

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Ciencias Agrícolas



**Evaluación de la producción de bioetanol a partir de
residuos vinícolas producidos en Baja California**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO

PRESENTA

Edgar Iram Castillo Expósito

DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Olivia Tzintzun Camacho

ESTA TESIS FUE ACEPTADA POR EL COMITÉ REVISOR, MISMO QUE LA DIRIGIO Y LA APROBÓ COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL:

TÍTULO DE:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO.

COMITÉ REVISOR

DRA. OLIVIA TZINTZUN CAMACHO
PRESIDENTE

DR. DANIEL GONZALEZ MENDOZA
SECRETARIO

DR. DAGOBERTO DURAN HERNANDEZ
SINODAL

M. EN B. CARLOS FRANCISCO MORENO CRUZ
SINODAL

EJIDO NUEVO LEÓN, MEXICALI, B.C. OCTUBRE 2021

I. AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Olivia Tzintzun Camacho, que me guio durante mi proyecto de tesis, me motivo a seguir aprendiendo, salir de mi zona de confort y por todo el aprendizaje que me brindo durante mi licenciatura y trabajo de tesis.

A los profesores, Dr. Daniel González, Dr. Dagoberto, Dra. Claudia Yared, Dra. Lucero Camacho, Dra. Adriana Morales, Dr. Miguel Cervantes, Dra. Noemi Torrentera, Dra. Ana Laura, y más, que marcaron mi formación como biotecnólogo en el instituto, me hicieron apasionarme por aprender más de mi carrera y sobre todo por toda su enseñanza y apoyo.

A mis compañeros y amigos, Valeria, Araceli, Esmeralda, Estefanía, Arturo, Odalys, Evelyn, Claudia y más, gracias por los buenos recuerdos, risas, platicas, ánimo y aprendizaje que cada uno me brindo.

Al Instituto de Ciencias Agrícolas (UABC) por el apoyo y gestión de todo el personal que contribuyeron en mi formación y al comité evaluador de esta tesis.

Y sobre todo a mi mamá y familia, que siempre me otorgaron su cariño y apoyo.

II. DEDICATORIA

Con gran cariño y orgullo, a mi mamá:

María Carmen Expósito Hernández

Gracias por tu apoyo incondicional, tu cariño y sobre todo tu esfuerzo, que, gracias a él, me ha permitido cumplir mis sueños, metas y superar los retos que conlleva, en los cuales siempre me has acompañado, siendo el apoyo más grande en mi vida.

a mi **Familia y amigos,**

Que me brindaron su apoyo, ánimo y cariño.

INDICE DE CONTENIDO

I. AGRADECIMIENTOS	3
II. DEDICATORIA	4
III. INDICE DE CUADROS	8
IV. INDICE DE FIGURAS	9
V. RESUMEN	11
VI. ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1 BIOCOMBUSTIBLES	15
2.1.1 GENERALIDADES	15
2.1.2 CLASIFICACIÓN	15
2.1.3 IMPORTANCIA	16
2.2 BIOETANOL	18
2.2.1 GENERALIDADES	18
2.2.2 TIPOS DE ETANOL	20
2.2.3 APLICACIONES DEL ETANOL	20
2.2.4 DESARROLLO HISTÓRICO DEL BIOETANOL	21
2.2.5 PANORAMA ACTUAL	22
2.3.1.3 MÉXICO	22
2.3.1.4 PANORAMA INTERNACIONAL	25
2.3 PRODUCCIÓN BIOETANOL	26
2.3.1 MATERIAS PRIMAS EMPLEADAS	26
2.3.1.1 BIOMASA AZUCARADA	27
2.3.1.2 BIOMASA AMILÁCEA	27
2.3.1.5 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	27
2.3.2 COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.	28
2.3.2.1 CELULOSA	28
2.3.2.2 HEMICELULOSA	29
2.3.2.3 LIGNINA	30
2.3.3 PROCESAMIENTO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	31
2.3.3.1 PRETRATAMIENTO	32
2.3.3.2 HIDRÓLISIS	34
2.3.3.3 FERMENTACIÓN	36

2.3.3.4	DESTILACIÓN	38
2.4	PROCESO DE VINIFICACIÓN Y GENERACIÓN DE RESIDUOS.	39
2.4.1	CULTIVO DE LA VID (<i>VITIS VINÍFERA</i> L.)	39
2.4.1.1	GENERALIDADES Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>VITIS VINÍFERA</i> L.	39
2.4.1.2	CULTIVO	41
2.4.2	VINO	46
2.4.2.1	GENERALIDADES	46
2.4.2.2	CONTEXTO MUNDIAL DE LA PRODUCCIÓN DE VINO	47
2.4.2.3	PRODUCCIÓN ACTUAL EN MÉXICO	47
2.4.2.4	BAJA CALIFORNIA EN LA INDUSTRIA VINÍCOLA	48
2.4.2.5	PROCESO DE VINIFICACIÓN.	50
2.4.3	RESIDUOS VINÍCOLAS	56
2.4.3.1	GENERALIDADES	56
2.4.3.2	UTILIZACIÓN ACTUAL DE LOS RESIDUOS VINÍCOLAS	57
2.4.4	ORUJO	58
2.4.4.1	COMPOSICIÓN DEL ORUJO	59
2.4.4.2	USO DEL ORUJO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES	60
3.	JUSTIFICACIÓN	62
4.	HIPÓTESIS	63
5.	OBJETIVOS	63
5.1	OBJETIVO GENERAL	63
5.2	OBJETIVOS PARTICULARES	63
6.	MÉTODOS	64
6.1	RECOLECCIÓN DE RESIDUOS VINÍCOLAS	64
6.2	PROCESAMIENTO DE RESIDUOS VINÍCOLAS	64
6.3	PRETRATAMIENTOS DE HIDRÓLISIS DE LOS RESIDUOS VINÍCOLAS	64
6.3.1	MÉTODO 1	64
6.3.2	MÉTODO 2	65
6.4	CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS PROVENIENTES DE LOS RESIDUOS VINÍCOLAS.	66
6.4.1	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y TOTALES	66
6.4.2	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.	67
6.4.3	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	67
6.5	DESARROLLO DE CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	68
6.5.1	PREPARACIÓN DEL PREINÓCULO	68
6.5.2	DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	68
6.5.3	DESARROLLO DE CINÉTICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	70
6.5.4	ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	70
6.5.4.1	CUANTIFICACIÓN DE CO ₂	71
6.5.4.2	CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	71
6.5.4.3	ANÁLISIS DE PH	71

6.5.4.4	BIOMASA POR PESO SECO	72
6.5.4.5	DETERMINACIÓN DE ETANOL	72
6.5.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
6.5.6	PARÁMETROS CINÉTICOS	74
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
7.1	COMPOSICIÓN MÁSCICA DE LOS ORUJOS DE UVA	75
7.2	EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE HIDRÓLISIS DE LOS ORUJOS DE UVA	76
7.3	COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LOS HIDROLIZADOS DE RESIDUOS VINÍCOLAS	78
7.4	EFFECTO DE LAS FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EMPLEANDO LOS HIDROLIZADOS DE LOS RESIDUOS VINÍCOLAS.	79
7.4.1	HIDROLIZADOS DE ORUJO DE VINO ROSADO	79
7.4.2	HIDROLIZADOS DE ORUJO DE VINO BLANCO	81
7.5	CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE ORUJOS DE UVA	83
7.5.1	HIDROLIZADOS DE ORUJO DE VINO ROSADO	83
7.5.2	HIDROLIZADOS DE ORUJO DE VINO BLANCO	85
VIII.	CONCLUSIONES	88
IX.	PERSPECTIVAS	89
X.	BIBLIOGRAFÍA	90

III. INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades Fisicoquímicas del Etanol.....	19
Cuadro 2. Permisos de producción de Bioenergéticos hasta el 2018	24
Cuadro 3. Ejemplos de biomasa utilizada en la producción de bioetanol.....	26
Cuadro 4. Clasificación Taxonómica de <i>Vitis vinífera</i> L.....	40
Cuadro 5. Ejemplos de variedades productores de uva, su uso y sus características.....	41
Cuadro 6. Fases del ciclo biológico de la vid.....	44
Cuadro 7. Características y clasificación del vino.....	47
Cuadro 8. Principales variedades para vino cultivadas en Baja California...	49
Cuadro 9. Constituyentes del orujo de uva promedio.....	58
Cuadro 10. Contenido de medio control.....	69
Cuadro 11. Contenido de soluciones salinas saturadas con distinta fuente de nitrógeno.....	69
Cuadro 12. Compuestos bioactivos presentes en los hidrolizados de los orujos de uva para vino rosado y vino blanco.....	79
Cuadro 13. Evaluación de la producción de bioetanol empleando hidrolizados de orujo de vino rosado enriquecido con diferentes fuentes de nitrógeno.	80
Cuadro 14. Evaluación de la producción de bioetanol empleando hidrolizados de orujo de vino blanco enriquecido con diferentes fuentes de nitrógeno.	81
Cuadro 15. Parámetros cinéticos en la producción de bioetanol empleando el hidrolizado de orujo rosado enriquecido con extracto de levadura a lo largo de 24 h.....	85
Cuadro 16. Parámetros cinéticos en la producción de bioetanol empleando el hidrolizado de orujo blanco enriquecido con extracto de levadura a lo largo de 24 h.	86

IV. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los biocombustibles.....	16
Figura 2. Consumo de energía por fuente de generación del 2000 al 2020.....	17
Figura 3. Producción de energía por fuente de generación del 2000 al 2020.....	18
Figura 4. Estructura química del etanol.....	19
Figura 5. Producción mundial de etanol en el 2019.....	25
Figura 6. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica.....	28
Figura 7. Estructura de la Celulosa: A. Cadena simple. B. Microfibrillas.....	29
Figura 8. A. Hexosas y pentosas comúnmente encontradas en la hemicelulosa. B. Ejemplo de la estructura de la hemicelulosa...	30
Figura 9. Estructura de la lignina.....	31
Figura 10. Biomasa lignocelulósica tras pretratamiento.....	32
Figura 11. Pretratamientos de biomasa lignocelulósica y ejemplos.....	33
Figura 12. Rutas metabólicas por las que se sintetiza el etanol en <i>S. cerevisiae</i>	37
Figura 13. Anatomía de la vid.....	39
Figura 14. Franja del vino.....	41
Figura 15. Total, de Hectáreas cultivadas de uva en el mundo.....	45
Figura 16. Composición química promedio del vino.....	46
Figura 17. Diagrama general de la producción de vino tinto.....	52
Figura 18. Diagrama general de la producción de vino blanco.....	54
Figura 19. Diagrama general de la producción de vino rosado.....	56
Figura 20. Balance de masa de la vinificación.....	57
Figura 21. Diagrama del análisis de muestras.....	70
Figura 22. Ejemplificación del sistema para la cuantificación de CO ₂	70
Figura 23. Composición másica de los orujos de uva para vino rosado y vino blanco.....	75

Figura 24. Concentración de azúcares reductores en los hidrolizados de los orujos de vino rosado y vino blanco evaluando dos métodos de hidrólisis.....	77
Figura 25. Cinéticas de producción de bioetanol, CO ₂ , biomasa, consumo de azúcares reductores y cambios de pH empleando el hidrolizado de orujo rosado enriquecido con extracto de levadura a lo largo de 24 h.	84
Figura 26. Cinéticas de producción de bioetanol, CO ₂ , biomasa, consumo de azúcares reductores y cambios de pH empleando el hidrolizado de orujo blanco enriquecido con extracto de levadura a lo largo de 24 h.	86

V. RESUMEN

Ante la crisis ambiental y el calentamiento global, la dependencia y uso de los combustibles fósiles debe reducirse; por lo que son necesarias fuentes de energía más amigables con el medio ambiente, como los biocombustibles. El bioetanol es el biocombustible mayormente utilizado, principalmente, es producido por la fermentación de azúcares o almidón provenientes de cultivos alimenticios. Por ello, su producción a partir de residuos agroindustriales lignocelulósicos representa una prometedora alternativa. Baja California es uno de los principales productores de vino a nivel nacional, y derivado del proceso de vinificación se genera una gran cantidad de residuos como el orujo. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue evaluar diferentes pretratamientos de hidrólisis de los residuos vinícolas de Baja California y el diseño de medios de cultivo para la producción de bioetanol. Se evaluaron dos métodos de hidrólisis de los orujos de uva blanca y rosada. Posteriormente, se realizó la caracterización fisicoquímica de los hidrolizados (azúcares reductores, fenoles, flavonoides, y actividad antioxidante). Finalmente, se diseñaron medios de cultivo a partir de los hidrolizados de orujo de uva y se suplementaron con diferentes fuentes de nitrógeno para evaluar la producción de bioetanol. Como resultado de la evaluación de los métodos de hidrólisis, con el método 2 se alcanzó una mayor concentración de azúcares en el orujo de vino blanco y rosado (13.62 ± 0.45 g/L y 13.61 ± 0.70 g/L, respectivamente). En los estudios de producción de bioetanol se observó que los hidrolizados de orujo de uva blanca y rosada enriquecidos con extracto de levadura presentaron una mayor conversión de sustrato (90.45 ± 0.71 % y 84.58 ± 0.13 %, respectivamente) y producción de etanol (3.18 ± 0.02 g/L y 4.03 ± 0.01 g/L, respectivamente); en comparación con los otros medios evaluados. Cabe destacar que el hidrolizado de orujo de vino rosado presentó una alta tasa específica de producción de etanol ($q_{\text{Etanol}/X} 0.36 \pm 0.10$ h⁻¹), una alta velocidad específica de crecimiento ($\mu 0.1466$ h⁻¹), y conversión de sustrato (82.02 ± 0.54 %). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio demuestran el potencial de los orujos de uva como fuente de azúcares para la producción de bioetanol.

Palabras clave: bioetanol, hidrolizados, orujos de uva, azúcares, Biomasa lignocelulósica.

VI. ABSTRACT

The dependence and use of fossil fuels must be reduced due to the environmental crisis and global warming; therefore more environmentally friendly energy sources are necessary, such as biofuels. Bioethanol is the most widely used biofuel, mainly, it is produced by the fermentation of sugars or starch from food crops. Its production from lignocellulosic agroindustrial waste represents a promising alternative. Baja California is one of the main wine producers nationwide, and derived from the winemaking process a large amount of waste is generated, such as grape marc. Therefore, the objective of this study was to evaluate different hydrolysis pretreatments of wine residues from Baja California and the design of culture media for the production of bioethanol. Two hydrolysis methods were evaluated for white and rose grape marcs. Subsequently, a physicochemical characterization of the hydrolysates was carried out (reducing sugars, phenols, flavonoids, and antioxidant activity). Finally, culture media from grape marc hydrolysates were designed and supplemented with different nitrogen sources to evaluate the bioethanol production. As a result of the evaluation of the hydrolysis methods, a high concentration of sugars was obtained with the method 2 for the white and rose grape marcs (13.62 ± 0.45 g / L and 13.61 ± 0.70 g / L, respectively). In the case of bioethanol production assays, using hydrolysates of white and rose grape marc supplemented with yeast extract, a high substrate conversion was observed ($90.45 \pm 0.71\%$ and $84.58 \pm 0.13\%$, respectively). In addition, a high ethanol production was obtained compared with the other media (3.18 ± 0.02 g / L and 4.03 ± 0.01 g / L, respectively). Particularly, the hydrolysate of rose grape marc showed a high ethanol production rate (q_{Etanol} / X 0.36 ± 0.10 h⁻¹), a high specific growth rate (μ 0.1466 h⁻¹), and substrate conversion ($82.02 \pm 0.54\%$). Therefore, the results obtained in this study demonstrate the potential of grape marcs as a source of sugars for the production of bioethanol.

Keywords: bioethanol, hydrolysates, grape marc, sugars, lignocellulosic biomass.

1. INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles son la fuente principal de energía en el mundo, recurso no renovable y que además está relacionado con la aceleración del calentamiento global por el incremento en la emisión de gases de efecto invernadero que conlleva su uso. Por ello, una mayor responsabilidad ambiental en la producción de combustibles y alternativas son necesarias en la sociedad actual (Castillo et al., 2012; Soccol *et al.*, 2019; Bušić *et al.*, 2018).

Los biocombustibles, como el bioetanol o biodiesel, representan una alternativa viable y actual como sustituto de los combustibles fósiles. El bioetanol, ha sido reconocido como una potencial alternativa a los combustibles derivados del petróleo (Bušić *et al.*, 2018). Es producido a partir de la fermentación de azúcares derivados de distintas fuentes, actualmente, los principales productores como Estados Unidos, Brasil y la Unión Europea, llevan a cabo una producción de primera generación, esto quiere decir que se utilizan como materia prima cultivos alimenticios ricos en azúcar y almidón, como lo son la caña de azúcar, remolacha, maíz y trigo, teniendo ciertas limitantes ya que compiten con el abastecimiento alimenticio, son insuficientes para la demanda creciente de combustibles y tienen un impacto negativo en la biodiversidad e incluso la posibilidad de generar deforestación para conseguir áreas de cultivo (Bajpai, 2013; Energías Renovables, 2018; Saini *et al.*, 2015; Mohanty *et al.*, 2019).

Ante esta problemática, el interés de desarrollar bioetanol de segunda generación, es decir, a partir de material lignocelulósico, como lo son los residuos agrícolas, ha ganado interés en los últimos años ya que constituyen una fuente renovable abundante, alto contenido de azúcares aprovechables, bajo costo, no compite con cultivos alimenticios y además, la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica representa una reducción

significante de la emisión de gases de efecto invernadero (Busic *et al.*, 2018; Abo *et al.*, 2019)

Baja California es uno de los principales estados productores de vino (Consejo Mexicano Vitivinícola, 2018), proceso en el cual se generan subproductos de alto valor, principalmente el orujo, que consiste en piel, restos de pulpa, semillas y tallos de la uva, el cual, al no ser tratado o depositado de una manera correcta, representan un riesgo potencial de plagas y contaminación (Venkitasamy *et al.*, 2019). El orujo al ser un material lignocelulósico, es rico en hemicelulosas, las cuales, si se someten a un tratamiento de hidrólisis pueden ser aprovechables para la producción de etanol al obtenerse una variedad de monómeros de xilosa y glucosa (Beres *et al.*, 2017).

