una operación más eficiente.

Correlación entre °Brix y azúcares fermentables. Establecer una curva de calibración que relacione los °Brix con las concentraciones reales de azúcares reductores y sacarosa, determinada mediante DNS y/o HPLC. Esto permitiría contar con un método indirecto y práctico para estimar los azúcares fermentables en la HVM a partir de lecturas de refractómetro, facilitando el cálculo del rendimiento y del nivel de conversión azúcar-etanol, considerando el rendimiento teórico máximo de 0.511 g de etanol/g de azúcar y la eficiencia de conversión cercana al 95 % de *Z. mobilis*.

Control de biomasa mediante turbidostato. Implementar un sistema de turbidostato para mantener constante la densidad óptica determinada como óptima (~8), garantizando un control más preciso del cultivo y evitando variaciones que afecten la cinética fermentativa.

Incremento de azúcares fermentables. Aumentar la concentración inicial de azúcares fermentables, dado que *Z. mobilis* puede tolerar hasta 16 % de etanol (vs. 4.3 % observado en este estudio). Además, la optimización indicó que 20 °Brix era el valor óptimo, aunque la concentración real de azúcares podría haber sido menor a los 200 g/L estimados. Dado que los azúcares reductores se consumieron en su totalidad, es razonable suponer que un incremento en la concentración inicial de azúcares favorecería un mayor rendimiento en etanol.

Optimización de la destilación. Mejorar las condiciones de destilación, ya que solo se recuperó una fracción del etanol producido. Para ello, podría considerarse aumentar la temperatura del sobrenadante, prolongar el tiempo del proceso o evaluar configuraciones alternativas (p. ej., destilación fraccionada o al vacío) que permitan incrementar la eficiencia de recuperación.

Análisis de coproductos. Incluir la evaluación de subproductos generados durante el proceso (biomasa residual, fibras o compuestos fenólicos), con el fin de promover un aprovechamiento integral de la HVM de vaina de mezquite en un esquema de biorrefinería. Este enfoque contribuiría a aumentar la viabilidad económica y la sostenibilidad del proceso al diversificar los productos de valor agregado.

8 Referencias

- Accardi, D. S., Lauri, R., & Pietrangeli, B. (2015). Comparative study in the safety aspects of the production of ethanol from renewable and non-renewable sources. *Procedia Environmental Science, Engineering and Management*, 2, 161-168. https://www.procedia-esem.eu/pdf/issues/2015/no3/1_5_Accardi_15.pdf
- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 66, 631-653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Aguiar, L. V., de Oliveira Silva, H. G., de Albuquerque Fernandes, S. A., Caires, D. N., Silva, A. S., Feistauer, A. E., ... & dos Santos Pedreira, M. (2020). Mesquite pod meal as an additive increases milk total solids, lactose, fat and protein content in dairy cows. *Tropical animal health and production*, 52, 1351-1356. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02135-2>
- Ahmad, T., & Zhang, D. (2020). A critical review of comparative global historical energy consumption and future demand: The story told so far. *Energy Reports*, 6, 1973-1991. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.07.020>
- Almanza, S. G., & Moya, E. G. (1986). The uses of mesquite (*Prosopis* spp.) in the highlands of San Luis Potosi, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 16(1-4), 49-56. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(86\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0378-1127(86)90007-1)
- Andrade-Montemayor, H. M., Cordova-Torres, A. V., García-Gasca, T., & Kawas, J. R. (2011). Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). *Small Ruminant Research*, 98(1-3), 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.03.023>
- Aresta, M. (2022). Do Bio-Ethanol and Synthetic Ethanol Produced from Air-Captured CO2 Have the Same Degree of “Greenness” and Relevance to “Fossil C”? *Molecules*, 27(7), 2223. <https://doi.org/10.3390/molecules27072223>

- Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Lv, Y., & Tan, T. (2015). Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*, 47, 60-88. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.10.003>
- Balat, M. (2009). Bioethanol as a vehicular fuel: a critical review. *Energy Sources, Part A*, 31(14), 1242-1255. <https://doi.org/10.1080/15567030801952334>
- Bhadekar, R., & Bhola, J. (2019). Nonconventional preservation techniques: Current trends and future prospects. In *Preservatives and preservation approaches in beverages* (pp. 115-147). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816685-7.00004-5>
- Breig, S. J. M., & Luti, K. J. K. (2021). Response surface methodology: A review on its applications and challenges in microbial cultures. *Materials Today: Proceedings*, 42, 2277-2284. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.316>
- Broda, M., Yelle, D. J., & Serwańska, K. (2022). Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass—Challenges and Solutions. *Molecules*, 27(24), 8717. <https://doi.org/10.3390/molecules27248717>
- Carrillo-Nieves, D., Alanís, M. J. R., de la Cruz Quiroz, R., Ruiz, H. A., Iqbal, H. M., & Parra-Saldívar, R. (2019). Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 102, 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.11.031>
- Cazetta, M. L., Celligoi, M. A. P. C., Buzato, J. B., & Scarmino, I. S. (2007). Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource technology*, 98(15), 2824-2828. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.026>
- Comisión Reguladora de Energía. (2016). Norma Oficial Mexicana NOM-016-CRE-2016, Especificaciones de calidad de los petrolíferos. Diario Oficial de la Federación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/469060/NOM-016-CRE-2016_Especificaciones_de_calidad_de_los_petrol_feros.pdf

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTCIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, DF, v. 11, n. 4 abril 2025. <https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-cana-de-acucar/arquivos-boletins/4o-levantamento-safra-2024-25/boletim-cana-de-acucar-4o-levantamento-2024-25#:~:text=Complementando%20as%20informa%C3%A7%C3%B5es%20de%20safra,meio%20de%20um%20censo%20completo.&text=O%20intuito%20da%20gera%C3%A7%C3%A3o%20de,da%20constante%20oferta%20do%20biocombust%C3%ADvel.&text=A%20safra%20que%20est%C3%A1%20se,sendo%20revisado%20neste%20%C3%BAltimo%20levantamento.>

CEDRSSA - Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. La producción y el comercio de los biocombustibles en México y el mundo. (2020) Reporte. Palacio Legislativo de San Lázaro. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/56Producci%C3%B3n%20y%20comercio%20de%20biocombustibles.pdf>

Dagle, R. A., Winkelman, A. D., Ramasamy, K. K., Lebarbier Dagle, V., & Weber, R. S. (2020). Ethanol as a renewable building block for fuels and chemicals. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(11), 4843-4853. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b05729>

da Silva, F. L., Lima, C. J. B., Ribeiro, E. J., Converti, A., & Silva, S. S. (2010). Production of ethanol from mesquite (*Prosopis juliflora* (SW) DC) pods mash by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(5), 1–9. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582010000500012&lng=es&tlng=en

Deak, T. (2013). *Food safety management: Chapter 17. Thermal treatment*. Elsevier Inc. Chapters. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00017-2>

Deshavath, N. N., Veeranki, V. D., & Goud, V. V. (2019). Lignocellulosic feedstocks for the production of bioethanol: availability, structure, and composition. In *Sustainable bioenergy* (pp. 1-19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817654-2.00001-0>

- Diario Oficial de la Federación, 2008. Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos. Cámara De Diputados Del H. Congreso De La Unión. Secretaría General. Secretaría de Servicios Parlamentarios. <https://portalhcd.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LPDB.pdf>
- Díaz-Batalla, L., Hernández-Urbe, J. P., Román-Gutiérrez, A. D., Cariño-Cortés, R., Castro-Rosas, J., Téllez-Jurado, A., & Gómez-Aldapa, C. A. (2018). Chemical and nutritional characterization of raw and thermal-treated flours of Mesquite (*Prosopis laevigata*) pods and their residual brans. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 444-451. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1418433>
- Dubey, K. K., Raj, T., & Kumar, P. (2022). Pathogenic microorganisms in milk: their source, hazardous role and identification. In *Advances in Dairy Microbial Products* (pp. 145-161). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85793-2.00005-9>
- Duque, A., Álvarez, C., Doménech, P., Manzanares, P., & Moreno, A. D. (2021). Advanced bioethanol production: from novel raw materials to integrated biorefineries. *Processes*, 9(2), 206. <https://doi.org/10.3390/pr9020206>
- El-Imam, A. A., Ighalo, E., Sanusi, M., Oke, M. A., & Omojasola, P. F. (2022). Bioethanol production from biologically pretreated *Prosopis africana* pods using *Pichia kudriavzevii* SY4. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15(5), 855–868. <https://doi.org/10.54319/jjbs/150515>
- Foust, T. D., Aden, A., Dutta, A., & Phillips, S. (2009). An economic and environmental comparison of a biochemical and a thermochemical lignocellulosic ethanol conversion processes. *Cellulose*, 16, 547-565. <https://doi.org/10.1007/s10570-009-9317-x>
- Gabra, F. A., Abd-Alla, M. H., Danial, A. W., Abdel-Basset, R., & Abdel-Wahab, A. M. (2019). Production of biofuel from sugarcane molasses by diazotrophic *Bacillus* and recycle of spent bacterial biomass as biofertilizer inoculants for oil crops. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 19, 101112. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101112>

- García-López, J. C., Durán-García, H. M., José, A., Álvarez-Fuentes, G., Pinos-Rodríguez, J. M., Lee-Rangel, H. A. & Salinas-Rodríguez, M. (2019). Producción y contenido nutrimental de vainas de tres variantes de mezquite (*Prosopis laevigata*) en el altiplano potosino, México. *Agrociencia*, 53(6), 821-831. <https://agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1846>
- Halder, P., Azad, K., Shah, S., & Sarker, E. (2019). Prospects and technological advancement of cellulosic bioethanol ecofuel production. In *Advances in eco-fuels for a sustainable environment* (pp. 211-236). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102728-8.00008-5>
- Hernández, C., Escamilla-Alvarado, C., Sánchez, A., Alarcón, E., Ziarelli, F., Musule, R., & Valdez-Vazquez, I. (2019). Wheat straw, corn stover, sugarcane, and Agave biomasses: chemical properties, availability, and cellulosic-bioethanol production potential in Mexico. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(5), 1143-1159. <https://doi.org/10.1002/bbb.2017>
- Herrera, C. R. J., Vieira, V. R., Benoliel, T., Carneiro, C. V. G. C., De Marco, J. L., de Moraes, L. M. P., de Almeida, J. R. M., & Torres, F. A. G. (2021). Engineering *Zymomonas mobilis* for the Production of Xylonic Acid from Sugarcane Bagasse Hydrolysate. *Microorganisms*, 9(7), 1372. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071372>
- IEA (2020), Key World Energy Statistics 2020, IEA, Paris <https://www.iea.org/reports/key-world-energy-statistics-2020> , Licence: CC BY 4.0
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and sustainable energy reviews*, 65, 756-769. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>
- Kelly, A. L., Waldron, D. S., Datta, N., & O'Shea, N. (2022). Heat exchangers, pasteurizers and UHT equipment — Design and operation. In P. L. H. McSweeney & J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (3rd ed., Vol. 3, pp. 321–335). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00257-9>

- Kohler, M. (2019). Economic assessment of ethanol production. In Ethanol (pp. 505-521). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811458-2.00019-5>
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology*, 199, 106244. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>
- Latif, M. N., Wan Isahak, W. N. R., Samsuri, A., Hasan, S. Z., Manan, W. N., & Yaakob, Z. (2023). Recent Advances in the Technologies and Catalytic Processes of Ethanol Production. *Catalysts*, 13(7), 1093. <https://doi.org/10.3390/catal13071093>
- Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. (2007). *Medium No. 1445: Zymomonas mobilis medium* [PDF]. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/culture-technology/list-of-media-for-microorganisms>
- Li, Y., Zhai, R., Jiang, X., Chen, X., Yuan, X., Liu, Z., & Jin, M. (2019). Boosting ethanol productivity of *Zymomonas mobilis* 8b in enzymatic hydrolysate of dilute acid and ammonia pretreated corn stover through medium optimization, high cell density fermentation and cell recycling. *Frontiers in microbiology*, 10, 2316. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02316>
- Liu, Y., Feng, J., Pan, H., Zhang, X., & Zhang, Y. (2022). Genetically engineered bacterium: Principles, practices, and prospects. *Frontiers in Microbiology*, 13, 997587. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997587>
- Maciel-Torres, M. Á., 2024. Actualización de la Estrategia de Transición para Promover el Uso de Tecnologías y Combustibles más Limpios. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5714865&fecha=23/01/2024#gsc.tab=0

- Manochio, C., Andrade, B. R., Rodriguez, R. P., & Moraes, B. S. (2017). Ethanol from biomass: A comparative overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 743-755. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.063>
- Mat Aron, N. S., Khoo, K. S., Chew, K. W., Show, P. L., Chen, W. H., & Nguyen, T. H. P. (2020). Sustainability of the four generations of biofuels—a review. *International Journal of Energy Research*, 44(12), 9266-9282. <https://doi.org/10.1002/er.5557>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Moodley, P., & Trois, C. (2021). Lignocellulosic biorefineries: the path forward. Sustainable biofuels (pp. 21-42). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820297-5.00010-4>
- Mu, D., Seager, T., Rao, P. S., & Zhao, F. (2010). Comparative life cycle assessment of lignocellulosic ethanol production: biochemical versus thermochemical conversion. *Environmental management*, 46, 565-578. <https://doi.org/10.1007/s00267-010-9494-2>
- Mumm, R. H., Goldsmith, P. D., Rausch, K. D., & Stein, H. H. (2014). Land usage attributed to corn ethanol production in the United States: sensitivity to technological advances in corn grain yield, ethanol conversion, and co-product utilization. *Biotechnology for biofuels*, 7, 1-17. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-61>
- Nouri, H., Moghimi, H., Marashi, S. A., & Elahi, E. (2020). Impact of hfq and sig E on the tolerance of *Zymomonas mobilis* ZM4 to furfural and acetic acid stresses. *PloS one*, 15(10), e0240330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240330>
- Nuanpeng, S., Sukkasem, C., Sae-Tang, K., Srichai, S., Laopaiboon, L., & Laopaiboon, P. (2023). Optimization conditions for ethanol production from sweet sorghum juice by thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Using a statistical experimental design. *Fermentation*, 9(8), 739. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050450>

- Pang, J., Zheng, M., & Zhang, T. (2019). Synthesis of ethanol and its catalytic conversion. *Advances in catalysis* (Vol. 64, pp. 89-191). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.acat.2019.08.001>
- Pérez-Serrano, D., Cabirol, N., Martínez-Cervantes, C., & Rojas-Oropeza, M. (2021). Mesquite management in the Mezquital Valley: A sustainability assessment based on the view point of the Hñähñú indigenous community. *Environmental and Sustainability Indicators*, 10, 100113. <https://doi.org/10.1016/j.indic.2021.100113>
- Ramsey, S., Williams, B., Jarrell, P. & Hubbs, T. (2023). Global Demand for Fuel Ethanol Through 2030, BIO-05, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service. <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details?pubid=105761>
- Rass-Hansen, J., Falsig, H., Jørgensen, B., & Christensen, C. H. (2007). Bioethanol: fuel or feedstock? *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 82(4), 329-333. <https://doi.org/10.1002/jctb.1665>
- Renewable fuels association, 2023." Annual Ethanol Production: U.S. and World Ethanol Production" <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>
- Renewable fuels association, 2024." Ethanol Biorefinery Locations" <https://ethanolrfa.org/resources/us-ethanol-and-alcohol-to-jet-biorefineries>
- Rosales-Calderón, O., & Arantes, V. (2019). A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1529-1>
- Roukas, T. (1994). Kinetics of ethanol production from carob pods extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45–46(1), 223–235. <https://doi.org/10.1007/BF02921851>
- Ruiz-Nieto, J. E., Hernández-Ruiz, J., Hernández-Marín, J., Mendoza-Carrillo, J., Abraham-Juárez, M., Isiordia-Lachica, P. M., & Mireles-Arriaga, A. I. (2020). Mesquite (*Prosopis*