Actualmente no existe mucha información acerca del aprovechamiento del orujo de uva para la producción de etanol, por lo que es necesaria el establecimiento y evaluación de pretratamientos de hidrólisis en los residuos vinícolas de Baja California, realizar una caracterización de los mismos y así diseñar un medio de cultivo a base de hidrolizados de orujo de uva que nos permitan evaluar la producción de etanol.

VII. ANTECEDENTES

2.1 Biocombustibles

2.1.1 Generalidades

Se define a los biocombustibles como cualquier sólido, líquido o gas producido a través de materiales orgánicos, los cuales se pueden obtener de varias fuentes, ya sea directamente de las plantas o de residuos industriales, comerciales, domésticos o agrícolas. Su función como combustible se genera al liberar la energía contenida en su composición química mediante una reacción de combustión (Carta González *et al.*, 2012).

Los biocombustibles se han clasificado de varias maneras, pero la clasificación más difundida y aceptada de acuerdo a Serrano *et al.*, (2011) se clasifican de acuerdo a la materia prima y a la tecnología que se emplea para producirlos.

Los biocombustibles más comunes son el biodiesel, biohidrógeno, bioetanol, biógas y biobutanol.

2.1.2 Clasificación

Los biocombustibles se pueden clasificar de acuerdo a la fuente de carbono por la cual se produce dicho combustible (Pérez, 2014; Serrano *et al.*, 2011; Sikarwar *et al.*, 2017), generalmente, se clasifican en cuatro generaciones como se muestra en la Figura 1:

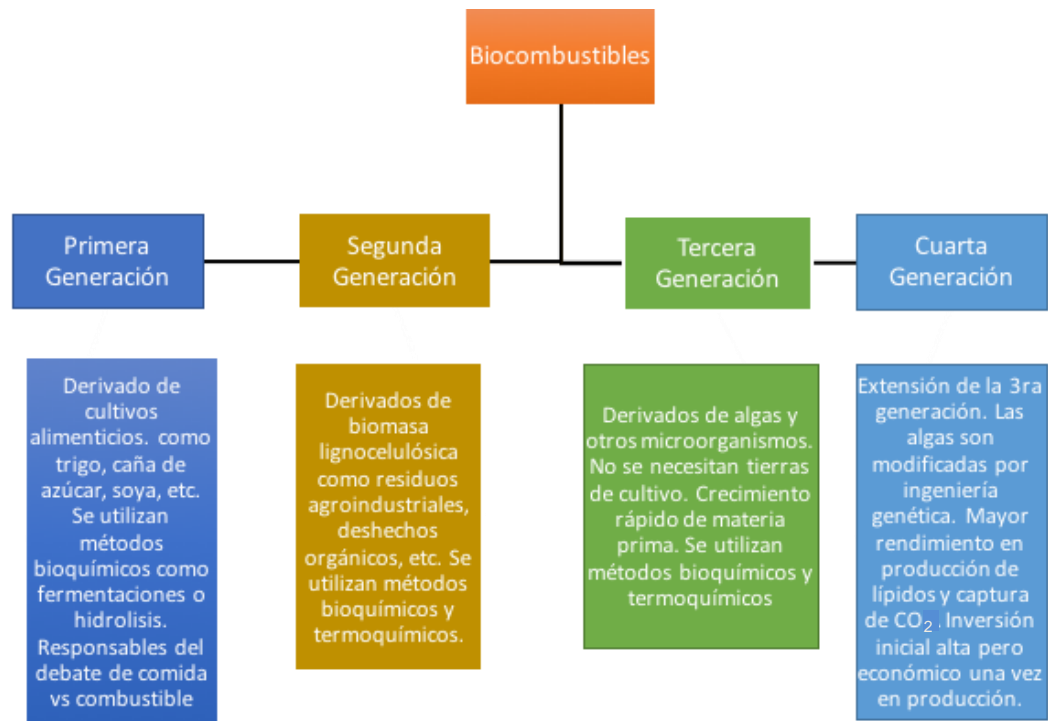


Figura 1. Clasificación de los biocombustibles

2.1.3 Importancia

Los combustibles fósiles tales como el gas natural, carbón y claramente el petróleo actualmente representan la fuente principal de energía en los distintos sectores que conforman la sociedad como el residencial, comercial, industrial, transporte y electricidad (Serrano *et al.*, 2011).

Ante las distintas y conocidas advertencias de las consecuencias del cambio climático y del agotamiento de los recursos naturales utilizados en la industria energética, del 2000 al 2020 el consumo energético y producción de energía por combustibles fósiles sigue liderando ante fuentes de energía renovables (donde se encuentra la producción de energía por biomasa) de acuerdo a la información obtenida de la *Energy Information Administration* de Estados Unidos (2021) en el 2020, aproximadamente el 79% de la producción total de energía fue por combustibles fósiles y solo el 12% fue a partir de fuentes

renovables y el consumo de energía por fuente de generación fue similar, 78% de combustibles fósiles y 12% de fuentes renovables. (Figura 2 y 3).

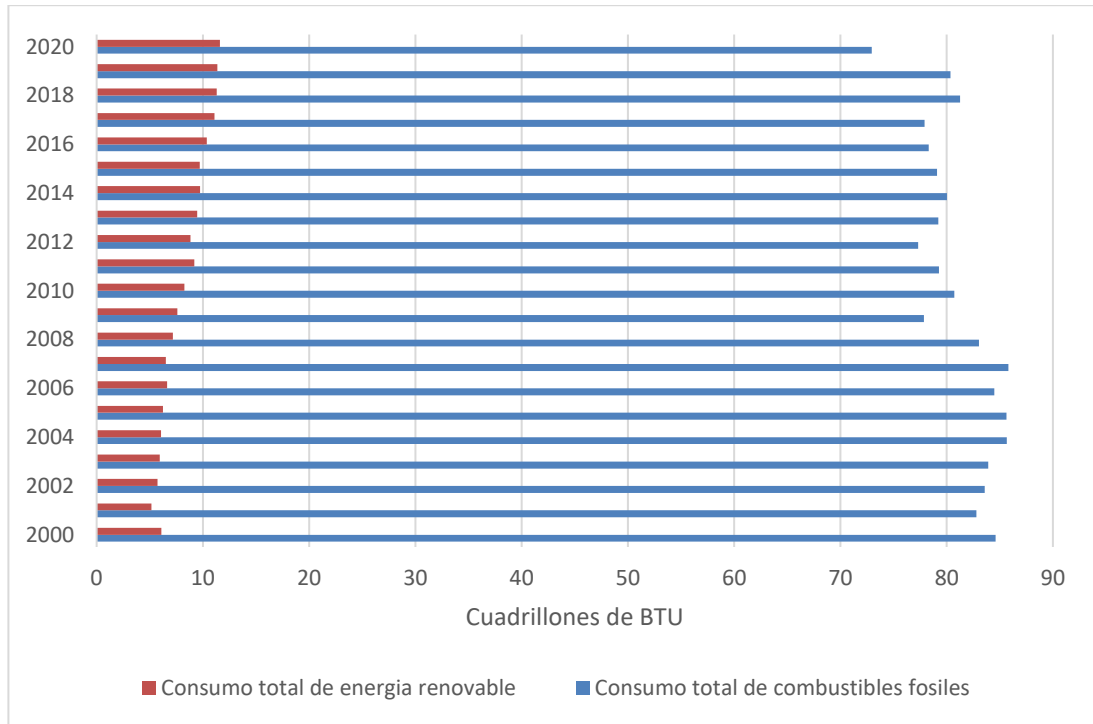


Figura 2. Consumo de energía por fuente de generación del 2000 al 2020.

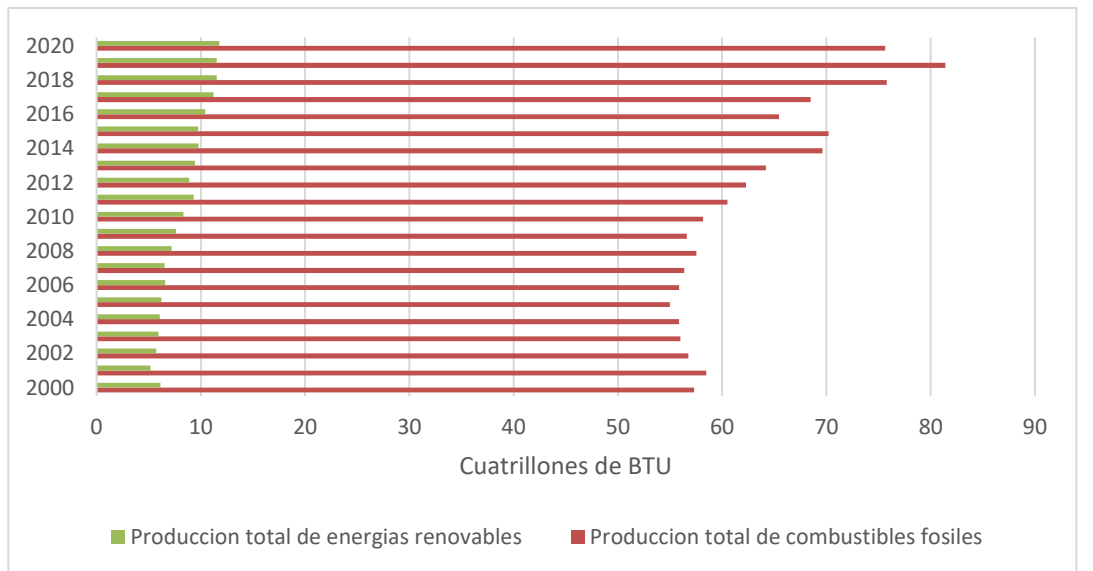


Figura 3. Producción de energía por fuente de generación del 2000 al 2020.

La dependencia a los combustibles fósiles conlleva a una serie de problemas económicos, políticos y medioambientales. Ante la situación desfavorable actual del medio ambiente y el alto crecimiento de la población humana, la disponibilidad de estos recursos naturales no es segura, pues la actual velocidad de su consumo es mucho mayor a la velocidad con la que se regeneran naturalmente, agotando las reservas de los mismos. Pero a su vez, el crecimiento de la población y la industrialización de países aumenta la necesidad de generación de energía y la dependencia a los recursos naturales (Serrano *et al.*, 2011). Ante este contexto, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de combustible para asegurar el abastecimiento energético. La producción y uso de biocombustibles ha adquirido mucha atención en el panorama internacional, al constituirse como una solución y alternativa viable ante los combustibles fósiles y los problemas que conlleva su uso, ya que la producción y uso de biocombustibles menores consecuencias sociales y ambientales y una fuente de energía renovable (Busic *et al.*, 2018).

2.2 Bioetanol

2.2.1 Generalidades

El etanol es un líquido incoloro, inflamable y volátil que es producido a través de la fermentación de la biomasa. También es conocido como alcohol etílico. Pertenece a un grupo de compuestos químicos el cual se caracteriza por tener un grupo hidroxilo unido a un átomo de carbono (Figura 4) (Bajpai, 2013).

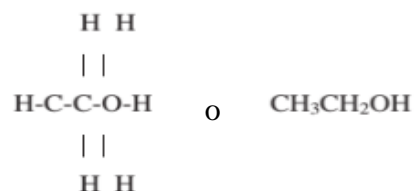


Figura 4. Estructura química del etanol

Entre sus características fisicoquímicas, el etanol hierve a 78.5°C, tiene una densidad de 0.789 g/ ml a 20°C. Su punto de congelación está por debajo de los -40°C, su peso molecular es de 46.07 (Cuadro 1). Es fácilmente miscible con el agua y con la mayoría de los solventes orgánicos. Su punto de inflamabilidad es de una temperatura baja (12.8°C) (Bajpai, 2013).

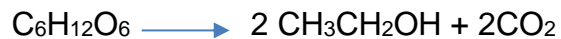
Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas del etanol.

Formula Molecular	C ₂ H ₅ OH
Masa molecular	46.07 g/mol
Apariencia	Líquido incoloro (entre -117 y 78°C)
Solubilidad en Agua	Miscible
Densidad	0.789 kg/l
Temperatura de ebullición	78.5°C
Punto de congelamiento	-117°C
Punto de inflamabilidad	12.8°C
Temperatura de Ignición	425°C
Límites de Explosión	Más bajo de 3.5% v/v; más alto que 19% v/v
Presión de Vapor	@38°C 50 mmHg
Mayor valor de calentamiento (a 20°C)	29,800 kJ/kg
Menos valor de calentamiento (a 20°C)	21,090 kJ/L
Calor Especifico, Kcal/Kg	60°C
Acidez (pKa)	15.9
Viscosidad	1.200 mPa s (20°C)
Índice de refracción	1.36 (25°C)
Octanaje	99
Carbón (porcentaje de peso)	52.1%
Hidrogeno (porcentaje de peso)	13.1%
Oxígeno (porcentaje de peso)	34.7%
Radio C/H	4
Fuente: Walker (2010)	

El bioetanol se ha vuelto una alternativa considerable ante los combustibles tradicionales, como la gasolina, debido a sus características similares a los combustibles aplicados en la industria automotriz, como un punto de inflamabilidad baja, octanaje y contenido de oxígeno alto (Martins *et al.*,2016).

Cabe destacar que el etanol tiene un alto índice de octanaje (99), a comparación de la gasolina normal que tiene un octanaje de 88, la diferencia es que el consumo de la gasolina es menor (Bajpai, 2013).

El etanol es producido mediante la fermentación de azúcares, la cual consiste en el uso de simples azúcares como materia prima y la zimasa, una enzima de la levadura que convierte de azúcares simples a etanol y dióxido de carbono. Las bebidas con etanol y más de la mitad del etanol producido en la industria, se lleva a cabo por fermentación. La reacción se representa por la siguiente reacción (Bajpai, 2013):



2.2.2 Tipos de Etanol

De acuerdo a Bajpai (2013), menciona que existen dos maneras de obtener etanol:

- Hidratado: El etanol hidratado usualmente se produce en la destilación de un proceso fermentativo de biomasa y contiene agua residual. Se suele utilizar como sustituto de gasolina en motores de combustibles flexibles generalmente en lugares con clima cálido.
- Anhidro: Se requiere un proceso de deshidratación para obtenerlo pues se debe obtener etanol al 100%, el cual puede ser usado como combustible o se mezclarse con petróleo, en distintas proporciones etanol/petróleo para utilizarse como combustible.

2.2.3 Aplicaciones del Etanol

En la actualidad, el bioetanol es utilizado principalmente como aditivo en combustibles mezclándolo con gasolina a distintas diluciones, pero entre sus otras aplicaciones se encuentran (Instituto Mexicano del Petróleo, 2017):

- Combustible de transporte para sustituir o mezclar con gasolina.
- Combustible para generar electricidad.
- Combustible para celdas por medio de reacción electroquímica.
- Materia prima en la industria química.

2.2.4 Desarrollo histórico del bioetanol

El usar bioetanol como combustible no es una idea nueva, pues desde los comienzos del siglo XIX había sido considerada su utilización como un biocombustible (Antoni *et al.*, 2007). En la década de 1860, un ingeniero mecánico alemán llamado Nikolaus August Otto, creó un motor de combustión interna, en el cual utilizaba como combustible etanol en su prototipo. En 1902, una compañía llamada Deutz Gas Engine Works, diseñaron un tercio de sus locomotoras pesadas para funcionar con etanol puro. Henry Ford, al ver el potencial de este combustible, se involucró en el movimiento de la química para la producción y suministro de energía a través de productos agrícolas. Por lo que su compañía de automóviles, comercializó el modelo T, también llamado 'Tin Lizzy', el cual funcionaba con etanol al 100% (Antoni *et al.*, 2007).

Sin embargo, dada la explotación de nuevos recursos de crudo en algunas partes de Texas y Pensilvania, ocasionó que el precio de la gasolina disminuyera radicalmente, por ende, se desplazó el uso de biocombustibles, y el uso de petróleo se potencializó por ser una fuente más barata y más eficiente (Biofuels, 2012). El bioetanol, desde 1980, ha sido foco de estudio por una amplia variedad de países y el interés de su producción vía fermentación ha ido aumentando día con día (Evcán *et al.*, 2012).

2.2.5 Panorama Actual

2.3.1.3 México

En el 2008, entró en vigor la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, la cual menciona en el artículo 1 dentro del Diario Oficial de la Federación que *“tiene por objeto la promoción y desarrollo de bioenergéticos para llevar a cabo la diversificación energética y el desarrollo sustentable a partir de las actividades agropecuarias, forestales, algas, procesos biotecnológicos y enzimáticos en el campo mexicano, Procurar la reducción de emisiones contaminantes a la atmósfera y gases de efecto de invernadero..”* entre otra información. Después de un año dicha ley se reglamentó al publicar en el Diario Oficial de la Federación el Reglamento de la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos el cual establece en particular normas detalladas en temas de programas de producción y comercialización de insumos, tema de infracciones y sanciones entre otras (FAO, 2009).

A pesar que la producción de biocombustible, principalmente etanol, no es muy elevada, durante el periodo 2013-2017 se otorgaron incentivos por alrededor de 275 millones de pesos, lo que ha generado una inversión total de 529 millones de pesos para el apoyo hacia la investigación, cultivos y plantas productoras de biocombustible para promover su producción en el país (SAGARPA, 2017).