- spp.) tree as a feed resource for animal growth. *Agroforestry Systems*, 94(4), 1139-1149. <https://doi.org/10.1007/s10457-020-00481-x>
- Saavoss, M., Capehart, T., McBride, W. & Effland, A. ERR-294, 2021. Trends in Production Practices and Costs of the U.S. Corn Sector, U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service. <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details?pubid=101721>
- Sadhukhan, J., Martinez-Hernandez, E., Amezcua-Allieri, M. A., & Aburto, J. (2019). Economic and environmental impact evaluation of various biomass feedstock for bioethanol production and correlations to lignocellulosic composition. *Bioresource technology reports*, 7, 100230. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100230>
- Sarkar, P., Goswami, G., Mukherjee, M., & Das, D. (2021). Heterologous expression of xylose specific transporter improves xylose utilization by recombinant *Zymomonas mobilis* strain in presence of glucose. *Process Biochemistry*, 102, 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.01.006>
- Schwab, A., Warner, E., & Lewis, J. 2015 Survey of Non-Starch Ethanol and Renewable Hydrocarbon Biofuels Producers. United States: N. p., 2016. <https://doi.org/10.2172/1236956>
- Senatore, A., Dalena, F., & Basile, A. (2020). Novel bioethanol production processes and purification technology using membranes. In *Studies in Surface Science and Catalysis* (Vol. 179, pp. 359-384). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64337-7.00019-7>
- Shang, X., Huang, H., Han, Q., Xu, Y., Zhao, Y., Wang, S., & Ma, X. (2019). Preferential synthesis of ethanol from syngas via dimethyl oxalate hydrogenation over an integrated catalyst. *Chemical Communications*, 55(39), 5555–5558. <https://doi.org/10.1039/C9CC02372K>
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. In *Methods in enzymology* (Vol. 350, pp. 3-41). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X)

- Singhvi, M. S., & Gokhale, D. V. (2019). Lignocellulosic biomass: hurdles and challenges in its valorization. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(23), 9305-9320. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10212-7>
- Spivey, J. J., & Egbebi, A. (2007). Heterogeneous catalytic synthesis of ethanol from biomass-derived syngas. *Chemical Society Reviews*, 36(9), 1514–1528. <https://doi.org/10.1039/B414039G>
- Stikane, A., Dace, E., & Stalidzans, E. (2022). Closing the loop in bioproduction: Spent microbial biomass as a resource within circular bioeconomy. *New Biotechnology*, 70, 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.06.001>
- Todhanakasem, T., Wu, B., & Simeon, S. (2020). Perspectives and new directions for bioprocess optimization using *Zymomonas mobilis* in the ethanol production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 112. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02885-4>
- Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. (2021). Production of bioethanol—A review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation*, 7(4), 268. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>
- Vaheed, H., Shojaosadati, S. A., & Galip, H. (2011). Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 101-111. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0835-1>
- Valdes, C. (2011). *Brazil's ethanol industry: Looking forward* (pp. 4-7). United States Department of Agriculture. <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details?pubid=35829>
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573-584. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>

- Wang, C., Huang, Y., Wang, L., & Xiao, F. S. (2022). Structure-performance interplay of rhodium-based catalysts for syngas conversion to ethanol. *Materials Chemistry Frontiers*, 6(6), 663-679. <https://doi.org/10.1039/D1QM01457A>
- Xiang, H., Xin, R., Prasongthum, N., Natewong, P., Sooknoi, T., Wang, J., ... & Fan, X. (2022). Catalytic conversion of bioethanol to value-added chemicals and fuels: A review. *Resources Chemicals and Materials*, 1(1), 47-68. <https://doi.org/10.1016/j.recmm.2021.12.002>
- Yalimkaya, S., & Özdemir, Y. (2022). Optimization of Sugar Extraction From Carob Pods. *Chemistry Africa*, 5(5), 1573-1587. <https://doi.org/10.1007/s42250-022-00403-7>
- Yang, S., Fei, Q., Zhang, Y., Contreras, L. M., Utturkar, S. M., Brown, S. D., Zhang, M. (2016). *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. *Microbial biotechnology*, 9(6), 699-717. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12408>
- Yang, S., Franden, M. A., Wang, X., Chou, Y. C., Hu, Y., Brown, S. D., Zhang, M. (2020). Transcriptomic profiles of *Zymomonas mobilis* 8b to furfural acute and long-term stress in both glucose and xylose conditions. *Frontiers in microbiology*, 11, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00013>
- Yang, Q., Yang, Y., Tang, Y. *et al.* Development and characterization of acidic-pH-tolerant mutants of *Zymomonas mobilis* through adaptation and next-generation sequencing-based genome resequencing and RNA-Seq. *Biotechnol Biofuels* 13, 144 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01781-1>
- Yoro, K. O., & Daramola, M. O. (2020). CO₂ emission sources, greenhouse gases, and the global warming effect. In *Advances in carbon capture* (pp. 3-28). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819657-1.00001-3>
- Yuan, Y., Jiang, B., Chen, H., Wu, W., Wu, S., Jin, Y., et al. (2021). Recent advances in understanding the effects of lignin structural characteristics on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02054-1>

- Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and sustainable energy reviews*, 66, 751-774.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>
- Zhang, M. (2007). *Zymomonas* Pentose-Sugar Fermenting Strains and Uses Thereof. (Patent No. 7,223,575 B2). <https://image-ppubs.uspto.gov/dirsearch-public/print/downloadPdf/7223575>
- Zhang, K., Lu, X., Li, Y., Jiang, X., Liu, L., & Wang, H. (2019). New technologies provide more metabolic engineering strategies for bioethanol production in *Zymomonas mobilis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 2087-2099.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09620-6>
- Zikmanis, P., Krúče, R. & Auzin, a, L. An elevation of the molar growth yield of *Zymomonas mobilis* during aerobic exponential growth. *Arch Microbiol* **167**, 167–171 (1997).
<https://doi.org/10.1007/s0020300050430>

9 ANEXOS

9.1 Determinación de proteínas: Método micro-Kjeldahl

Material:

- Tubos Kjeldahl
- Matraz Erlenmeyer de 125 mL
- Agitador magnético
- Bureta
- Soporte universal
- Pinzas para soporte
- Soporte para tubos
- Bomba de recirculación de agua

Equipo

- Balanza analítica
- Digestor
- Destilador micro-Kjeldahl
- Placa de agitación

Reactivos

- H_2SO_4 concentrado
- NaOH 60%
- Catalizador de proteínas
- Solución de H_3BO_3 saturado
- HCl 0.1 N
- Indicador rojo de metilo-azul de metileno

Procedimiento

1. Si se trata de una muestra sólida hay que triturar.

2. Pesar de 0.25 a 0.5 g de muestra o 1 mL en caso de ser muestra líquida directamente en el tubo Kjeldahl
3. Agregar 1 g de catalizador y 2.5 mL de H₂SO₄ concentrado.
4. Colocar en el digestor de 1 a 2 h o hasta obtener un cambio de color a tono claro en el tubo (con campana o recirculador de gases)
5. Dejar enfriar y que se retiren los vapores (35 min aprox.)
6. Preparación de destilación:
 - En matraz medir 5 mL de solución de H₃BO₃ y dos gotas de indicador
 - Armar y precalentar el destilador micro-Kjeldahl llenando la copa de NaOH con 10 mL de NaOH 60%
 - Conectar un tubo con muestra digerida y el matraz preparado
7. Cuando se genera suficiente vapor de agua y se vea una ebullición constante en el tanque de agua, permitir el flujo de NaOH (cerrar la llave cuando todo el NaOH haya sido vaciado)
8. Cuando el volumen del matraz llegue a 50 mL, parar la destilación.
9. Titular con HCl 0.1 N hasta tener un vire de color a rosa.

El porcentaje de proteína cruda en la muestra se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\%Proteína = \frac{V_{HCl} \times N_{HCl} \times 0.014 \times 6.25}{Peso\ de\ muestra\ (g)} \times 100$$

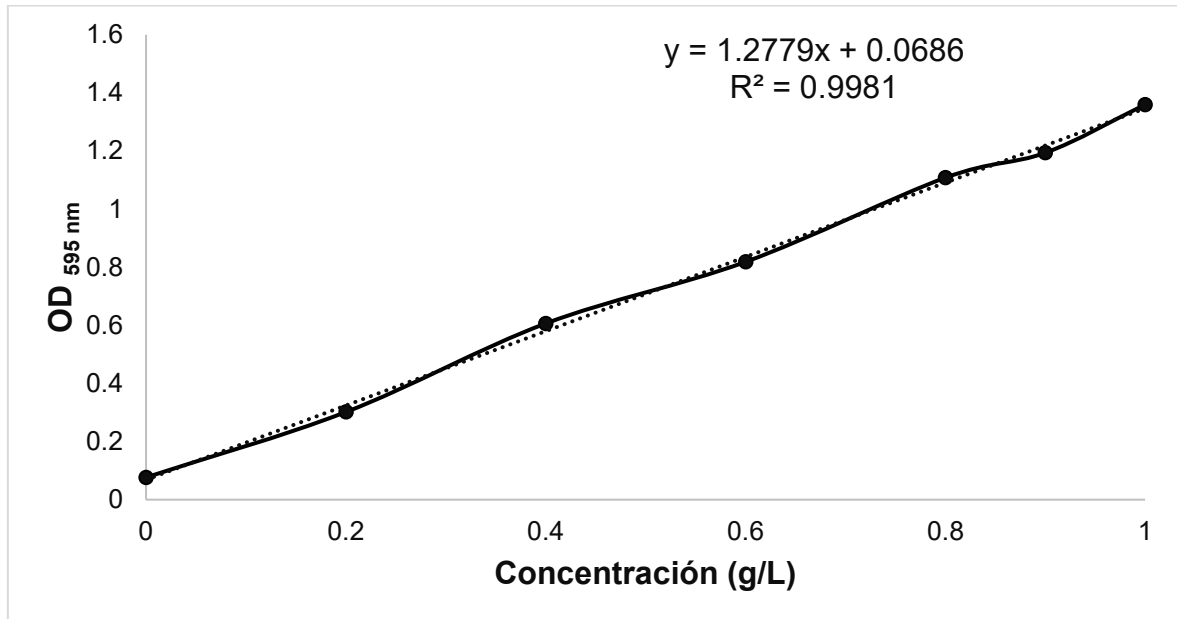
V_{HCl} = Volumen de HCl gastado en la titulación (mL)

N_{HCl} = Normalidad del HCl (0.1 N)

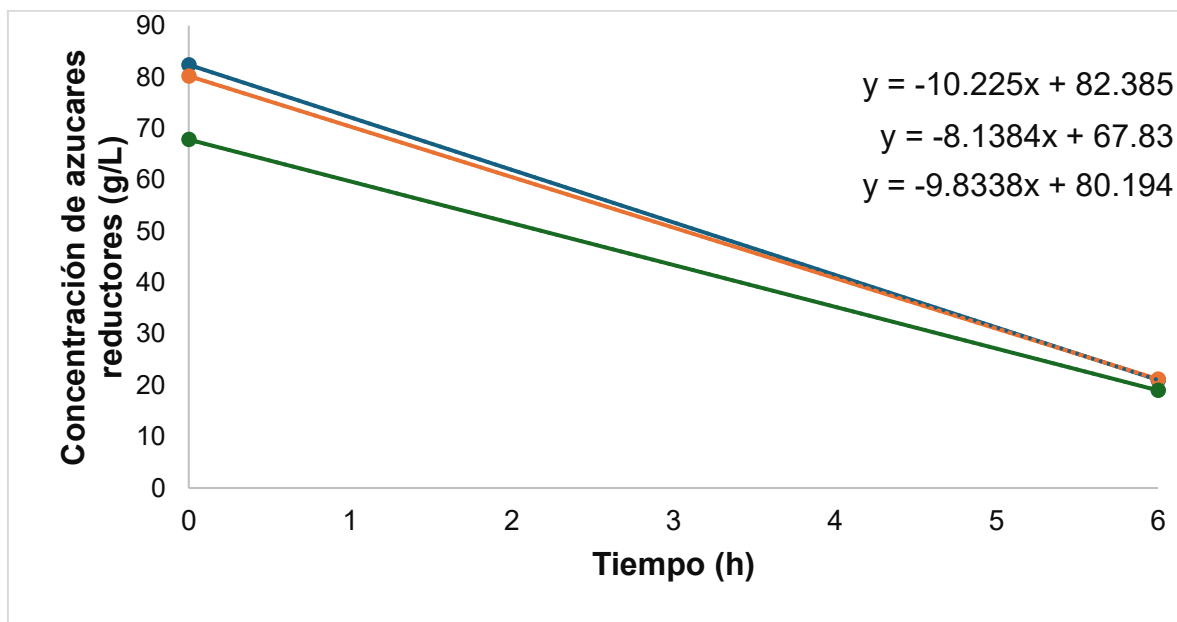
0.014 = Miliequivalente del nitrógeno

6.25 = Factor de conversión de nitrógeno a proteína

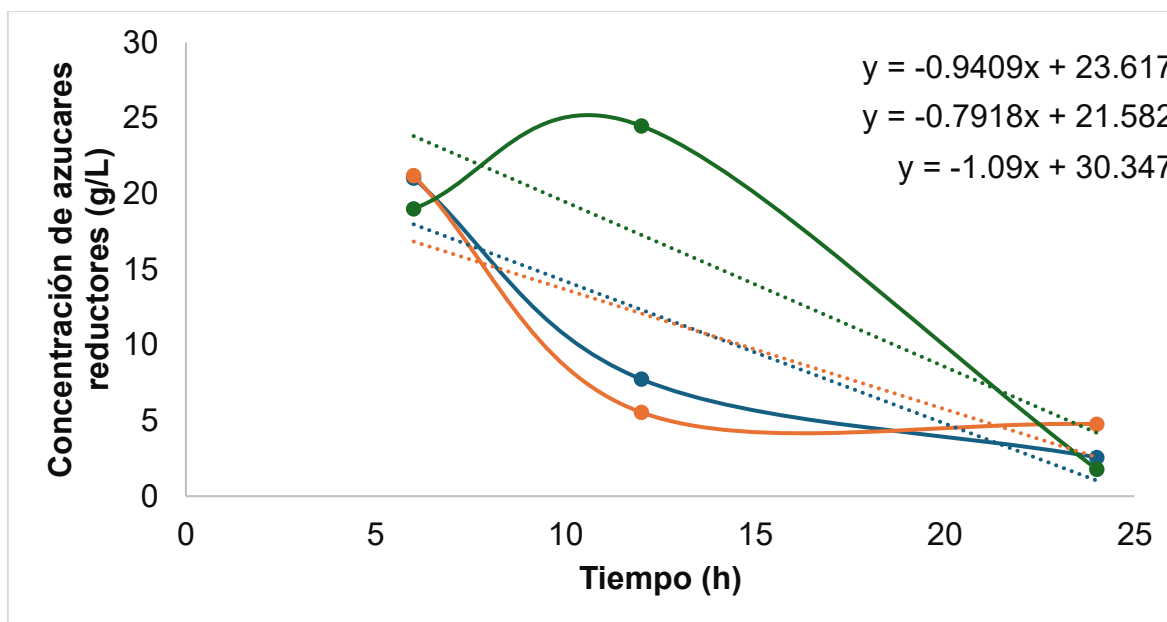
9.2 Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores presentes en medios de fermentación utilizando dextrosa como patrón.



9.3 Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores en fase I del crecimiento diauxico en biorreactor.