Entre las distintas iniciativas y políticas enfocadas en el uso de los bioenergéticos en el país, la norma de calidad de petrolíferos NOM-016-CRE-2016 se permite la mezcla de etanol como oxigenante en la gasolina con un volumen máximo del 10%, lo cual abre el potencial de aprovechamiento y producción de bioetanol para este mercado (Instituto Mexicano del Petróleo, 2017).

De acuerdo al reporte de inteligencia tecnológica enfocada en el bioetanol del Instituto Mexicano del Petróleo, en México se han estado realizando distintas iniciativas para poder crear un mercado interno de biocombustibles, y en lo que confiere a etanol, secretarías nacionales han presentado iniciativas para poder utilizar el etanol anhidro como oxigenante de gasolinas, impulsar su producción a gran escala, contribuir en la transición a transportes sustentables y contribuir a la seguridad energética nacional, contribuir al cuidado del medio ambiente mediante la disminución de gases de efecto invernadero y apoyo a la comunidad científica y tecnológica para la generación de nuevos biocombustibles o mejora de los mismos.

Desde el 2017 se cuenta con una planta instalada para la producción de bioetanol. La Subsecretaría de Agricultura impulsó 834 proyectos para el establecimiento de 3304 hectáreas con cultivos destinados a la producción de bioetanol en los estados de San Luis Potosí y Veracruz, lo cual significó una inversión de 8.7 millones de pesos. Al igual, SAGARPA apoyó la creación de una planta en el estado de Veracruz para la producción de bioetanol con una capacidad de 38 millones de litros al año (SAGARPA, 2017).

En México, la producción de biodiesel es superior a la producción de etanol, contando con plantas en los estados de Puebla, Baja California, Durango, Estado de México y Oaxaca (SAGARPA, 2017).

En el portal de la Secretaría de Energía del Gobierno de México, se puede consultar los permisos otorgados para la producción de bioenergéticos hasta el 2018 (Cuadro 2), para la comercialización de bioenergéticos (44) (que no incluye la venta al público), para transporte (7) y los avisos de exención de permisos para producción de bioenergéticos (25) (Secretaría de Energía, 2018).

Cuadro 2. Permisos de producción de Bioenergéticos hasta el 2018.

No.	Razón Social	Producto
1	Instituto de Energías Renovables del Estado de Chiapas (en ese entonces, el Instituto para la Reconversión Productiva y la Agricultura Tropical)	Biodiesel
2	Blue Fuel S.A.P.I. de C.V.	Etanol anhidro
3	Biocombustibles Juanita, S.A.P.I. de C.V.	Etanol anhidro
4	Biocombustibles Tomatlán, S.A.P.I. de C.V.	Etanol anhidro
5	Fabricación de Alimentos Tenerife, S.A. de C.V.	Etanol anhidro
6	Alcoholera de Zapopan, S.A. de C.V.	Etanol anhidro
7	Soluciones en Ingeniería Naval Marina y Terrestre, S.A. de C.V.	Etanol anhidro
8	Bioenergéticos Mexicanos, S.A.P.I.	Etanol anhidro

Fuente: Secretaría de Energía, 2018

La Asociación Mexicana para la Movilidad Sustentable (AMMS) tiene planeado impulsar la creación de 10 plantas de etanol en el periodo de 2018-2023 en los estados que se clasificaron como potenciales para la producción, como Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Colima, Nayarit, Michoacán y varios estados del sureste (Jornada, 2017).

A nivel nacional, las tecnologías y materias primas disponibles para la producción de bioetanol a gran escala en estos distintos proyectos se limitan a la primera generación, aquellos que se producen de cultivos como caña de azúcar y de sorgo los cuales no intervienen de manera directa con la cadena producción de alimentos (Instituto Mexicano del Petróleo, 2017). Para el 2020, la Secretaría de Energía se propuso como meta una producción de etanol anhidro de 498 millones de litros anuales con el fin de mezclarse con gasolina

Magna en las terminales de almacenamiento y reparto (Instituto Mexicano del Petróleo, 2017).

2.3.1.4 Panorama Internacional

La introducción de programas para producir etanol como combustible está siendo llevado a cabo por muchos países (Bajpai, 2013). Estados Unidos y Brasil son los principales productores de etanol, aportando en el 2019 un 84% de la producción mundial (RFA, 2019). Estados Unidos actualmente tiene el mercado de etanol como combustible de crecimiento más rápido y más grande del mundo (Bajpai, 2013). En el año 2019, Estados Unidos lidero la producción mundial de etanol con una producción de 15 mil 800 millones de galones. En segundo lugar, Brasil, quien hace unas décadas era el productor más grande del mundo de etanol (Bajpai, 2013) tuvo una producción de 8 mil 620 millones de galones y la Unión Europea con 1440 millones de galones (**Figura 5**) (RFA,2019).

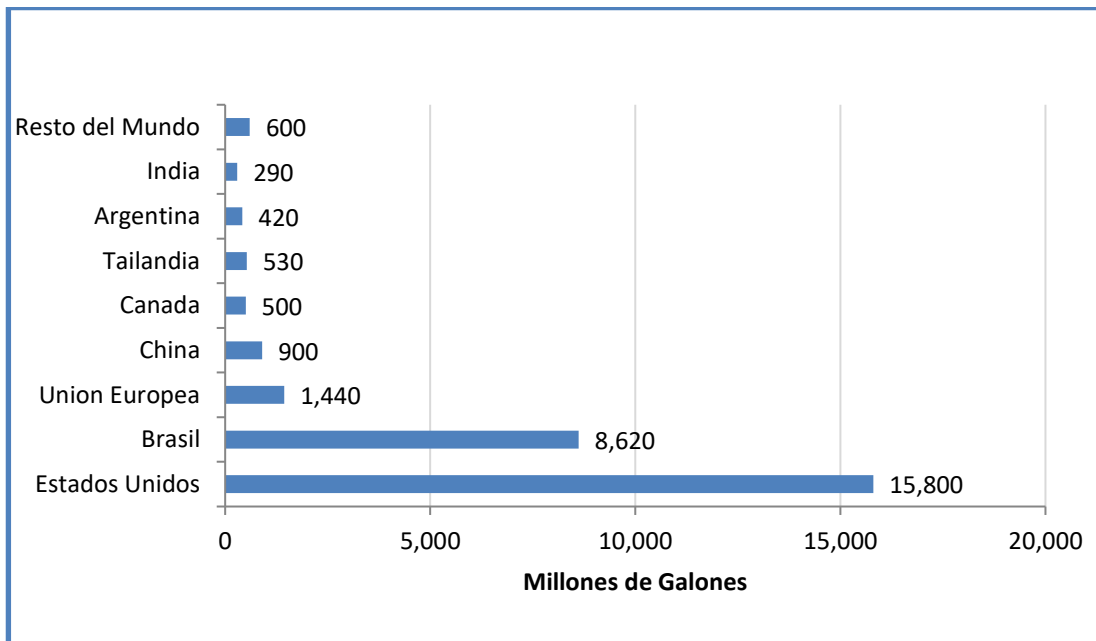


Figura 5. Producción mundial de etanol en el 2019.

La mayoría de los países anteriormente mencionados generan etanol de primera generación, utilizan materias primas que su fuente de carbono es azúcar, lípidos o almidón. Por ejemplo, Estados Unidos utiliza principalmente maíz, pero se encuentra en desarrollo la utilización de materiales celulósicos (Bajpai, 2013). Por otro lado, la Unión Europea utiliza maíz, trigo, remolacha azucarera y otros cereales (Energías Renovables, 2018). En Australia se utiliza melaza de grano y caña de azúcar (Bajpai, 2013). China empleaba mucho el maíz, pero en el 2007 prohibió el uso de granos para no afectar el suministro de alimentos, por lo cual los fabricantes desde entonces han empleado sorgo, patatas y paja (Mason *et al.*, 2017).

2.3 Producción Bioetanol

2.3.1 Materias Primas empleadas

El bioetanol puede ser producido a partir de diferentes fuentes de carbono, los cuales pueden ser divididas en tres grupos: biomasa azucarada, amilácea y lignocelulósica (Cuadro 3) (Walker, 2010).

Cuadro 3. Ejemplos de biomasa utilizada en la producción de bioetanol.

Biomasa Azucarada	Biomasa Amilácea	Biomasa lignocelulósica.
Caña de azúcar	Granos de maíz	Madera
Remolacha	Granos de trigo	Residuos
Sorgo	Papa	Agroindustriales
Lactosuero	Mandioca	Residuos municipales
Frutas		Residuos de papel
		Pulpa de Papel

2.3.1.1 Biomasa Azucarada

La materia es rica en sacarosa y se deriva de la caña de azúcar (*Saccharum sp.*), la remolacha azucarera (*Beta vulgaris L.*) y el sorgo dulce, donde los azúcares predominantes son la sacarosa, fructosa y galactosa. (Walker, 2010). En este tipo de biomasa, por el alto contenido de azúcares simples, hace que la producción de etanol sea mas eficiente y simple. Al etanol producido por esta biomasa se le denomina de 1ra generación (Ayodele *et al.*,2019).

2.3.1.2 Biomasa amilácea

Es biomasa rica en almidón, la cual está compuesta por dos polímeros de glucosa, la amilopectina y la amilosa (Putri *et al.*, 2018). Se encuentra en cultivos como el maíz, trigo, yuca, centeno, entre otros (Siegmeier *et al.*, 2019). Para obtener azúcares fermentables del almidón, debe ser hidrolizado por pretratamientos ácidos o enzimáticos. El etanol de primera generación es el mayormente producido y se obtiene por azucares de cultivos alimenticios, sin embargo, se está buscando generar etanol a partir de biomasa que no compita con los cultivos alimenticios. (Marques *et al.*, 2017).

2.3.1.5 Biomasa Lignocelulósica

El etanol producido por este tipo de biomasa se le conoce como etanol de segunda generación. Esta biomasa se caracteriza por ser más resistente a la trituración que el almidón y el azúcar, lo cual, a pesar de que la materia prima se encuentra en precios bajos, el costo de procesamiento puede llegar a ser más elevado que la producción de etanol de primera generación. Es biomasa que no se obtiene a partir de fuentes alimenticias (Ojeda *et al.*, 2011; Nigam y Singh 2011). Dentro de esta categoría se encuentran materiales de desecho como paja, residuos de maíz, desechos leñosos, bagazos de distintos cultivos, residuos agrícolas como pulpa de semillas y frutos, entre otros (Walker, 2010). Es de las materias primas más abundantes y de bajo costo para la producción de bioetanol de segunda generación (Andersen *et al.*, 2013).

2.3.2 Composición de la biomasa lignocelulósica.

Los componentes principales que forman las paredes celulares de esta biomasa son la celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 6) (Gurdo, 2016).

La función de la formación de estas paredes celulares tan completa es que aparte de crear y sostener la estructura de las plantas para captar la radiación solar, la cual mayormente está dada por la hemicelulosa, también les confiere una resistencia mecánica y protección contra patógenos debido a la lignina (Rubin, 2008).

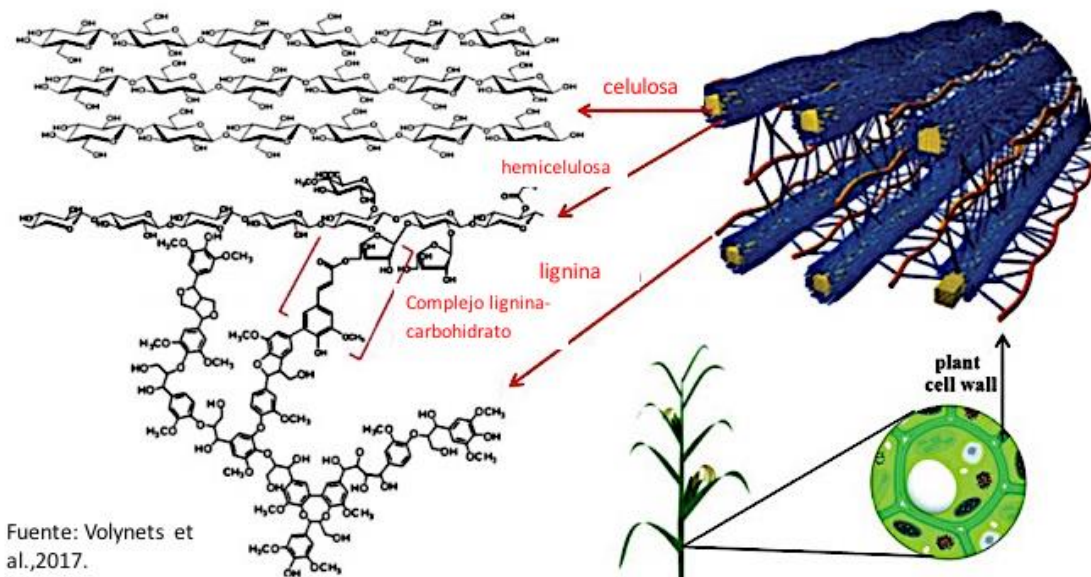


Figura 6. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica

2.3.2.1 Celulosa

Es el mayor constituyente de las plantas, es una macromolécula completa de cadenas lineales de β-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β-1,4, que se unen fuertemente en microfibrillas unidas mediante interacciones intra e intermoleculares de enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Las cadenas lineales se encuentran cerca una de otras creando en la mayoría de los casos áreas cristalinas, pero en las áreas donde las cadenas no se

encuentran de forma paralela entre sí, se conocen como estructuras amorfas (Figura 7). Este polímero se encuentra acoplado a hemicelulosa y polímeros amorfos como pectina y lignina (Gurdo, 2016; Jaworska *et al.*, 2013; Moon *et al.*, 2011).

La celulosa es el polímero más abundante en la actualidad y es considerada una fuente renovable casi inagotable de materia prima para la creación de productos de alto valor agregado, como biocombustibles, que a comparación de los combustibles fósiles, son menores las consecuencias ambientales y (Busic *et al.*, 2018; Brinchi *et al.*, 2013).

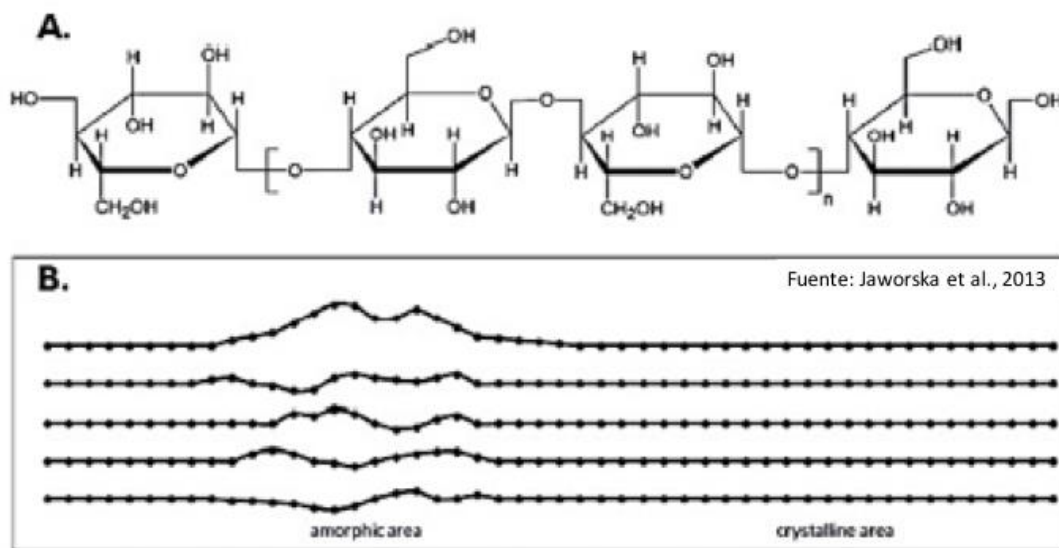


Figura 7. Estructura de la celulosa: A. Cadena simple. B. Microfibrillas.

2.3.2.2 Hemicelulosa

Constituida por polímeros de diferentes azúcares con cadenas cortas y más ramificadas, lo que la hace más amorfa y fácil de hidrolizar (Prinsen, 2010). Su función principal es crear la unión entre la celulosa y la lignina, otorgando rigidez a la pared celular (Rubin, 2008). Este polímero está constituido por pentosas como D-xilosa y L-arabinosa, y de hexosas como D-glucosa, D-

manosa y D- galactosa y contiene pequeñas cantidades de ácidos orgánicos. Además, presentan enlaces β -1,4 y en ocasiones enlaces β -1,3 (Figura 8) (Zhou et al., 2016).

Cabe destacar que la estructura de la hemicelulosa es diferente entre las distintas especies de plantas y residuos agroindustriales analizados (Morales, 2014).

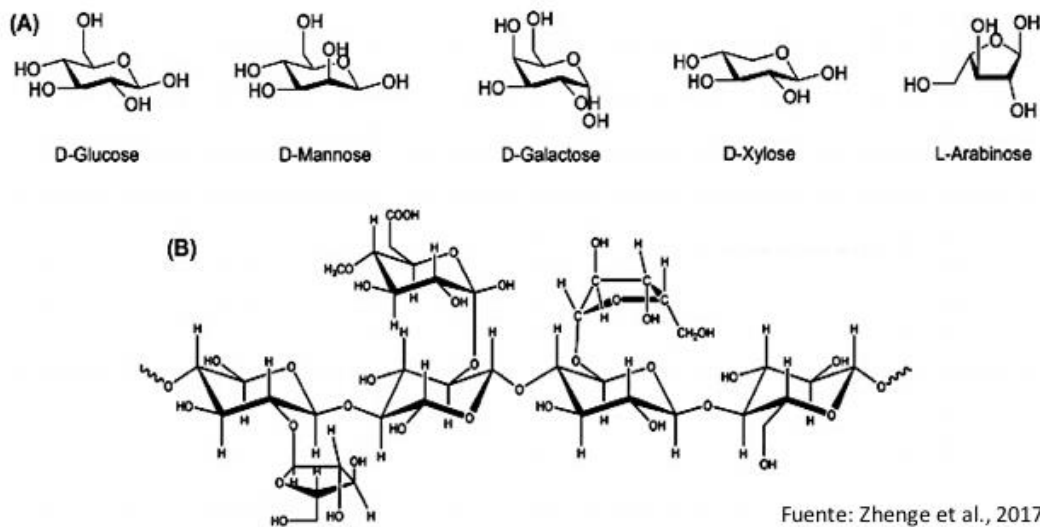


Figura 8. A. Hexosas y pentosas comúnmente encontradas en la hemicelulosa. B. Ejemplo de la estructura de la hemicelulosa (Zhenge *et al.*, 2017).

2.3.2.3 Lignina

Es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado, procedente de la polimerización deshidrogenativa de tres alcoholes (*p*-cumárico, coniferílico y sinapílico) (Figura 9) (Morales, 2014). Las tres unidades básicas de este polímero son: la unidad H (*p*-hidroxifenil) que deriva del alcohol *p*-cumárico, la unidad G (guaiacil) que deriva del alcohol coniferílico y la unidad S (siringil) que deriva del alcohol sinapílico (Morales de la Rosa, 2015).

La lignina da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y otorga una protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) al tener un alto grado de resistencia a la degradación química y biológica (Arellano, 2015). La lignina representa una barrera física hacia la planta, pues no permite la absorción de enzimas y es tóxica para microorganismos. En caso de que se removiera, la hidrólisis enzimática incrementaría (Zheng *et al.*, 2017).

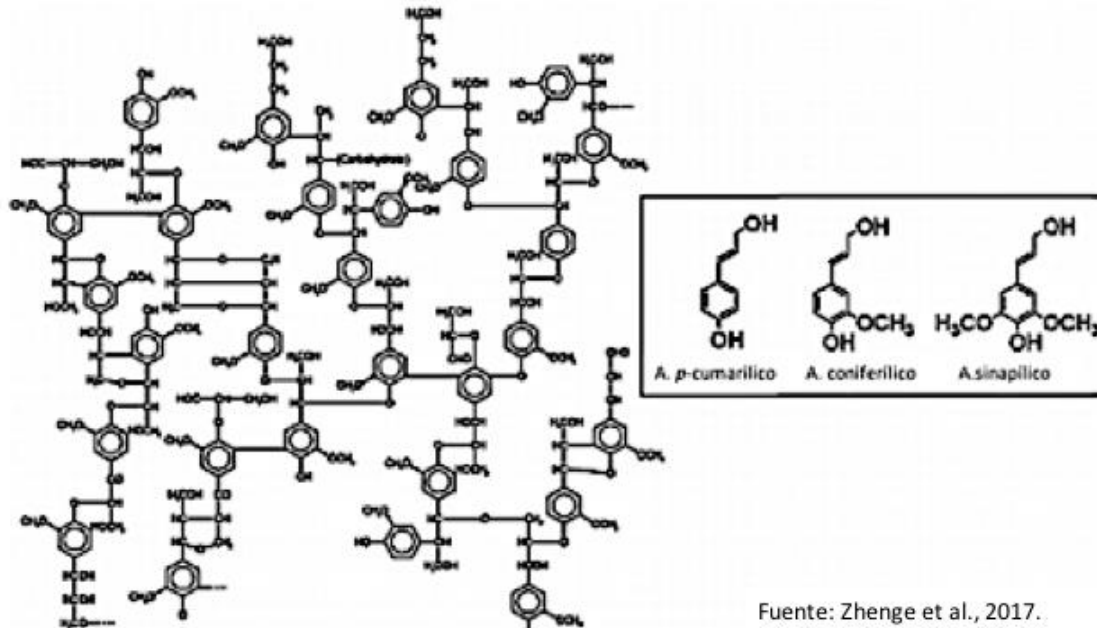


Figura 9. Estructura de la lignina

2.3.3 Procesamiento de la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol

La producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica consiste en 4 principales operaciones unitarias (Singh *et al.*, 2018):

1. Pretratamiento
2. Hidrólisis
3. Fermentación
4. Destilación

2.3.3.1 Pretratamiento

El pretratamiento es una etapa fundamental para la obtención de bioetanol por la complejidad de la estructura lignocelulósica al modificar sus propiedades fisicoquímicas como el grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa (Cuervo *et al.*, 2009). Los objetivos principales de este proceso es aumentar la porosidad, disminuir la cristalinidad de la celulosa e intentar eliminar la lignina y la hemicelulosa (Figura 10). Para lograr la hidrólisis parcial de los componentes de la biomasa lignocelulósica, es necesario llevar a cabo el pretratamiento si no se obtienen rendimientos bajos del producto (Morales, 2015).

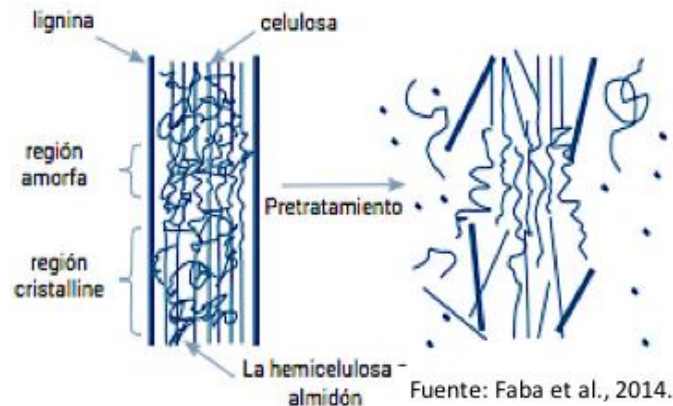


Figura 10. Biomasa lignocelulósica tras pretratamiento.

De acuerdo con Morales (2015), los requisitos que debe cumplir el pretratamiento son:

1. Aumentar la disponibilidad de azúcares como pentosas y hexosas.
2. Evitar la degradación de hidratos de carbono.
3. Evitar la formación de subproductos inhibidores que afecten a la hidrólisis y la fermentación.
4. Ser económico y respetuoso con el medio ambiente.

Los pretratamientos de acuerdo con Singh *et al.*, (2018) pueden ser clasificados según su modo de acción en físicos, químicos, biológicos y fisicoquímicos (Figura 11).

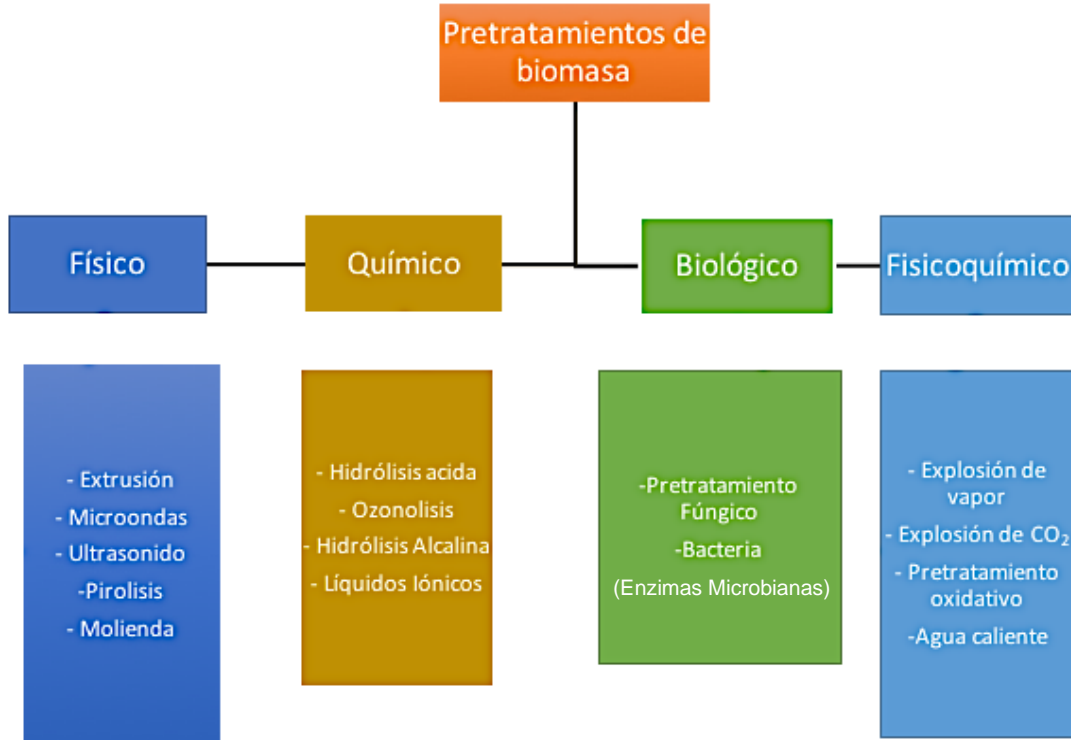


Figura 11. Pretratamientos de biomasa lignocelulósica y ejemplos.

- Pretratamientos Físicos

Se encuentra principalmente lo que es la molienda, la cual disminuye la cristalinidad de la celulosa al utilizar fuerzas de impacto y de cizalla (Sanchez y Cardona, 2008). La reducción de tamaño de las partículas lleva a una reducción del grado de polimerización y un aumento de superficie específica (Serrano *et al.*, 2011).

- Pretratamientos químicos

En este tipo de pretratamiento se utilizan varios agentes como ácidos, ozono, álcalis, peróxidos y solventes orgánicos, pero el que se ha comprobado que

tiene una mejora significativa en las hidrólisis según estudios es el pretratamiento con ácido (Lopez *et al.*, 2018).

- Pretratamientos biológicos

Es un proceso económicamente factible y amigable para el medio ambiente por su baja aportación química y energética y la gran efectividad del mismo. En el pretratamiento biológico, los principales agentes que accionaran con el material lignocelulósico son las enzimas de cepas microbianas, como hongos de pudrición blanca, parda o blanda ya que tras la excreción de enzimas degradan la lignina, pero su desventaja es que algunos llegan a atacar tanto la celulosa como la lignina (Singh *et al.*, 2018).

2.3.3.2 Hidrólisis

Una vez que la materia lignocelulósica fue pretratada, el siguiente paso es la hidrólisis, la cual tiene como objetivo liberar los azúcares monoméricos potencialmente fermentables principalmente de la celulosa (Pejo, 2009).

El llevar a cabo una hidrólisis efectiva y económica, es una de las barreras más importantes que tiene el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica (Banerjee, 2010) ,ya que, los enlaces de las moléculas de azúcares presentes en la celulosa (B-glicosídicos), son muy fuertes y la estructura en la cual se encuentra la celulosa en las materias primas hace que se vuelva muy difícil su hidrólisis (Morales, 2015). La hidrólisis puede llevarse a cabo con una hidrólisis ácida (catalizadores ácidos), o con una hidrólisis enzimática empleando catalizadores enzimáticos (Pejo, 2009).

- Hidrólisis ácida:

La biomasa lignocelulósica es mezclada con ácidos diluidos o concentrados, los más empleados son el ácido sulfúrico y el ácido clorhídrico en condiciones de temperatura, presión y tiempo específico (Balat, 2008). Es un método

relativamente simple, no costoso y fácil de controlar porque la reacción es interrumpida con la neutralización del medio (Warrand *et al.*, 2007). Entre las desventajas que presenta utilizar este método es que los ácidos son tóxicos, corrosivos y por lo tanto peligrosos. Al ser corrosivos se necesitan de reactores que sean resistentes a la corrosión dando como resultado un mayor costo del proceso (Binod *et al.*, 2011). El ácido utilizado debe ser recuperado para que el proceso sea económicamente viable (Evcán *et al.*, 2012).

- Hidrólisis enzimática:

Se utilizan enzimas o complejos enzimáticos de distintos microorganismos para degradar la biomasa lignocelulósica. Las enzimas utilizadas para la digestión de material vegetal se clasifican en tres categorías, las cuales son: celulasas, hemicelulasas y enzimas accesorias (Gurdo, 2016).

Las celulasas generalmente empleadas son producidas a partir de bacterias como *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Streptomyces* y *Bacillus* y hongos como *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Trichoderma*. (Sun y Cheng, 2002; Morales, 2014).

Las ventajas de la hidrólisis enzimática son que se emplean condiciones moderadas de temperatura y presión (30 a 50°C, y presión atmosférica), no utiliza agentes químicos por lo que se evita la corrosión de equipos y degradación de los azúcares obtenidos y tiene un alta especificad (Morales, 2014). Sin embargo, su aplicación industrial es muy limitada debido a los altos costos de las enzima y la necesidad de pretratamientos sofisticados y costoso (Maitan *et al.*, 2015).

2.3.3.3 Fermentación

La fermentación alcohólica es una biorreacción la cual consiste en degradar azúcares en etanol y dióxido de carbono (Dacosta y Vazquez, 2007). Es un proceso biológico anaerobio, originado por la actividad de algunos microorganismos, principalmente levaduras y bacterias. Entre los microorganismos que se utilizan en el proceso fermentativo se encuentra *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Scheffersomyces stipitis*, *Candida brassicae*, *Mucor indicus*, entre otros (Gurdo, 2016).

La levadura comúnmente utilizada para la producción de etanol es *Saccharomyces cerevisiae*, pues presenta ventajas como fácil manejo, alta velocidad de crecimiento, alto rendimiento, es un microorganismo no patógeno y además, las levaduras cuentan con un sistema de multicomponentes que secretan proteínas permitiendo una óptima maduración, plegamiento correcto y formación de enlaces disulfuro de las proteínas entre otros procesos postraduccionales (Cuervo *et al.*, 2009; Volynets *et al.*, 2017).

Los parámetros que se deben tener bajo control para no provocar una afectación en el rendimiento de la fermentación son la temperatura, el pH, tasa de crecimiento y la tolerancia frente al alcohol y a los inhibidores (Morales, 2014). Cabe destacar que *S. cerevisiae* ha sido el microorganismo fermentador ampliamente utilizado a nivel industrial en los procesos de fermentación debido a sus buenos rendimientos de transformación de hexosas a alcohol, teniendo como desventaja que no es capaz de fermentar pentosas lo cual representa una limitación en la fermentación de los hidrolizados de biomasa lignocelulósica pretratada (Karagoz *et al.*, 2012). Ante esta problemática ya existen cepas genéticamente modificadas, como *S. cerevisiae* TMB3400 que

utilizan como sustrato hexosas y pentosas, aunque la velocidad de consumo de xilosa es baja (Jeffries, 2007; Ohgren *et al.*, 2006).

En la Figura 12 se muestra la ruta metabólica de la fermentación alcohólica. Todo empieza cuando la glucosa o fructosa entra a la célula y mediante la glucólisis, donde 10 reacciones enzimáticas ocurren, las moléculas de glucosa o fructosa se oxidan para producir dos moléculas de piruvato. En este proceso también se sintetizan dos moléculas de Adenosín Trifosfato (ATP) y dos de Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida reducido (NADH). La fermentación consiste en la conversión de piruvato que luego se convierte en CO₂ y acetaldehído, y por último en etanol gracias a la catálisis de las enzimas mencionadas en la figura 12. (Zamora *et al.*, 2014).

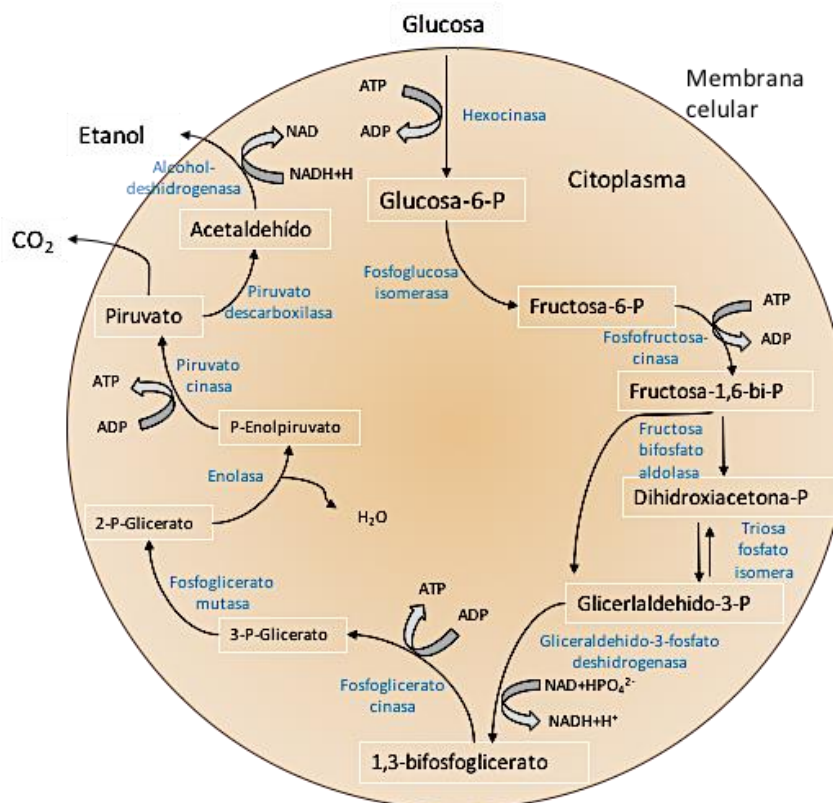


Figura 12. Ruta metabólica para la producción de etanol por *S. cerevisiae* (Zamora *et al.*, 2014).

La fermentación alcohólica se puede llevar a cabo por dos vías:

- Hidrólisis y fermentación separadas (HSF): La hidrólisis y la fermentación ocurren por separado, por lo que pueden ser optimizados. Sin embargo, el problema de este método es la inhibición causada por productos inhibidores formados durante el proceso disminuyendo su eficacia (Gurdo *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019).

- Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS): En este proceso se lleva la hidrólisis y fermentación al mismo tiempo, donde las enzimas, los microorganismos y la fuente de azúcares se mezclan permitiendo una rápida fermentación para la obtención de etanol (Pejo, 2009).