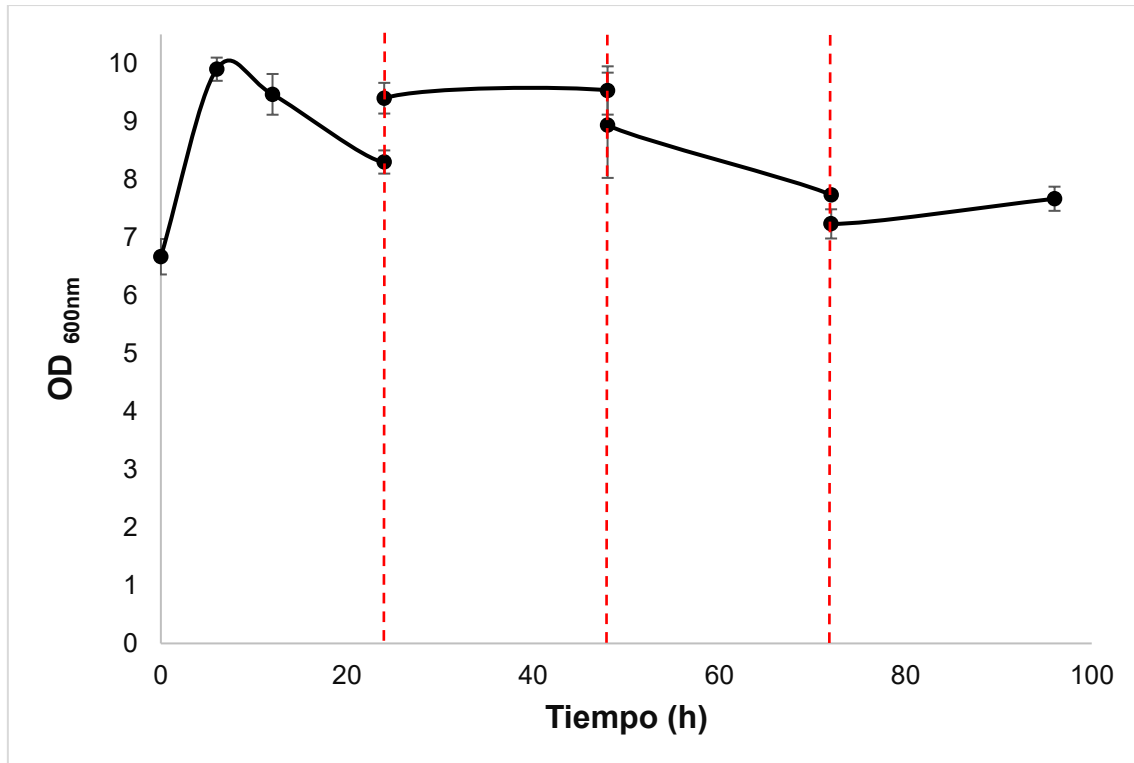


9.4 Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores en fase II del crecimiento diauxico en biorreactor.



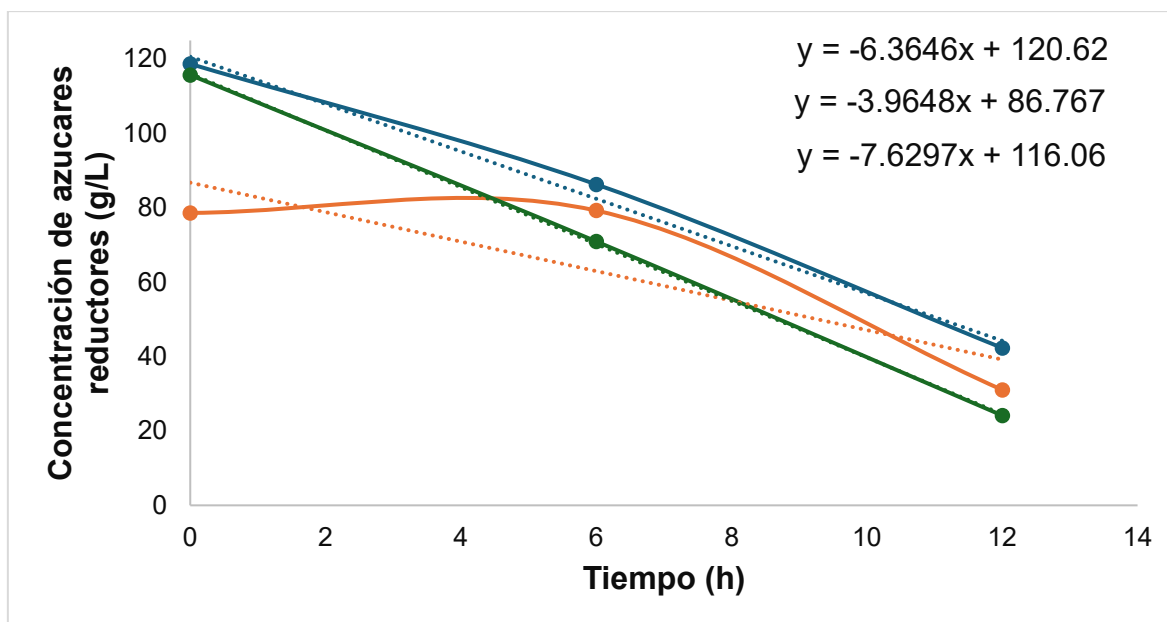
9.5 Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* expresada en densidad óptica (OD_{600nm})

a)

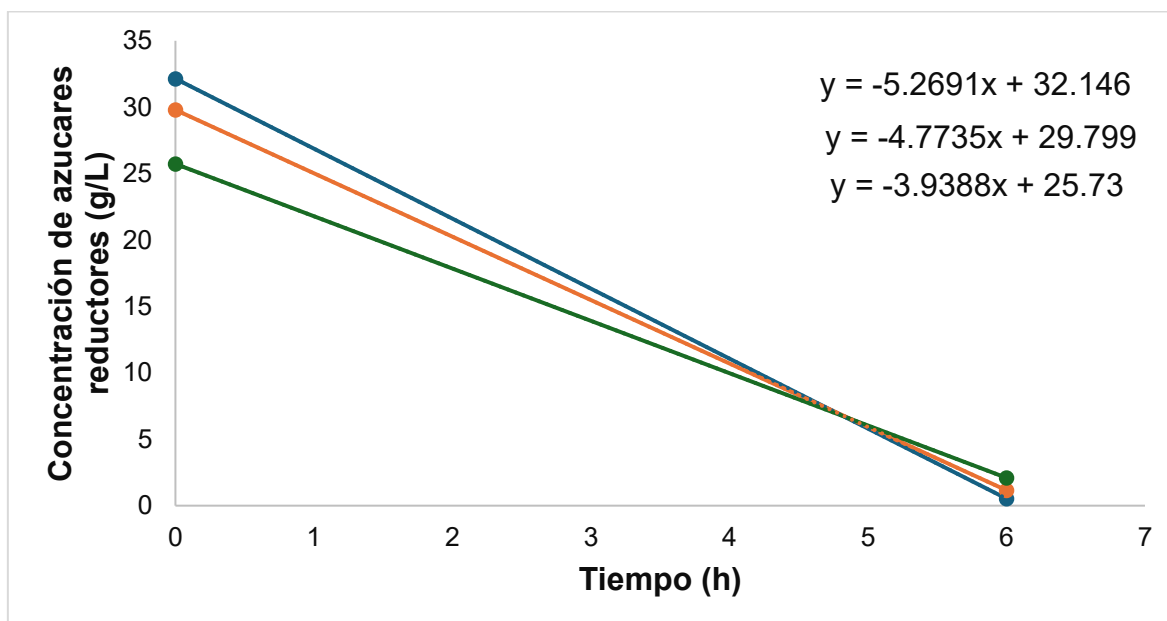


b) Para alcanzar una La OD_{600nm} inicial de 6.6 fue necesario adaptar las células previamente, para ello se realizó un pre-cultivo en matraz de 200 mL en donde se colocaron 100 mL de medio posteriormente fueron cosechadas tras centrifugar a 5000 rpm por 5 min, la densidad de *Z. mobilis*, alcanzada en ese preinoculo fue 16.5.

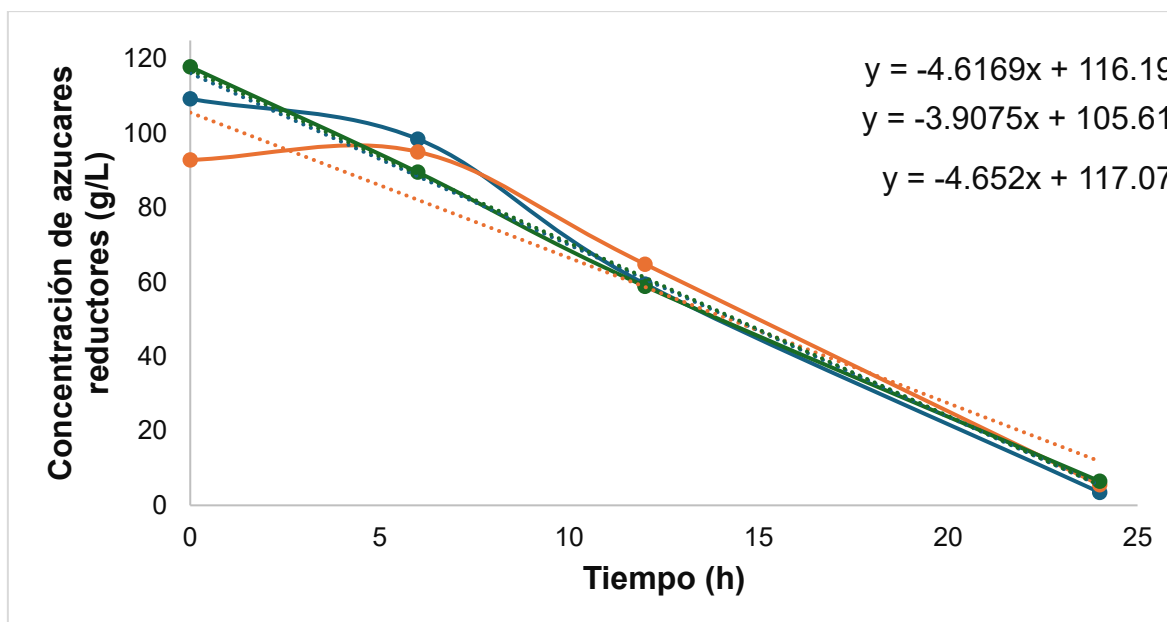
9.6 Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores por *Z. mobilis* en ensayo (medio definido).



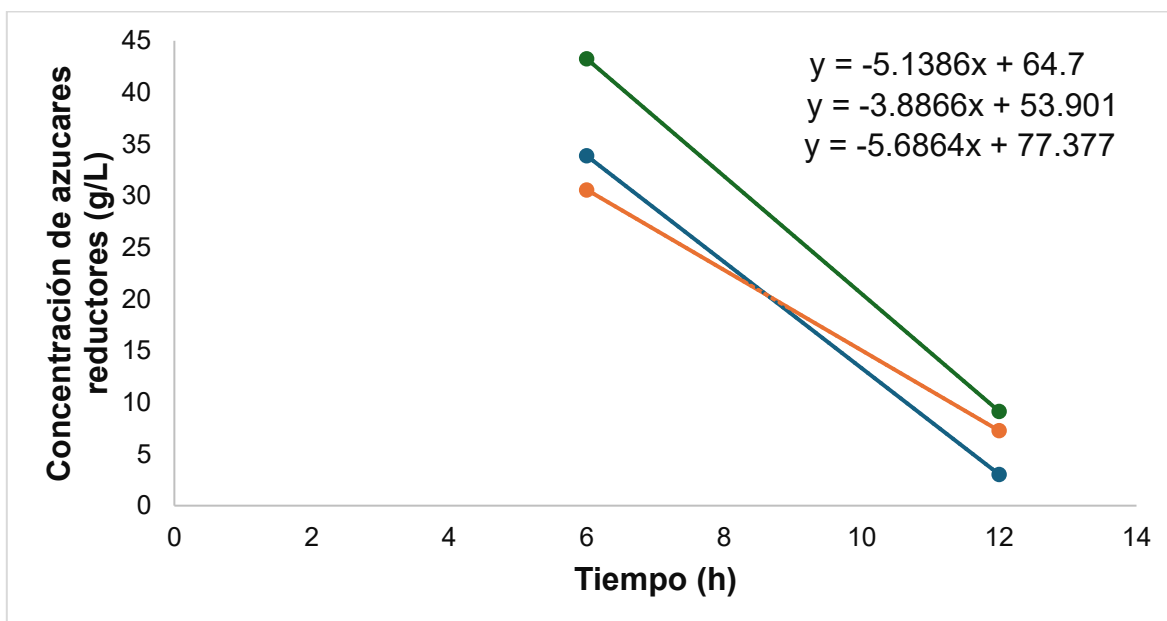
9.7 Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores por *Z. mobilis* en ensayo (HVM).



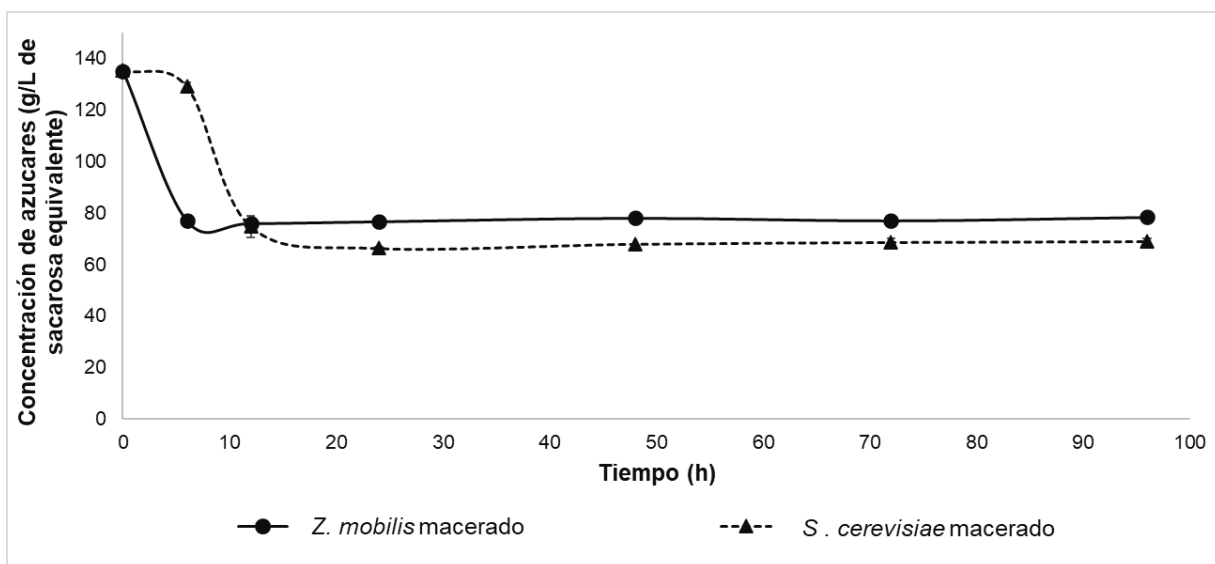
9.8 Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores por *S. cerevisiae* en ensayo (medio definido).



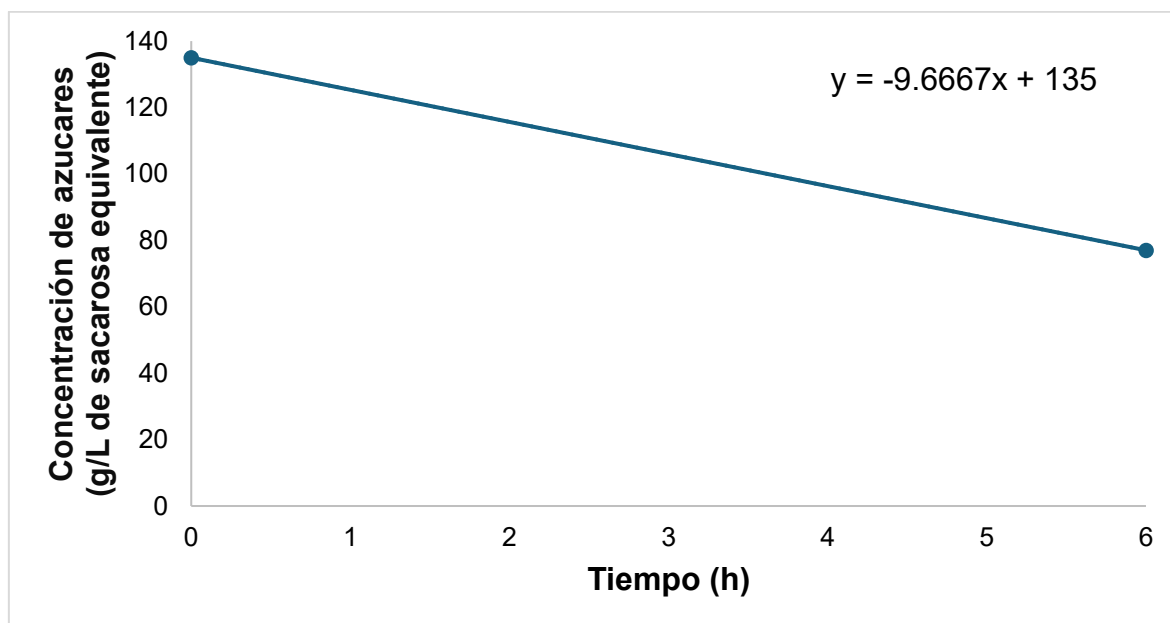
9.9 Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores por *S. cerevisiae* en ensayo (HVM).