2.3.3.4 Destilación

Una vez que el etanol ha sido producido, su recuperación del medio fermentado se realiza principalmente por destilación. La destilación se refiere a la separación de una mezcla de dos o más sustancias químicas basándose en las diferencias de su volatilidad, que es la relación entre la presión parcial y la fracción molar en el líquido (Walker, 2010). En el caso de la destilación alcohólica, se refiere a la separación del etanol de la mezcla alcohol-agua basándose en sus puntos de ebullición. Hay distintos sistemas de destilación, pero todos comparten algunos principios fundamentales (Walker, 2010):

- Se introduce una solución alcohólica diluida en el sistema.
- El calor entra directamente en la base de la columna.
- El etanol, que es el que tiene el punto de ebullición más bajo, es evaporizado.
- El producto de punto de ebullición más alto se recibe a la parte inferior de la columna.
- Un intercambiador de calor refrigerado por agua condensa el vapor de etanol.
- El condensado se divide en 2 corrientes: el producto deseado y el reflujo que se devuelve a la parte superior de la columna.

2.4 Proceso de vinificación y generación de residuos.

2.4.1 Cultivo de la vid (*Vitis vinífera* L.)

2.4.1.1 Generalidades y clasificación taxonómica de *Vitis vinífera* L.

Vitis vinífera L., conocida comúnmente como la vid, se define como una liana trepadora de tallo sarmentoso y zarcillos que generalmente crece en un soporte o tutor (Figura 13). La parte aérea está conformada por el tronco, ramas y los brotes, las hojas están insertas en los nudos. La inflorescencia se conoce como racimo, y la fruta resultante es la uva (SAGARPA, 2017).

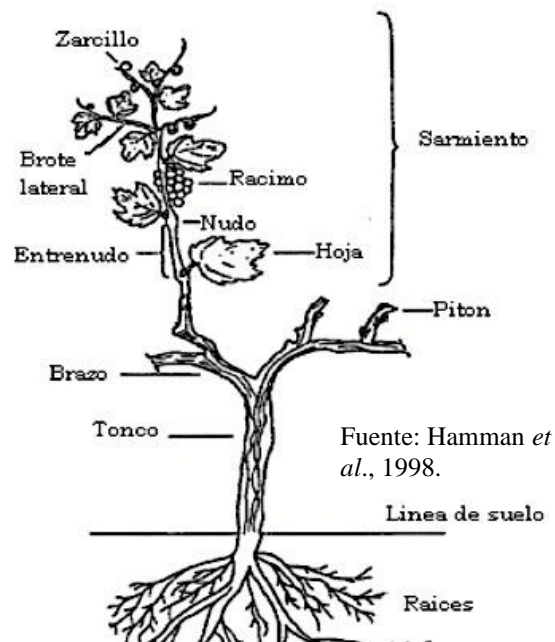


Figura 13. Anatomía de la vid.

En el Cuadro 4, se muestra la clasificación taxonómica de *Vitis vinífera* L. de acuerdo con la base de datos de plantas de la USDA (United States Department of Agriculture) del *Natural Resources Conservation Service*. De esta forma, la vid se ubica en el reino *Plantae*, en el subreino *Tracheobionta* al ser una planta vascular, super división *Spermatophyta* al ser una planta de semilla, entra en la división *Magnoliophyta* al ser una planta floreciente, Clase *Magnoliopsoda* porque es dicotiledóneas al tener dos hojas embrionarias en



la base de la plántula, subclase *Rosidae*, orden *Rhamnales* al ser una planta leñosa, familia *Vitaceae*, genero *Vitis* L. y especie *Vitis vinífera* L. conocida por su producción de uva.

Cuadro 4. Clasificación Taxonómica de *Vitis vinífera* L.

Rango	Nombre Científico
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Rhamnales</i>
Familia	<i>Vitaceae</i>
Genero	<i>Vitis</i> L.
Especie	<i>Vitis vinífera</i> L.

Existen más de 30 especies productoras de uva, pero *Vitis vinífera* L. es conocida como la especie con mayores cualidades y rendimiento de uva para la producción de vino, uvas de mesa y uva pasa. Actualmente, comprende millares de variedades que son resultado de cruzamientos naturales, las cuales portan características que las hacen aptas para distintos sectores (Cuadro 5). Por ejemplo, variedades que presenten fruta carnosa, racimos largos y sueltos, bayas redondas u ovaladas y uvas jugosas y dulces son utilizadas para la producción de uva de mesa. Mientras que variedades productoras de fruto pequeño, más ácido, piel gruesa y racimo compacto son utilizadas como uva para producción de vino o industrial (Buendía *et al.*, 2012; Consejo Mexicano vitivinícola, 2018).

Cuadro 5. Ejemplos de variedades productoras de uva, su uso y sus características.

Uso	Variiedad	Características	Ejemplo
Uva de mesa y uva pasa	<i>Flame Seedless</i>	Fruta carnosa. Racimos largos y sueltos. Bayas redondas u ovaladas Jugosa y dulce	 Flame Seedless
	<i>Superior Seedless</i>		
	<i>Red Globe</i>		
	<i>Perlette</i>		
	<i>Sumer Royal</i>		
	<i>Early Divine</i>		
	Otras		
Uva Industrial	<i>Cabernet Suavignon</i>	Fruto pequeño. Acido. Piel gruesa. Racimo compacto.	 <i>Cabernet Suavignon</i>
	<i>Carignan</i>		
	<i>Salvador</i>		
	<i>Merlot</i>		
	<i>Chardonay</i>		
	<i>CheninBlanc</i>		
	Otras		

2.4.1.2 Cultivo

La vid tradicionalmente es cultivada entre los paralelos 30 y 50° del hemisferio Norte y 30 y 45° del hemisferio sur; principalmente, por las características climatológicas a esta zona se le conoce como la franja del vino (Figura 14).

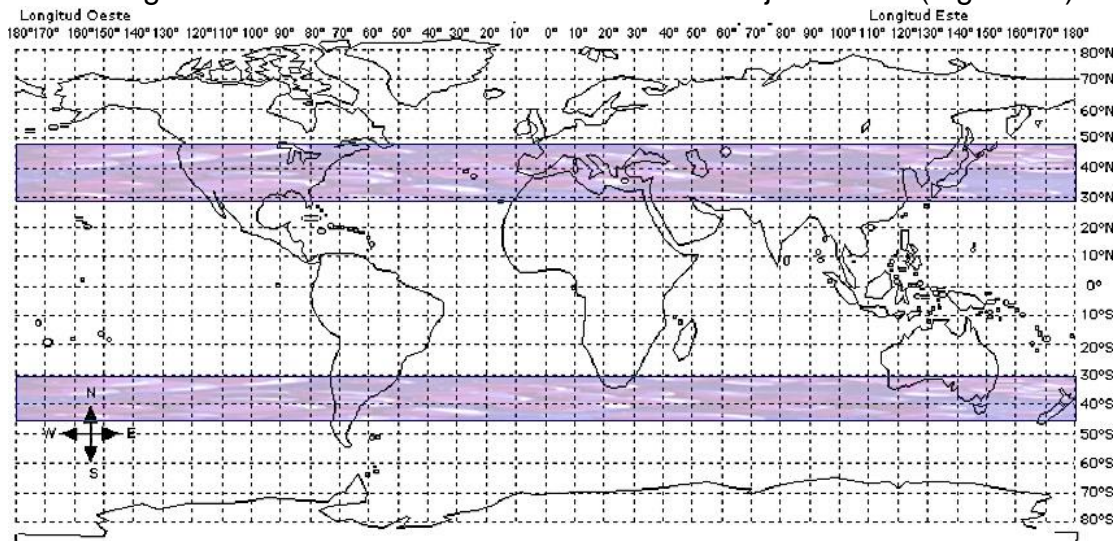


Figura 14. Franja del vino

Cabe destacar que los factores climáticos, como humedad, temperatura y viento permiten condiciones favorables para el cultivo de la vid (Almanza *et al.*, 2012).

El cultivo de la vid, también se lleva a cabo en distintas regiones, por lo que la viticultura se ha clasificado por una subdivisión del hemisferio norte y del hemisferio sur en cuatro bandas climáticas: templado (Latitud 30° a 50°), frío (superior a 45°), tropical (10° a 10°) y sub-tropical (entre 10° y 30°) (Fregoni, 2007; Almanza *et al.*, 2012). La viticultura tropical, que se encuentra entre los paralelos 10° Norte y 10° Sur, se ha impulsado al tener un clima que genera un desarrollo fenológico más rápido de frutos, y, por lo tanto, vinos de mayor calidad al presentarse mayor radiación solar (Almanza *et al.*, 2012).

El cultivo de la vid requiere las siguientes necesidades climáticas:

- Temperatura: La vid es una planta que requiere temperaturas medias superiores a 9°C (punto óptimo entre 11 °C y 18 °C). La temperatura es muy importante ya que tiene gran influencia en la capacidad de maduración de las uvas (Hidalgo *et al.*, 2011).
- Horas luz: Este cultivo requiere una iluminación mínima de 1500 a 1600 horas anuales, lo que se puede considerar como elevada, de las cuales 1200 horas le van a corresponder al periodo de vegetación. Si el cultivo recibe menos horas que las necesitadas, suele reducir las producciones y la calidad de la uva. Sin embargo, un exceso de la misma también puede ser perjudicial al provocar foto inhibición (Armas, 2014).
- Necesidades hídricas: El cultivo requiere un mínimo de 400 mm de lluvia anual para su buen desarrollo. Las necesidades máximas surgen en el periodo de crecimiento entre la floración y envero, que es cuando se desarrolla el fruto (Armas, 2014).

- Suelo: Las condiciones edáficas óptimas para este cultivo son los suelos franco-arenosos con suficiente materia orgánica, bien drenados y con pH de 5.5 a 7.0 (SAGARPA, 2017).

Para la propagación de la vid, la multiplicación vegetativa es más utilizado que la propagación sexual, pues esta última se utiliza mayormente para la generación de nuevas variedades al cambiar las características genotípicas de los progenitores. Sin embargo, la multiplicación vegetativa comercialmente es la más apta, ya que, se busca mantener las mismas características genotípicas de la variedad que se esté cultivando (Aguirre *et al.*, 2001). Entre la multiplicación vegetativa, la propagación por estacas es el método más utilizado, pero también está la propagación por injertos (púa o de yemas), acodos, y micropropagación (Becerra *et al.*, 2017).

Sobre su plantación, la época ideal es finalizando el invierno e inicio de primavera. En cuanto a la distancia de las plantas, depende del tipo de suelo, tipo de labor cultural y del sistema de plantación, las plantas de *Vitis Vinifera* L. generalmente se plantan a una distancia de 2.4 a 3 metros (Aguirre *et al.*, 2001; SAGARPA, 2017).

La vid es una planta perene cuyo desarrollo, en regiones de clima templado presenta un ciclo biológico anual bien definido (Cuadro 6), el cual comprende distintas fases de crecimiento que suceden de manera constante siguiendo el mismo orden. Este ciclo va desde la primavera, donde hay gran actividad de desarrollo, la cual en verano decrece, concluyendo el ciclo con un periodo de receso entre otoño e invierno (Almanza *et al.*, 2012).

Cuadro 6. Fases del ciclo biológico de la vid.

Fases	Características
Reposo (Otoño y todo el invierno).	Reposo de yemas axilares, se produce cuando empieza a bajar la temperatura (generalmente en otoño), se induce el reposo metabólico de los tejidos.
Lloro (Finales de invierno)	La planta manifiesta el reinicio de la actividad metabólica, el cual consiste en la excreción de un líquido incoloro en cortes de poda.
Desborre (Finales de invierno y principios de primavera)	Es el primer indicio de crecimiento vegetativo observándose un hinchamiento de las yemas y separación de las escamas que las recubrían.
Brotación (inicios de primavera)	Aparición de las distintas partes de las ramas y de los órganos que portan (entrenudo, zarcillos, inflorescencia).
Floración Y cuajado (Avanzada la primavera)	Se desarrollan flores hermafroditas, las cuales generalmente son polinizadas por insectos. Después, ocurre el cuajado, que es la transformación de la flor en fruta.
Envero (Mediados de verano)	El grano tamaño guisante crece y cambia de color de acuerdo al tipo de uva, dura 15 días y coincide con el inicio del agostamiento (tallos herbáceos pasan a leñosos)
Maduración (Mediados de verano a inicios de otoño)	La uva empieza a disminuir su acidez bajando el contenido de ácidos orgánicos y aumentar el contenido de azúcares.
Caída de las hojas (Finales de otoño e inicios de invierno).	Envejecimiento de las hojas, degradación de la clorofila y pérdida de sustancias proteínicas, hasta muerte celular. Se considera que termina la vida activa de la Vid.
Fuente: Almanza <i>et al.</i> , (2012); Agrobot (2020).	

De acuerdo al reporte estadístico mundial de la vitivinicultura del 2019 de la *International Organisation of Vine and Wine* (Figura 15), en el 2018 se registraron 7.449 hectáreas en el mundo, donde los principales países como

España representa el 13%, China 12%, Francia 11%, Italia 9% y Turquía 6%. En México, se encuentran 37 mil hectáreas cultivadas. El 57% de la producción total mundial es de uva para vino.

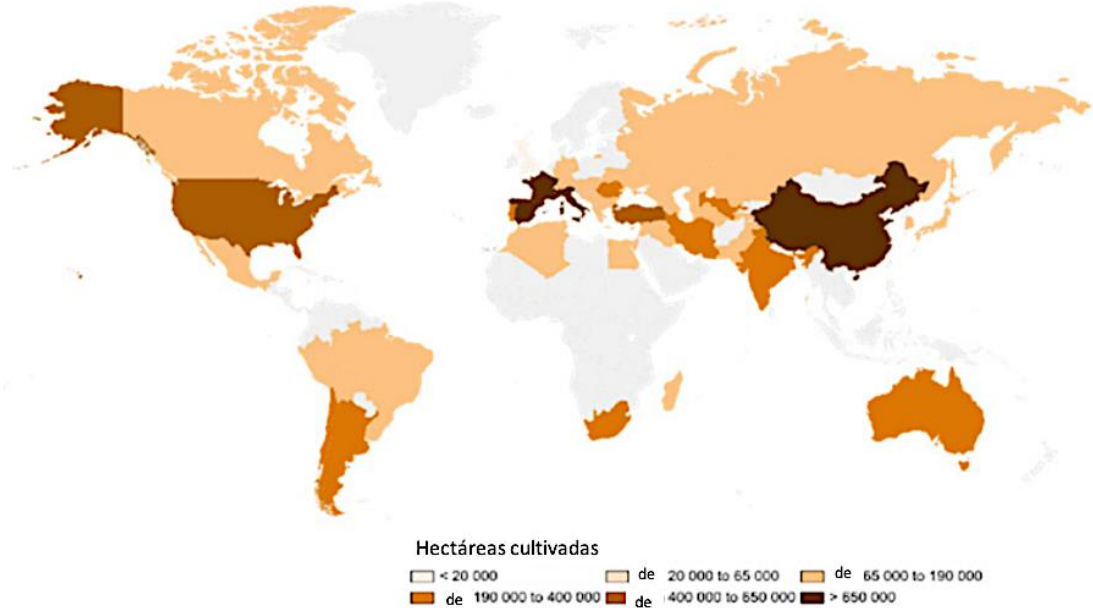


Figura 15. Distribución de hectáreas cultivadas de uva en el mundo.

2.4.2 Vino

2.4.2.1 Generalidades

De acuerdo con la definición del Código Internacional de Prácticas Enológicas (2016), el vino se define como “la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de uvas frescas, estrujadas o no, o de mosto de uva. Su contenido en alcohol adquirido no puede ser inferior a 8,5% vol”. La composición del vino (Figura 16) consiste en dos componentes principalmente: agua y etanol, los cuales aproximadamente 86.8% es agua y 11.2% etanol, pero el otro 2% es lo que le da el sabor al vino, y su composición es lo que distingue a los tipos de vino (Jackson, 2014).

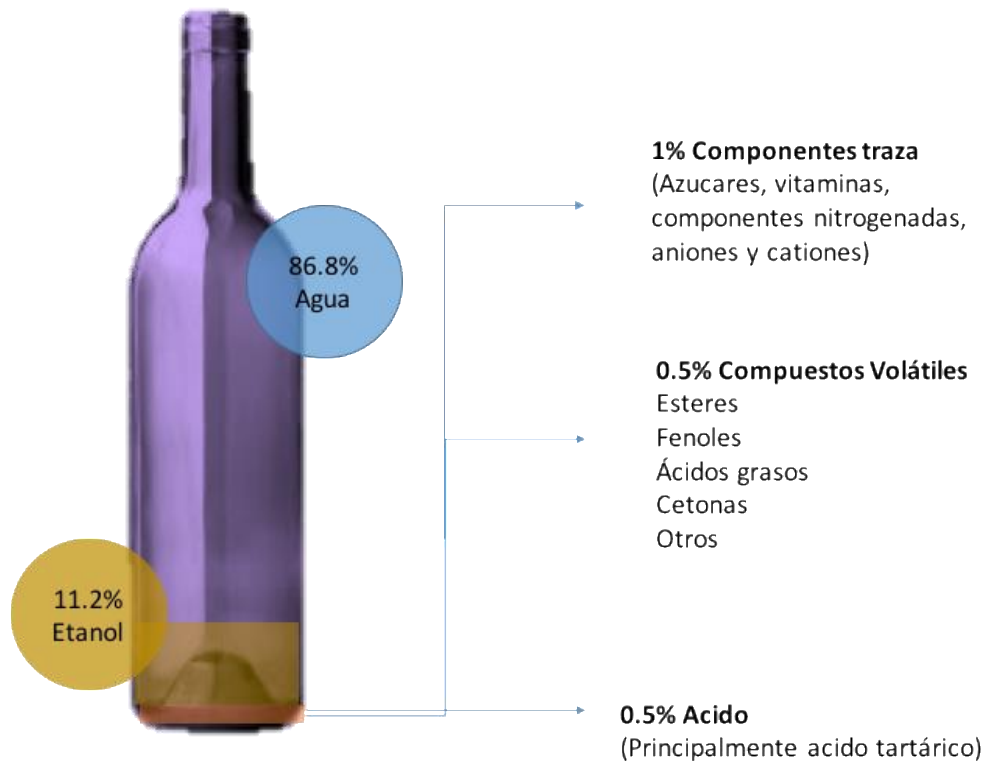


Figura 16. Composición química promedio del vino.