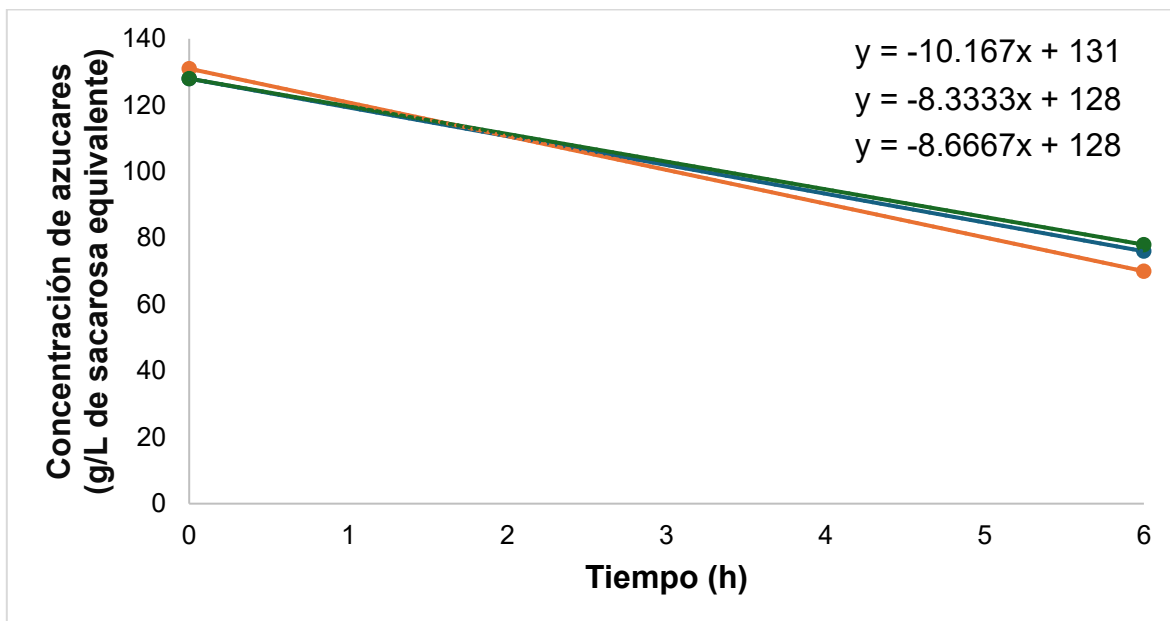
9.10 Cinética de consumo de azúcares (equivalente de °Bx a g/L de sacarosa), en HVM utilizando *Z. mobilis* y *S. cerevisiae*.



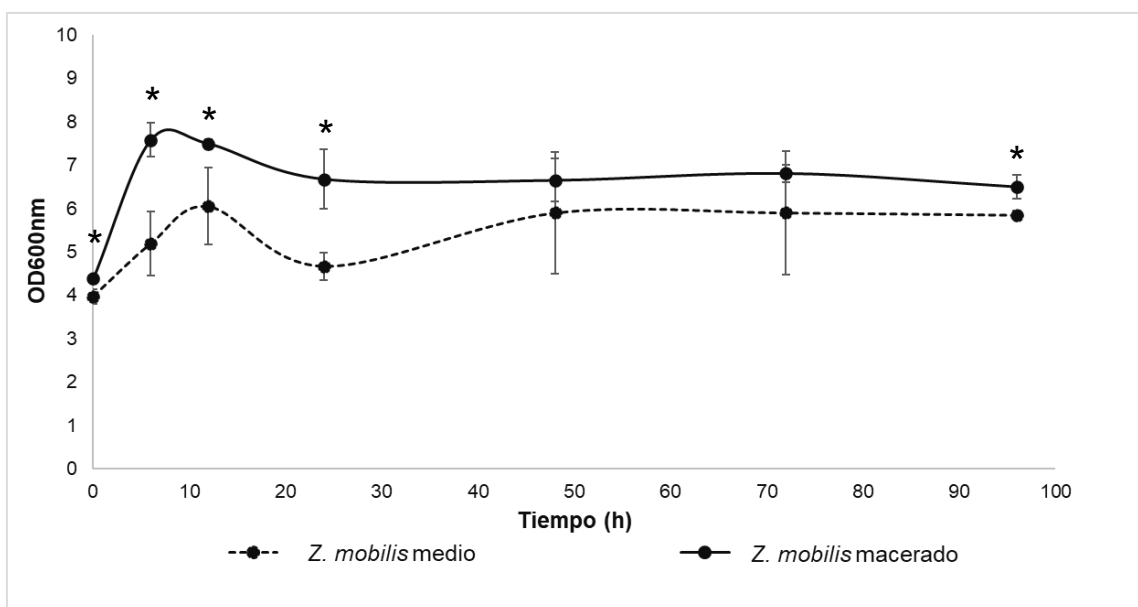
9.11 Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares (equivalente de °Bx a g/L de sacarosa) por *Z. mobilis* en ensayo (HVM).



9.12 Gráfico para determinación de velocidad específica de consumo de azúcares (equivalente de °Bx a g/L de sacarosa) por *S. cerevisiae* en ensayo (HVM).

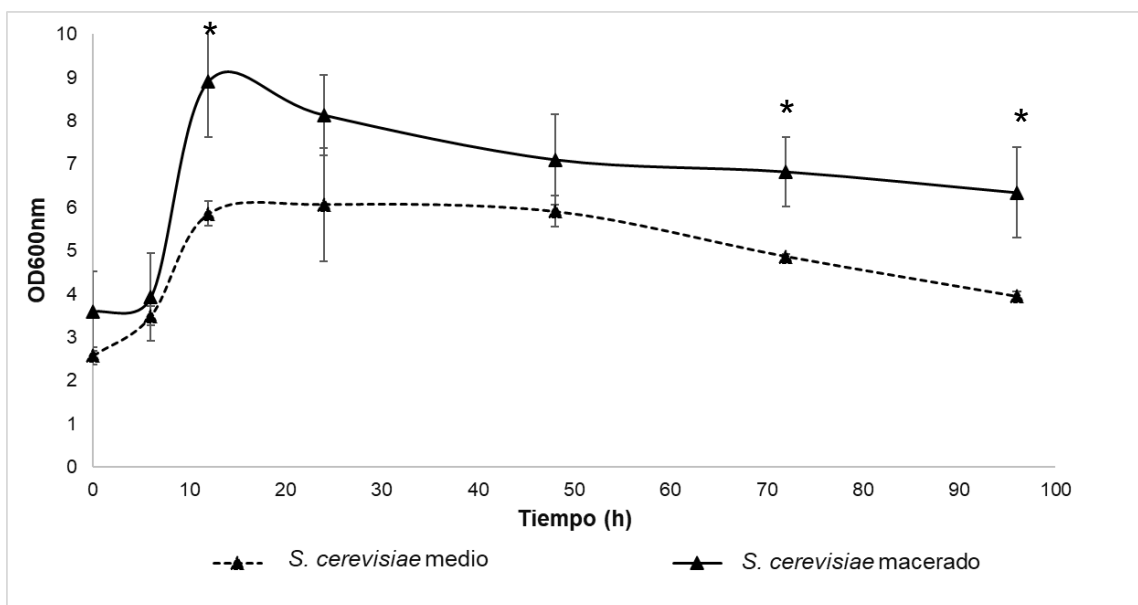


9.13 Cinética de crecimiento de *Z. mobilis* en medio definido y en HVM, expresada en términos de densidad óptica a 600 nm.