Los vinos son generalmente clasificados de distintas maneras, pero la más aceptada es aquella que lo divide en tres categorías (Jackson, 2014): vinos de mesa, vinos espumosos y vinos fortificados.

Cuadro 7. Características y clasificación del vino.

Clasificación		
Vinos de Mesa	Tinto	Presenta más sabor, es más seco y más astringente que el vino blanco.
	Blanco	Son generalmente más ácidos, fragantes y más dulces.
	Rosado	Son más suaves que el vino tinto, pero más astringente que los blancos, ocasionalmente ligeramente efervescente y dulce.
Vinos Espumosos	Método Chermat	Se realiza una segunda fermentación en tanque y por lo general tiene burbuja más grande, es un vino ligero espumoso y afrutado.
	Método Champaneoise	Segunda fermentación dentro de la botella, burbuja fina, espumoso, complejo y robusto.
	Inyección de CO ₂	Adición directa de gas carbónico, no existe segunda fermentación. Efervescencia efímera y no se consideran de alta calidad.
Fortificados	Secos	Se caracterizan por su alto contenido de alcohol.
	Dulces	
Fuente: Jackson (2014); Vinitodo (2014).		

2.4.2.2 Contexto mundial de la producción de vino

De acuerdo al reporte estadístico mundial de la vitivinicultura, en el 2018 se produjeron 292 de millones de hectolitros. Los mayores productores de vino son Italia con 54.8, Francia 48.6, España con 44.4 y USA con 23.9 millones de hectolitros (*International Organisation of Vine and Wine*, 2019).

2.4.2.3 Producción actual en México

De acuerdo con la base de datos de la Organización Internacional de la viña y el vino (2017), México posee 34 mil hectáreas de viñedos, las cuales 22 mil hectáreas están dedicadas al cultivo de uva de mesa. Sin embargo, cerca del

23% de hectáreas cultivadas se dedican al cultivo de uva para producir vino (7800 hectáreas aproximadamente), y aproximadamente la mitad se cultiva en los valles bajacalifornianos (Boullosa, 2017). Los principales estados productores de uva industrial en el 2017 fueron Baja California, Zacatecas, Sonora, Coahuila y Querétaro y en conjunto aportaron el 97.5% de la producción (Consejo Mexicano Vitivinícola, 2018).

México produce alrededor de 198 mil hectolitros de vino al año, lo que representan 26.4 millones de botellas de 750 mililitros. Hoy en día se encuentran registradas 207 empresas vitivinícolas, de las cuales 87% se localizan en el estado de Baja California (SAGARPA, 2017).

2.4.2.4 Baja California en la industria vinícola

Baja California es una de las regiones vinícolas más importantes (Consejo Mexicano Vitivinícola, 2018). Los valles que se encuentran en Baja California donde se produce uva para vino son: Valle de Guadalupe, Calafia, Santo Tomas, San Vicente, Valle de Ojos Negros y San Antonio de las minas (Consejo Mexicano Vitivinícola, 2018).

De acuerdo con el Consejo Mexicano Vitivinícola (2018), Baja California es el mayor productor de vino a nivel nacional al ocupar aproximadamente el 75% de la producción, seguido de los estados de Coahuila, Querétaro, Chihuahua, Guanajuato, Aguascalientes, Zacatecas, San Luis Potosí, Puebla, Sonora y Nuevo León. También es el estado con mayor superficie de cultivo para uva, al ocupar el 65% de las 6,500 hectáreas nacionales destinadas al cultivo de uva para producción de vino.

En el Cuadro 8, se muestran las principales cepas/variedades que se cultivan en Baja California como *Cabernet sauvignon* y *Merlot* (Tintas), *Chardonnay*, *Chenin blanc* y *Sauvignon blanc* (Blancas).

Cuadro 8. Principales variedades para vino cultivadas en Baja California.

Tipo	Variedad	Características
Tintas	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Variedad francesa, gran cuerpo y austeros con alto contenido de taninos.
	<i>Merlot</i>	Variedad francesa con racimos de tamaño medio y pequeños frutos de color negro azulado, utilizada para vinos jóvenes.
	<i>Barbera</i>	Variedad italiana que dota de vinos frescos de mediana corpulencia.
	<i>Zinfandel</i>	Uva versátil pues sus características permiten la obtención de rosados ligeros y tintos formales.
	Otras	Variedades como Nebbiolo, Tempranillo, Grenache, Malbec, Petit Verdot, Syrah y Petit Syrah.
Blancas	<i>Chenin Blanc</i>	Variedad francesa, con fruto pequeño de tamaño uniforme, da vinos secos muy afrutados.
	<i>Sauvignon Blanc</i>	Aromas vegetativos hasta florales, utilizada para vinos suaves y frescos hasta robustos.
	<i>Chardonnay</i>	Llamada la reina de las uvas blancas, se utiliza para elaborar vinos afrutados pues es una uva muy fina y de alta calidad.

Fuente: Consejo Mexicano Vitivinícola 2018.

En el municipio de Ensenada se encuentra la región vitivinícola más importante de Baja California, que se encuentra ubicada dentro de las llamadas “Franjas del Vino” en el mundo, coincidiendo con la franja que se encuentra en el Hemisferio Norte, entre los paralelos 30 y 50 latitud norte lo que permite que el clima, el sol y la lluvia presentes en esta zona sean óptimas para el cultivo

de *Vitis Vinifera*, la especie de uva más utilizada mundialmente para la producción de vino (Cofradía del Vino de Mexicali, 2020).

2.4.2.5 Proceso de vinificación.

El proceso en el cual se convierten las uvas a vino se le denomina vinificación y estos son los pasos básicos para la elaboración de vinos de mesa (Jackson, 2014; Fondo vitivinícola, 2009; Vinitodo, 2014):

Vino Tinto:

1. Cosecha: Puede ser mecánica o manual, se separa el racimo de la vid y para la elaboración de vino tinto se utilizan variedades de uva tinta.
2. Despalillado o descobajado: comprende la remoción de hojas y escobajo (parte verde del racimo), para dejar solo el fruto.
3. Estrujado: Tiene como objetivo la obtención del mosto. Las uvas son estrujadas o prensadas suavemente para permitir un rápido escurrimiento del mosto mediante la ruptura de los hollejos y desprendimiento de la pulpa. Después el mosto se traslada a los tanques o piletas
4. Tratamiento del Mosto: En esta etapa, se realizan operaciones como ajustamiento de pH, medir el contenido de azúcares del mosto y en algunos casos corregir al valor deseado, adición de sales de amonio y vitaminas (que generalmente es innecesario), adición de dióxido de azufre para la eliminación de la flora microbiana de la uva.
5. Encubado: El mosto se vierte en un contenedor para iniciar el proceso de fermentación junto con la pulpa, hollejo y semillas, puede ser en contenedores de acero inoxidable o piletas de hormigón armado. En esta parte ocurre la maceración, y se facilita la extracción de nutrientes, saborizantes y otros constituyentes de la pulpa, piel y de manera

limitada de las semillas. En el vino tinto, la maceración puede durar tanto como la fermentación o incluso después de ella (3 a 6 días).

6. Fermentación alcohólica: Los azúcares, principalmente fructosa y glucosa, presentes en el mosto son metabolizadas a etanol por *S. cerevisiae* mediante la glucólisis.
7. Descubado: Se separan las partes sólidas del vino, y el orujo es prensado para extraer totalmente el vino acumulado.
8. Fermentación Maloláctica: Es un proceso en el que el ácido málico se convierte a ácido láctico y favorece el equilibrio organoléptico y aporta ciertos aromas.
9. Trasiego: Se refiere a la transferencia del vino de un contenedor a otro, en el cual, actualmente ya se cuenta con sistemas automatizados de transferencia entre tanque y tanque.
10. Procesos de acabado: Se lleva a cabo una estabilización (inducción de la precipitación de tartratos y otras sales incluso la remoción de proteínas y pectinas de la solución.) Así como una clarificación (eliminación de partículas suspendidas con filtración, centrifugación o sedimentación).
11. Crianza en bodega: Consiste en mantener el vino en bodegas de madera (roble francés o americano), lo que permitirá que el vino se enriquezca en aromas, sabores y estabilización del color.
12. Embotellado.

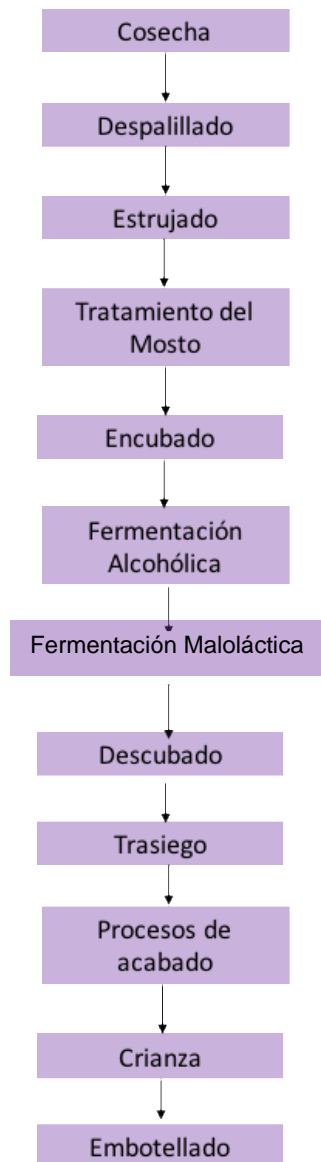


Figura 17. Diagrama general de la producción de vino tinto

Vino Blanco:

1. Cosecha: Se separa el racimo de la vid y para la elaboración de vino blanco se utilizan variedades de uva blanca.
2. Despalillado o descobajado: comprende la remoción de hojas y escobajo (parte verde del racimo), para dejar solo el fruto.

3. Estrujado: Tiene como objetivo la obtención del mosto. Las uvas son estrujadas o prensadas suavemente para permitir un rápido escurrimiento del mosto mediante la ruptura de los hollejos y desprendimiento de la pulpa. Después el mosto se traslada a los tanques o piletas
4. Prensado: En esta etapa, la uva es sometida a cierta presión para la extracción de mosto, la cual debe ser mínima para no extraer sustancias amargas y astringentes de las semillas y/o del hollejo. En este paso se obtiene como deshecho el orujo.
5. Tratamiento del Mosto: Se realiza el ajustamiento de pH, medir el contenido de azúcares del mosto, adición de sales de amonio y vitaminas (que generalmente es innecesario), adición de dióxido de azufre para la eliminación de la flora microbiana de la uva.
6. Desborre o asentamiento: En el vino blanco, frecuentemente son llevados a un contenedor donde están de 12 a 24 h a temperaturas bajas (5-15°C), esto se realiza para decantar restos de pulpas, semillas o partículas en suspensión se sedimenten al fondo del contenedor y posteriormente separarlo.
7. Encubado: El mosto se vierte en un contenedor para iniciar el proceso de fermentación, puede ser en contenedores de acero inoxidable, o barricas de roble.
8. Fermentación Alcohólica: Los azúcares son metabolizadas a etanol por *S. cerevisiae* mediante la glucólisis.
9. Fermentación Maloláctica: En algunos casos vinos blancos se someten a esta fermentación. Es un proceso en el que el ácido málico se convierte a ácido láctico y favorece el equilibrio organoléptico y aporta ciertos aromas.
10. Crianza en barrica: Consiste en estacionar el vino generalmente en barricas de madera (roble francés o americano), lo que permitirá que el vino se enriquezca en aromas, sabores y estabilización del color

11. Trasiago: Se refiere a la transferencia del vino de un contenedor a otro, en el cual, actualmente ya se cuenta con sistemas automatizados de transferencia entre tanque y tanque.
12. Procesos de acabado: Se lleva a cabo una estabilización y una clarificación.
13. Embotellado.

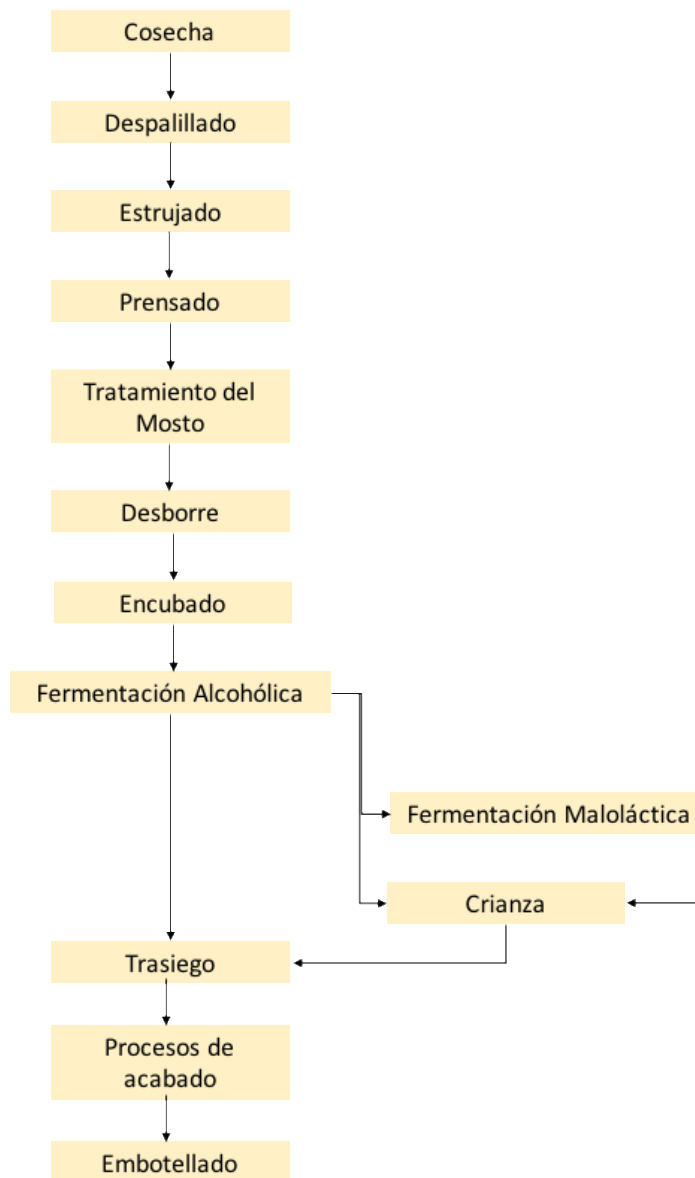


Figura 18. Diagrama general de la producción de vino blanco.

Vino Rosado:

1. Cosecha: para la elaboración de vino rosado se utilizan variedades de uva tinta.
2. Despalillado o descobajado: comprende la remoción de hojas y escobajo.
3. Estrujado: Tiene como objetivo la obtención del mosto. Después el mosto se traslada a los tanques o piletas
4. Tratamiento del Mosto: En esta etapa, se realiza el ajustamiento de pH, medir el contenido de azúcares del mosto, adición de sales de amonio y vitaminas (que generalmente es innecesario), adición de dióxido de azufre para la eliminación de la flora microbiana de la uva.
5. Encubado: El mosto se vierte en un contenedor para iniciar el proceso de fermentación al igual que en el vino tinto. En esta parte ocurre la maceración, este proceso facilita la extracción de nutrientes, saborizantes y otros constituyentes de la pulpa, piel y de manera limitada, de las semillas. En el vino rosado, la maceración a comparación del vino tinto (que dura de 3 hasta 6 días), en el vino rosado solo se deja durante 8 a 24 h.
6. Descubado: En este paso se separan las partes sólidas del mosto y el orujo es prensado para extraer totalmente el mosto acumulado.
7. Fermentación Alcohólica: los azúcares son metabolizadas a etanol.
8. Trasiego: Se refiere a la transferencia del vino de un contenedor a otro.
9. Procesos de acabado: Se lleva a cabo una estabilización y una clarificación.
10. Crianza en barrica: Consiste en mantener el vino generalmente en barricas de madera (roble francés o americano).
11. Embotellado.



Figura 19. Diagrama general de la producción de vino rosado

2.4.3 Residuos vinícolas

2.4.3.1 Generalidades

Durante el proceso de la elaboración del vino, se generan subproductos ricos en materia orgánica, que al no ser tratados o depositados de la manera correcta pueden ser un riesgo potencial de plagas y contaminación (Bustamante *et al.*, 2008). Entre los principales residuos vinícolas se

encuentran los orujos (mezcla de semillas y hollejos) y lías de vino (Hogervorst *et al.*, 2017).