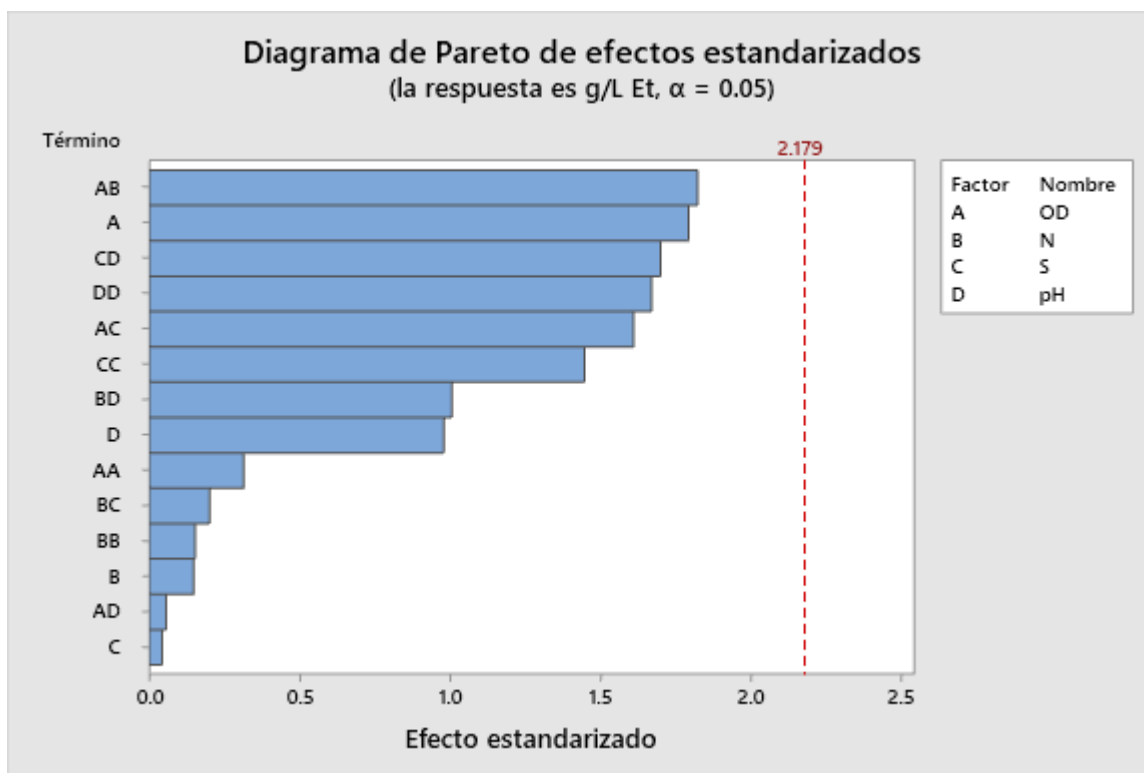
Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ambos tratamientos en el mismo tiempo de muestreo, de acuerdo con la prueba de Tukey.

9.14 Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* en medio definido y en HVM, expresada en términos de densidad óptica a 600 nm.



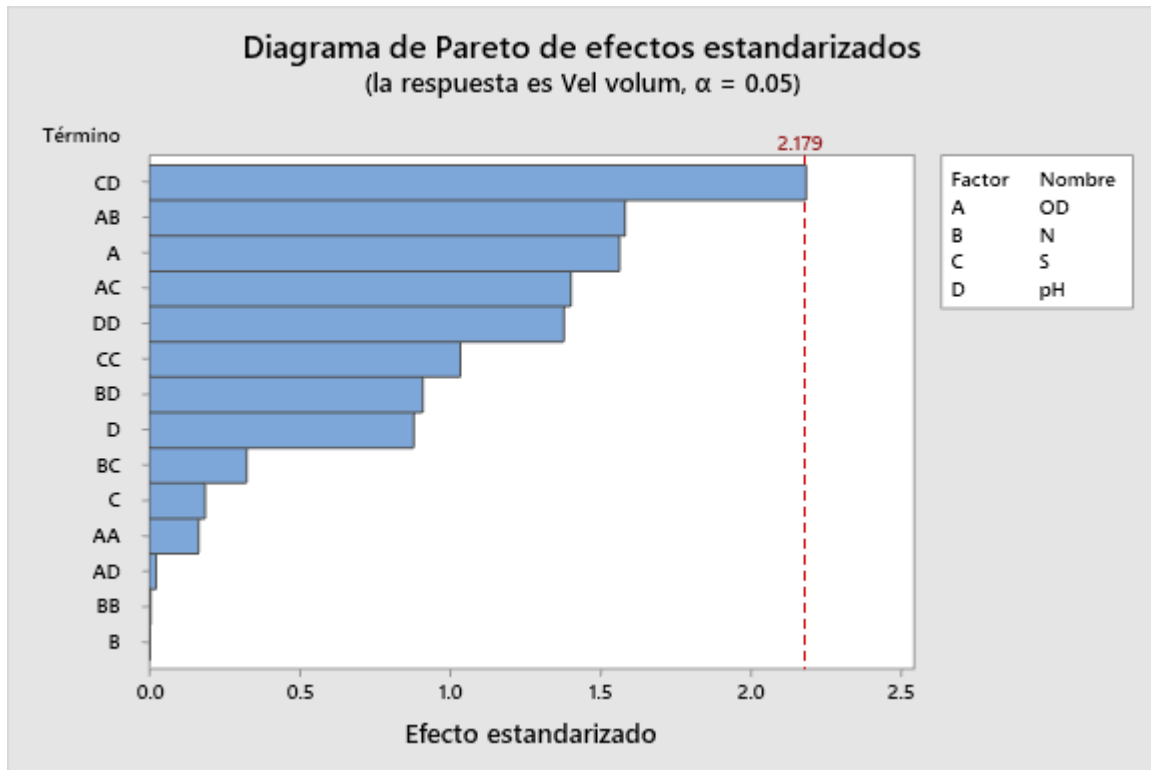
Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ambos tratamientos en el mismo tiempo de muestreo, de acuerdo con la prueba de Tukey.

9.15 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados que identifican los factores que afectan la concentración de etanol.



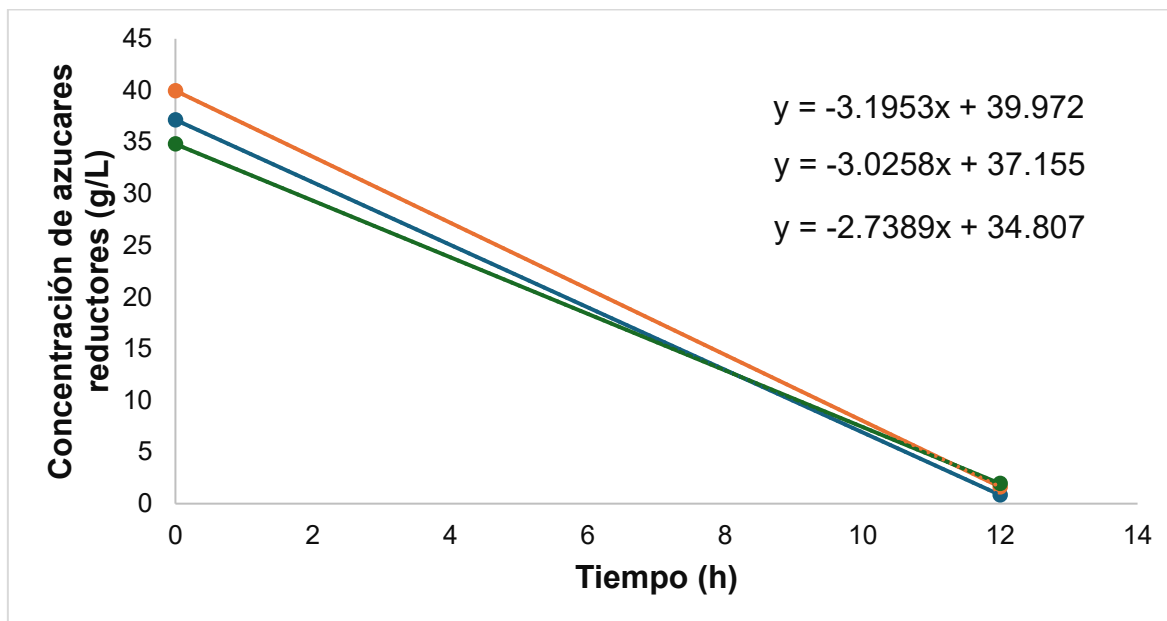
La línea roja indica el umbral de significancia estadística ($t = 2.179$).

9.16 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados que identifican los factores que afectan la velocidad de producción volumétrica



La línea roja indica el umbral de significancia estadística ($t = 2.179$).

9.17 Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares reductores de HVM en biorreactor por *Z. mobilis* (condiciones optimizadas)



9.18 Determinación de velocidad específica de consumo de azúcares (equivalente de °Bx a g/L de sacarosa) por *Z. mobilis*