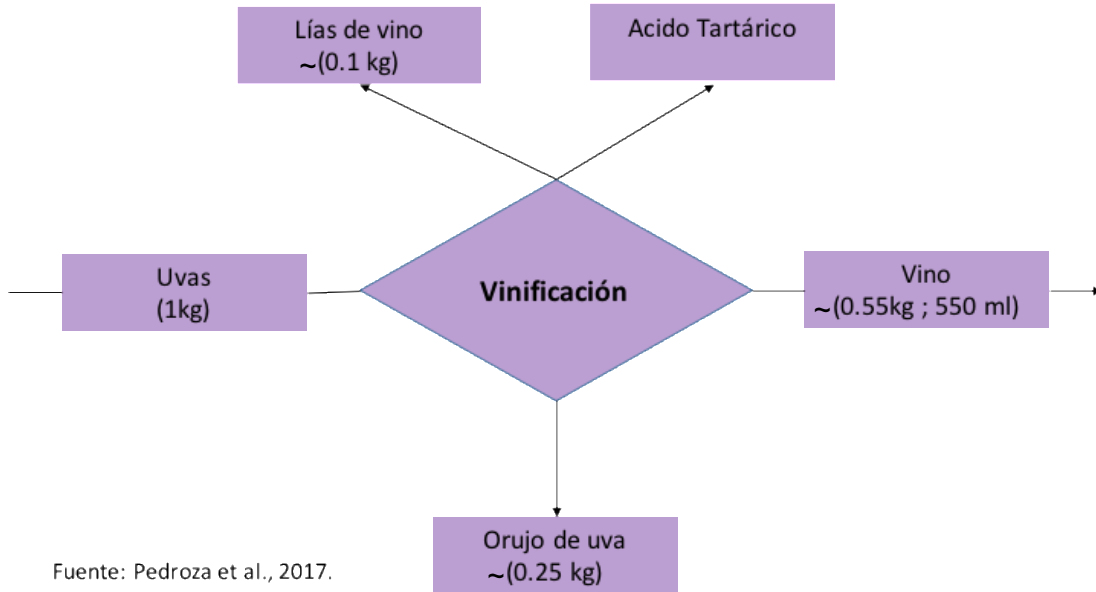


Figura 20. Balance de masa de la vinificación.

2.4.3.2 Utilización actual de los residuos vinícolas

Tradicionalmente el orujo de uva ha sido utilizado como fertilizante y como alimento para ganado, también se utiliza como composta para incrementar la materia orgánica, nitrógeno y minerales en los suelos vinícolas, aunque sin mucho éxito pues el orujo de uva contiene componentes que pueden afectar negativamente a los cultivos y el aumento de peso del ganado (Venkitasamy *et al.*, 2019). Asimismo, el orujo es utilizado en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia (Beres *et al.*, 2017).

El descarte del orujo o incluso su incineración en los campos son perjudiciales para el medio ambiente, y debido a sus componentes llegan a tener cierta resistencia a la degradación biológica, contaminación de aguas superficiales y

subterráneas incluyendo su agotamiento de oxígeno, atracción de plagas y por lo tanto dispersión de enfermedades, entre otros problemas (Venkitasamy *et al.*, 2019). Cada país tiene su propia política de gestión de residuos agroindustriales. Por ejemplo, en España (uno de los principales 10 productores de vino) tienen la opción de reciclar, valorizar o eliminar los residuos, e incluso puede haber multas monetarias si no hay una disposición adecuada de los residuos. De tal forma que en varios países hay necesidad de generar nuevos protocolos de valorización o destino de estos residuos (Martínez *et al.*, 2016).

2.4.4 Orujo

El principal subproducto que se genera en la industria vinícola es el orujo de uva, el cual consiste principalmente de la piel, restos de pulpa, semillas y tallos de la uva, que representa alrededor del 20-25% del peso de las uvas utilizadas para la producción del vino y este se genera cuando la uva es prensada para la producción del mosto (Hogervost *et al.*, 2017). Aunque su composición depende del tipo y variedad de uva utilizada, la composición promedio se puede observar en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Constituyentes del orujo de uva promedio.

Constituyente	Cantidad porcentual	Componentes
Piel y pulpa	(82%)	Compuestos fenólicos como pigmentos (antocianinas), antioxidantes, taninos, otros.
Semilla	(12%)	Compuestos fenólicos como taninos.

Fuente: Pedroza *et al.*, 2017.

2.4.4.1 Composición del orujo

- Agua

Se estima que el orujo de uva tiene en promedio entre 55 y 75% de agua, pero este porcentaje depende del origen e intensidad del prensado en la producción del vino (Gonzalez *et al.*, 2010).

- Fibra dietética

La fibra dietética está constituida por polisacáridos de la pared celular y lignina. Las concentraciones varían entre 43% al 75% dependiendo del orujo, ya que, el orujo de vino tinto tiene mayor fibra que el orujo del vino blanco. La piel de la uva, al ser un material lignocelulósico, es rico en hemicelulosas, las cuales, si se someten a una hidrólisis, producen soluciones con amplia variedad de monómeros de xilosa y glucosa. Los principales monosacáridos presentes en el orujo de uva son ramnosa, arabiosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa y ácido galacturónico, los cuales varían dependiendo de la variedad de uva (Beres *et al.*, 2017).

- Proteína

El contenido de proteína está en un rango 6 a 15%, teniendo una proporción de proteína similar entre la semilla y la piel de la uva. Es rico en aminoácidos como ácido glutámico y aspártico y deficiente en triptófano y aminoácidos que contienen azufre. Las proteínas en la piel son ricas en alanina y lisina, y las semillas son ricas en proteínas de la familia de las globulinas (García *et al.*, 2017; Gazzola *et al.*, 2014).

- Lípidos

El contenido de lípidos del orujo de uva se encuentra en las semillas, los cuales están presentes en un rango de 14 a 17%, destacando al ácido linoleico (70%),

ácido oleico (15%) y ácido palmítico (7%) como los predominantes. Es bajo en ácidos grasos saturados (Fernandes *et al.*, 2013).

- **Minerales**

El potasio es el mineral mayoritario en el orujo de uva, principalmente en la piel de uva. Por el contrario, en las semillas se encuentra mayormente el calcio, fósforo, azufre y magnesio. De las sales de potasio presentes en el orujo los tartratos (normalmente encontrado como bitartrato de potasio) puede llegar a representar entre el 4 y 14% de materia seca (García *et al.*, 2017).

- **Compuestos fenólicos**

En el orujo de uva, la concentración más alta de compuestos fenólicos se encuentra en la piel, semillas y tallos, y estos compuestos se clasifican en tres grupos (Beres *et al.*, 2017):

- Ácidos fenólicos como ácidos hidroxicinámicos y benzoicos.
- Flavonoides simples como flavonoles (kaempferol, quercetina), antocianinas (malvidina y cianidina) y catequinas.
- Taninos como proantocianidinas, galotaninos, elagitaninos.

Los principales compuestos fenólicos en el orujo de uva son las antocianinas, presentes mayormente en la piel de orujo de uva tinta. Mientras que los flavonoles están presentes mayormente en las semillas (Beres *et al.*, 2017).

2.4.4.2 Uso del orujo para la producción de biocombustibles

El orujo de uva es normalmente utilizado como fertilizante o como materia prima para la obtención de aceites para la industria cosmética; sin embargo, las aplicaciones existentes de este residuo utilizan una mínima porción del volumen producido, por lo que se han buscado nuevas alternativas para la utilización del mismo, por ejemplo, la producción de biocombustibles como

etanol o biogás, siendo una alternativa prometedora (Zheng *et al.*, 2012). También existen estudios del uso del orujo de uva como biocombustible, aplicado en la generación de calor o electricidad mediante la combustión de *pellets* de orujo (Cholewinski *et al.*, 2017).

Actualmente, no existe la producción de bioetanol a partir de orujo de uva a gran escala y la investigación en laboratorio es limitada, ya que, existen problemáticas del empleo del orujo como materia prima para la producción de etanol debido a la generación de compuestos inhibidores que son tóxicos para la levadura. Además de que son necesarios pretratamientos adecuados, y porque el orujo es un residuo generado sólo en la época de vinificación (Logan, 2015; Zheng *et al.*, 2012).

VIII. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, los combustibles fósiles como el petróleo, representan la fuente principal de energía de la sociedad moderna. Sin embargo, es un recurso no renovable y su dependencia conlleva a una serie de problemas, principalmente, ambientales (Soccol *et al.*, 2019).

Ante el crecimiento de la población y su rápida industrialización ha surgido la necesidad de encontrar nuevas alternativas de generación energética. Los biocombustibles, al ser una fuente de energía limpia y renovable, prometen ser una alternativa viable. Un ejemplo, es el bioetanol, el cual debido a sus características ha sido foco de investigación a nivel mundial ya que puede ayudar a la disminución de la dependencia del petróleo (Bušić *et al.*, 2018)

El bioetanol, actualmente es producido a partir de cultivos alimenticios, como el maíz y la caña de azúcar, por lo que el uso de otras fuentes de materia prima es necesario para no desviar estos cultivos del área alimentaria (Bajpai, 2013; Walker, 2010).

Baja California es uno de los principales productores de vino a nivel nacional. Derivado de la vinificación se generan como subproductos los orujos de la uva, que se caracterizan por tener un alto contenido de poli y monosacáridos potencialmente fermentables. Su evaluación y uso para la producción de bioetanol, representaría una fuente de materia prima económica y viable. Además, ayudaría a disminuir su impacto en el medio ambiente debido al poco aprovechamiento y falta de disposición del residuo (Consejo Mexicano Vitivinícola, 2018; Beres *et al.*, 2017; Venkitasamy *et al.*, 2019).

Por lo expuesto anteriormente, el presente trabajo de investigación se encamina en la evaluación de diferentes pretratamientos de hidrólisis de los residuos vinícolas y el diseño de medios de cultivo para la producción de bioetanol.

IX. HIPÓTESIS

Mediante la implementación de pretratamientos de hidrólisis en los residuos vinícolas de Baja California, se obtendrán hidrolizados ricos en azúcares que serán empleados como medios de cultivo para la producción de bioetanol.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar diferentes pretratamientos de hidrólisis en los residuos vinícolas de Baja California para obtener hidrolizados ricos en azúcares, y diseñar medios de cultivo para la producción de bioetanol.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar diferentes pretratamientos de hidrólisis en orujos de uva para vino rosado y vino blanco para la obtención de hidrolizados ricos en azúcares.
- Caracterizar fisicoquímicamente los hidrolizados de orujos de uva para vino rosado y vino blanco: concentración de azúcares reductores, azúcares totales, fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante.
- Diseñar medios de cultivo a base de hidrolizados de orujo de uva para vino rosado y vino blanco para la producción de bioetanol.
- Evaluar la producción de bioetanol empleando medios de cultivo a base de hidrolizados de orujo de uva para vino rosado y vino blanco.

6. MÉTODOS

9.1 Recolección de residuos vinícolas

La toma de muestras se realizó durante los meses de septiembre y octubre de 2017 en dos plantas vitivinícolas del Valle de Guadalupe en Ensenada, Baja California. Se tomaron muestras representativas de 10 kg de orujo de vino blanco de la empresa L.A. Cetto ®, y 10 kg de orujo de vino rosado de la vinícola Xecue ®. Las muestras fueron almacenadas en bolsas de plástico a una temperatura de -20°C.

9.2 Procesamiento de residuos vinícolas

El procesamiento del orujo de vino blanco y rosado consistió en la obtención de polvos mediante el secado y molienda de sus constituyentes. El procesamiento inició con la separación de la piel y de las semillas, registrando el peso húmedo de cada fracción empleando una balanza analítica (VELAB, Modelo RS232C). Posteriormente, las fracciones se sometieron a un secado en horno a 80°C durante 48 h (Grieve, Modelo L0-201C). Se registró el peso de las fracciones secas, y se molieron individualmente en un mortero de porcelana hasta la obtención de un polvo con un tamaño de partícula menor a 1mm de diámetro. Los polvos de cada fracción fueron almacenados en tubos de plástico de 50 mL y almacenados a temperatura ambiente y en oscuridad.

9.3 Pretratamientos de hidrólisis de los residuos vinícolas

Se evaluaron dos pretratamientos de hidrólisis en los polvos obtenidos del orujo de vino blanco y rosado.

9.3.1 Método 1

Se emplearon las condiciones descritas por Tzintzun *et al.*, (2016) y Pérez, (2019). Para la elaboración de 300 mL de hidrolizado se pesaron 3 g de polvo de muestra compuesta (1.5 g de polvo de semilla y 1.5 g de polvo de piel del orujo correspondiente), y se disolvieron en 300 mL de agua destilada. En

campana de extracción (ECOSHELL S/Modelo) se adicionaron 3 mL de ácido clorhídrico al 37% (v/v) y se mantuvo en agitación a 170 rpm durante 45 min en una parrilla de agitación (HeathRow, Modelo 5L A). Finalizado el tiempo, se tomó una muestra de 2 mL para la determinación de azúcares. Posteriormente, se realizó un tratamiento térmico a alta presión de los polvos acidulados manteniendo a 121°C, 15 psi durante 15 min (autoclave Novatec, Modelo EV-30). Al finalizar, se tomaron 2mL de muestra para determinación de azúcares reductores. Se realizó el ajuste de pH de los hidrolizados hasta obtener un valor de 7.0 ± 7.2 (potenciómetro OHAUS, Modelo STARTER 2100), y se realizó una filtración de los hidrolizados recuperando el filtrado. Se tomaron muestras de 2 mL para la determinación de azucares reductores. Finalmente, se realizó un segundo tratamiento térmico de alta presión en autoclave con las mismas condiciones mencionadas previamente. Se tomaron muestras de 2 mL para la determinación de azúcares reductores y los hidrolizados se almacenaron a 4°C.

9.3.2 Método 2

Para 500 mL de hidrolizado se pesaron 25 g de muestra compuesta (12.5 g de polvo de semilla y 12.5 g de polvo de piel del orujo correspondiente) y se disolvieron en 500 mL de agua destilada. Se adicionaron 10 mL de ácido clorhídrico al 37% (v/v). Posteriormente, las mezclas se mantuvieron en agitación a 170 rpm durante 30 min, finalizado el tiempo, se realizó un ajuste de pH mediante la adición de soluciones de hidróxido de sodio al 30%, 10% y 1% (p/v) hasta obtener un valor de pH de 7.0 ± 7.2 . Los hidrolizados se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min, y se recuperaron los sobrenadantes (centrífuga Jouan, Modelo C312). Finalmente, se realizó un segundo tratamiento térmico de alta presión en autoclave y se mantuvo a 121°C, 15 psi durante 15 min. Al finalizar, se tomaron 2mL de muestra para la determinación de azúcares reductores.

9.4 Caracterización de los hidrolizados provenientes de los residuos vinícolas.

9.4.1 Determinación de azúcares reductores y totales

- Azúcares reductores.

Se empleó el método colorimétrico modificado del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959) utilizando un espectrofotómetro UV-Visible (Thermoscientific, Modelo GENESYS 10SVIS), y se desarrolló una curva patrón de glucosa (0 a 1 g/L).

En primer lugar, se realizaron diluciones de los hidrolizados con agua destilada en tubos de ensayo de vidrio hasta obtener un volumen final de 1 mL, con el objetivo de obtener lecturas dentro del rango de la curva patrón. Posteriormente, se añadió 1 mL de reactivo DNS, los tubos se agitaron en un vórtex (Scientific Ind., Modelo Gene 2) durante 30 s y después se mantuvieron en un baño de agua a 80°C durante 15 min. Se adicionaron 8 mL de agua destilada a cada tubo. Los tubos fueron agitados antes de la toma de muestra y se realizaron las lecturas de absorbancia a 575 nm en un espectrofotómetro. El blanco se preparó utilizando agua destilada y reactivo DNS.

- Azúcares Totales

Se utilizó el método colorimétrico fenol-sulfúrico desarrollado por Dubois (1956) utilizando una curva patrón de sacarosa (0.1 a 0.5 g/L). En primer lugar, se realizaron diluciones de los hidrolizados con un volumen final de 1 mL. Posteriormente, se añadió 1 mL de una solución de fenol al 5% (p/v) y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (98% v/v). Las muestras se incubaron en un baño de hielo en oscuridad durante 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro UV-visible. Se utilizó como blanco agua destilada, solución de fenol al 5% y 25 mL de ácido sulfúrico concentrado.

9.4.2 Determinación de compuestos fenólicos.

- Fenoles Totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó empleando el método modificado de Lapornik *et al.*, (2005), utilizando como referencia la curva patrón de ácido gálico (0.05 a 0.25 mg/mL). La reacción se llevó a cabo mezclando 100 μ L de muestra y 500 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), posteriormente se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 5 min. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron 400 μ L de carbonato de sodio (1N) y se incubó en oscuridad durante 30 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 775 nm en un espectrofotómetro UV-visible. Se utilizó como blanco agua destilada, reactivo Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio.

- Flavonoides

La cuantificación de flavonoides se realizó empleando la técnica modificada del cloruro de aluminio descrito por Zhishen *et al.*, (1999), utilizando como referencia la curva patrón de quercetina (0.2 a 1 mg/mL). La reacción se llevó a cabo mezclando 1 mL de muestra diluida, 4 mL de agua destilada y 300 μ L de nitrato de sodio (0.5 g/L). Posteriormente, las reacciones se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 5 min, una vez pasado el tiempo, se añadieron 300 μ L de cloruro de aluminio (1 g/L) y se mantuvo en oscuridad durante 6 min. Después se añadieron 2 mL de hidróxido de sodio (1M) y 2.4 mL de agua. Finalmente, se midió la absorbancia a 511 nm en un espectrofotómetro UV-visible.

9.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los hidrolizados se determinó mediante el uso del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), de acuerdo con el método modificado de Kim, Guo y Packer (2002). La reacción se llevó a cabo mezclando 100 μ L de muestra diluida con agua destilada y 2.9 mL de solución DPPH. Posteriormente, las reacciones se incubaron a temperatura ambiente y

oscuridad durante 30 min, se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro UV-visible. Se utilizó como blanco metanol al 96% con DPPH.

9.5 Desarrollo de cinéticas de producción de bioetanol

9.5.1 Preparación del preinóculo

Se reactivó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a partir de una muestra de levadura comercial de la marca Leviatan y Flor ® siguiendo las instrucciones presentes en el empaque, se inoculó en agar papa dextrosa (PDA) y se incubó a 30 °C durante 24 h. Posteriormente, se prepararon 2 matraces de 250 mL con 50 mL de caldo papa dextrosa (PDB), se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 psi durante 15 min. Se realizó la inoculación de los medios de cultivo con una asada del cultivo de *S. cerevisiae* previamente cultivada en PDA, y se incubó a 30 °C, 170 rpm durante 18 h (VWR, Modelo 100-120).

9.5.2 Diseño de medios de cultivo para la producción de bioetanol

Se diseñaron diferentes medios de cultivo a base de hidrolizados de orujo de uva para vino blanco y rosado, y se enriquecieron con diferentes fuentes de nitrógeno. Se desarrollaron cinéticas de producción de bioetanol por *S. cerevisiae* en los distintos medios de cultivo y se realizó la cuantificación de azúcares, biomasa, pH y producción de CO₂ a las 0, 24 y 48 h de cultivo.

La preparación de los medios de cultivo se realizó de la siguiente manera:

- Medio control

En el Cuadro 10 se muestra la composición del medio de cultivo control, donde la fuente de carbono fue la glucosa y como fuente de nitrógeno el nitrato de potasio:

Cuadro 10. Composición del medio control.

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	15
Nitrato de potasio	1.5
Fosfato monobásico de potasio	1.5
Sulfato de magnesio	1.5
Agua destilada	1000 mL

Se ajustó el pH a 4 con una solución de HCl al 10% (v/v) y se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 psi durante 15 min. Para la cinética se agregaron 39 mL del medio en 8 botellas de vidrio de 120 mL estériles y 1.3 mL de preinóculo de *S. cerevisiae* bajo condiciones de esterilidad.

- **Medios de cultivo a base de hidrolizados de orujo de vino blanco y rosado**

Para la elaboración de estos medios se realizaron dos soluciones salinas saturadas con diferente fuente de nitrógeno (nitrato de potasio y extracto de levadura) que posteriormente fueron agregadas a los hidrolizados:

Cuadro 11. Composición de las soluciones salinas saturadas con diferentes fuentes de nitrógeno.

Solución salina saturada A		Solución salina saturada B	
Nitrato de potasio	15 g/L	Extracto de levadura	1.5 g/L
Fosfato monobásico de potasio	15 g/L	Fosfato monobásico de potasio (15 g/l)	15 g/L
Sulfato de magnesio	15 g/L	Sulfato de magnesio	15 g/L
Agua destilada	1000 mL	Agua destilada	1000 mL

Se ajustó el pH de las soluciones hasta obtener un valor de 4 con una solución de HCl al 10% (v/v) y se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 psi durante 15

min. Las cinéticas se desarrollaron en botellas serológicas estériles de 120 mL con septos preparando los siguientes tratamientos:

- 1) Medio 1: hidrolizado de orujo de vino rosado (35 mL) con solución A (4 mL).
- 2) Medio 2: hidrolizado de orujo de vino rosado (35 mL) con solución B (4 mL).
- 3) Medio 3: hidrolizado de orujo de vino blanco (35 mL) con solución A (4 mL).
- 4) Medio 4: hidrolizado de orujo de vino blanco (35 mL) con solución B (4 mL).

Todas las botellas se inocularon con 1.3 mL del preinóculo de *S. cerevisiae*, todos los experimentos se desarrollaron por triplicado.

9.5.3 Desarrollo de cinéticas para la producción de bioetanol

Una vez que se obtuvieron los mejores medios para la producción de bioetanol se desarrollaron cinéticas a lo largo de 24 h de cultivo, tomando muestras cada 4 h y determinando la concentración de azúcares, biomasa, pH, CO₂ y producción de etanol.

Las cinéticas se desarrollaron en botellas serológicas de 120 mL estériles con septos, se adicionó a cada botella 35 mL de hidrolizado de orujo de vino blanco o rosado, 4 mL de solución salina saturada B y 1.3 mL de preinóculo de *S. cerevisiae*. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 170 rpm durante 24 h.

9.5.4 Análisis de las muestras

El análisis de las muestras se realizó en el siguiente orden:



Figura 21. Diagrama del análisis de muestras.

9.5.4.1 Cuantificación de CO₂

La cuantificación de CO₂ se realizó mediante el desplazamiento de una solución de cloruro de sodio sobresaturada (250 g/L) en una probeta de vidrio, se midió el volumen de solución salina desplazado debido al volumen ocupado por el CO₂ producido en los cultivos fermentados. En la Figura 22 se muestra el sistema que se diseñó para la medición del CO₂:

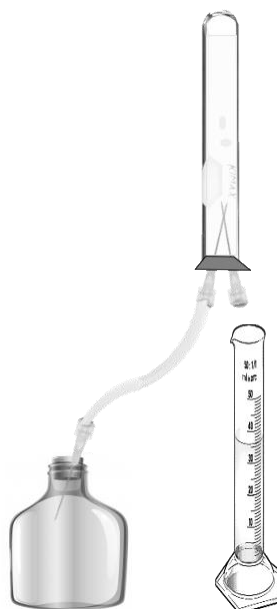


Figura 22. Diseño del sistema para la cuantificación de CO₂ por desplazamiento de una solución salina sobresaturada.

9.5.4.2 Cuantificación de azúcares reductores

Se empleó el método colorimétrico modificado del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) desarrollado por Miller (1959) descrito anteriormente.

9.5.4.3 Análisis de pH

Las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente con un potenciómetro previamente calibrado.

9.5.4.4 Biomasa por peso seco

La producción de biomasa se determinó por una técnica gravimétrica. En primer lugar, los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 min. Se recuperaron los *pellets* celulares y se colocaron en charolas de aluminio (previamente colocadas a peso constante), se registró el peso de las charolas con biomasa húmeda. Posteriormente, las muestras se colocaron en un horno a 80°C durante 24 h, y finalmente se registró el peso de la biomasa seca.

9.5.4.5 Determinación de etanol

El etanol producido en los medios fermentados se recuperó mediante una destilación simple. De esta forma, se montó un sistema de destilación de vidrio con un sistema de recirculación de agua a 4°C. El matraz que contenía el medio fermentado se colocó en una parrilla de calentamiento (ThermoScientific, Cimarrac Basic) a 80°C, el tiempo para la destilación de las muestras fue de 2 h. El volumen de etanol recuperado fue cuantificado y los destilados fueron almacenados en congelación a - 20°C.

9.5.5 Análisis estadístico

Se emplearon diseños completamente al azar para los experimentos realizados en este estudio. En el caso de la evaluación de los métodos de hidrólisis para cada uno de los orujos, se evaluó como factor el método de hidrólisis con dos niveles (1 y 2). En los experimentos donde se evaluó la producción de bioetanol con diferentes medios de cultivo, para el hidrolizado de orujo rosado se evaluó como factor el tipo de medio de cultivo con tres niveles (medio con nitrato de potasio, medio con extracto de levadura y medio control). Mientras que, para el hidrolizado de orujo blanco el factor de estudio fue el tipo de medio cultivo con cuatro niveles (medio con nitrato de potasio,

medio con extracto de levadura, medio control y medio PDC). En todos los casos, los tratamientos se desarrollaron y evaluaron por triplicado.

Los datos generados se analizaron por un análisis de varianza (ANOVA). Con el objetivo de determinar las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, se realizó un análisis aplicando la prueba de Tukey-Kramer con un nivel de significancia de 0.5 ($\alpha \leq 0.5$). El análisis estadístico se desarrolló empleando el paquete estadístico NCSS versión 2007.

9.5.6 Parámetros cinéticos

Los rendimientos de formación de biomasa, etanol y CO₂ respecto al consumo de sustrato se definió mediante las ecuaciones 1 a la 3:

$$\text{Rendimiento celular } Y \frac{X}{S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{\text{Biomasa Producida (g)}}{\text{Sustrato Consumido (g)}} \quad (1)$$

$$\text{Rendimiento de Etanol } Y \frac{\text{Etanol}}{S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{\text{Etanol Producido (g)}}{\text{Sustrato Consumido (g)}} \quad (2)$$

$$\text{Rendimiento de CO}_2 \quad Y \frac{\text{CO}_2}{S} = \frac{\Delta \text{CO}_2}{\Delta S} = \frac{\text{CO}_2 \text{ Producido (g)}}{\text{Sustrato Consumido (g)}} \quad (3)$$

La velocidad específica de crecimiento fue determinada empelando la ecuación 4 realizando una regresión lineal de la fase exponencial de la curva de crecimiento:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (4)$$

X₀= es la concentración inicial de células

X= la concentración de células viables en cualquier tiempo

μ= velocidad específica de crecimiento (s⁻)

t= tiempo de duplicación (s, h, min)

En el proceso de fermentación, la determinación de las tasas específicas de producción y consumo se calcularon con las ecuaciones 5 y 6:

$$\text{Tasa específica de formación de Etanol / CO}_2 \quad q_p = Y_{p/x} \mu \quad (5)$$

$$\text{Tasa específica de consumo de sustrato (q}_s) \quad q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} \quad (6)$$

Para el cálculo teórico de CO₂, se utilizó y despejo la ecuación de los gases ideales para calcular el número de moles:

$$\text{Ecuación gases ideales: } PV = nRT \quad (7)$$

El cálculo de Etanol teórico se calculó considerando la glucosa consumida mediante la ecuación 8:

$$\text{Glucosa consumida g/L} \left(\frac{1 \text{ mol Glu}}{180 \text{ g}} \right) \left(\frac{2 \text{ mol Eta}}{1 \text{ mol Glu}} \right) \left(\frac{46 \text{ g Eta}}{1 \text{ mol Eta}} \right) = \text{g Eta/L} \quad (8)$$

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Composición másica de los orujos de uva

En la Figura 23, se muestran los resultados de la composición másica porcentual del orujo de uva para vino rosado y vino blanco.

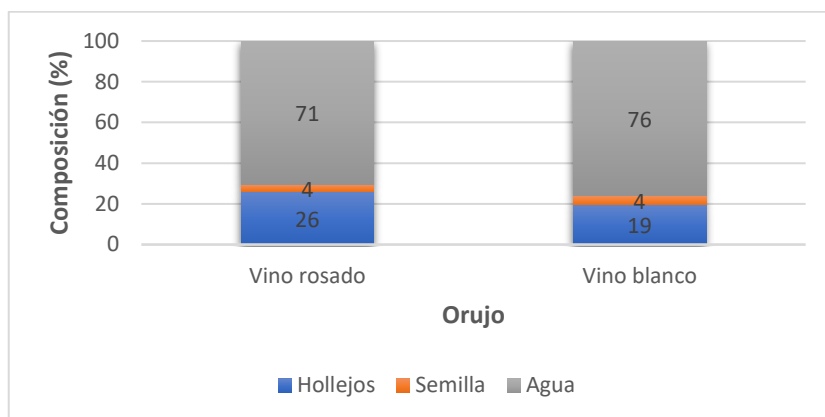


Figura 23. Composición másica de los orujos de uva para vino rosado y vino blanco.

La composición másica del orujo de uva se divide en tres fracciones: agua, hollejo y semilla.

El contenido de agua resultante del análisis fue de 71% en orujo vino rosado y 76% en orujo de vino blanco.

Estos resultados fueron similares a los reportados por González *et al.*, (2010) donde analizaron 10 variedades de uva y sus subproductos; el orujo de uva contenía en promedio entre 55 y 75% de agua, pero este porcentaje depende del origen e intensidad del prensado en la producción del vino.

Con respecto a los hollejos (pulpa y piel), los análisis indicaron que representan el 26% en el orujo de vino rosado y 19% en orujo de vino blanco.

Al comparar estos resultados con otros estudios, se observa que la fracción de hollejos en nuestro trabajo fue mayor en comparación con los resultados reportados por Flanzky (2000), donde reportó que los hollejos de la uva

corresponden entre un 7-12% del peso total del residuo. Estas variaciones se pueden explicar debido a las variedades de uva del orujo empleadas.

En cuanto a la fracción de semillas, se observó que representan el 4% del peso del orujo de vino rosado y de vino blanco, lo que concuerda con lo reportado por Beres *et al.*, (2017), donde la semilla representaba del 2 al 5%.

10.2 Evaluación del método de hidrólisis de los orujos de uva

La biomasa lignocelulósica, representa una fuente sustentable y prometedora para la producción de biocombustibles de nueva generación, por lo que su aprovechamiento e investigación sobre métodos para la liberación de sus azúcares es de suma importancia ante los retos ambientales que enfrentamos hoy en día (Chiaramonti *et al.*, 2012). Es necesario llevar a cabo una descomposición estructural de la lignocelulosa para su aprovechamiento, ya que, existen enlaces fuertes entre las moléculas de azúcares presentes y así lograr la producción de bioetanol mediante la fermentación de las mismas.

La hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, en este caso el orujo de uva, es una de las etapas más importantes en la producción de etanol. La hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática son los principales métodos que se utilizan para la degradación de azúcares en la biomasa vegetal (Du *et al.*, 2011). La hidrólisis ácida a diferencia de la enzimática, representa rendimientos de reacción más altos y no requiere pretratamientos sofisticados y costosos (Tejeda *et al.*, 2011)

Por ello, para asegurar la liberación y disponibilidad de azúcares monoméricos potencialmente fermentables de los orujos de uva, se evaluaron dos métodos distintos de hidrólisis ácida junto a tratamientos térmicos de alta presión descritos anteriormente como Método 1 (Tzintzun *et al.*, 2016 y Pérez, 2019) y Método 2, que constan principalmente de dos etapas, pretratamientos fisicoquímicos e hidrólisis ácida.

En la Figura 24, se muestra la concentración de azúcares reductores en los hidrolizados de orujo de vino rosado y vino blanco sometidos a los dos métodos de hidrólisis. Como resultado se observó que el método 2 fue más efectivo para hidrolizar los azúcares complejos en los orujos, ya que, se obtuvieron 13.61 g/L de azúcares reductores en el hidrolizado de orujo de vino rosado; mientras que con el método 1 se obtuvo una concentración de 4.16 g/L. De igual manera para el orujo de vino blanco, 13.62 g/L con el método 2 y 3.47 g/L de azúcares reductores con el método 1.

Al comparar los resultados con otros estudios López Oyanedel (2019), reportó una concentración de azúcares reductores de 34.67 g/L en orujo de uva mediante el uso de hidrolisis enzimática y un pretratamiento ácido. Al llevar a cabo una combinación de distintos pretratamientos y métodos de hidrolisis se logran altas concentraciones de azúcares. Sin embargo, esto significa un gran aumento en el costo de producción (Luo *et al.*, 2019).

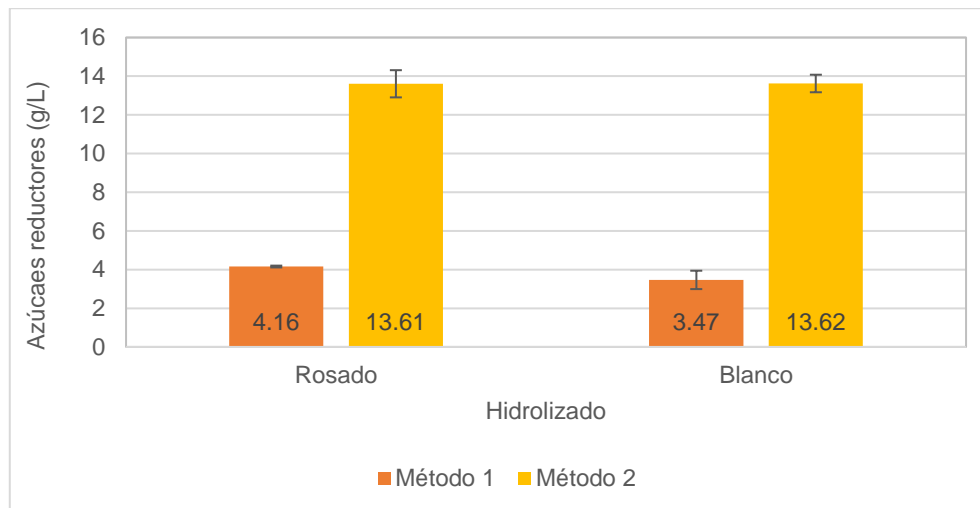


Figura 24. Concentración de azúcares reductores en los hidrolizados de los orujos de vino rosado y vino blanco evaluando dos métodos de hidrólisis. Los datos son expresados como valores promedio \pm desviación estándar ($n = 3$).

10.3 Compuestos bioactivos presentes en los hidrolizados de residuos vinícolas

Con base en los resultados obtenidos en nuestro estudio, se observó que el método 2 garantizó una mejor liberación y disponibilidad de azúcares reductores en los hidrolizados. Por lo tanto, se realizó una caracterización de los hidrolizados al cuantificar diferentes compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides, así como sus propiedades como la actividad antioxidante de los hidrolizados (Cuadro 12).

Como resultado se observó que el orujo de vino blanco presentó una mayor concentración de fenoles totales (3.27 g/L) en comparación con el orujo de vino rosado (1.64 g/L) (Cuadro 12). Cabe destacar que estos valores concuerdan con los reportados por Aguilar *et al.* (2015), donde los valores máximos que reportaron son de 2.85 g/L en mostos enriquecidos con orujo de uva.

Por otra parte, se analizó la concentración de flavonoides en este estudio (Cuadro 12) obteniéndose para el hidrolizado de orujo de vino rosado 10.45 g/L de flavonoides, y en el orujo blanco 7.53 g/L. Es importante señalar que los resultados obtenidos en este estudio fueron superiores a los reportados por Negro *et al.*, (2003) reportando 1.31 g/L de flavonoides totales en muestras de orujo de uva.

Los resultados referentes a la actividad antioxidante, demostraron que los hidrolizados tienen la capacidad de captación de radicales DPPH de un 50.07% en el orujo de vino blanco y de 1.26% en orujo de vino rosado (Cuadro 12). Sin embargo, los resultados de este estudio fueron menores a lo reportado por Zaky *et al.*, (2020). Las diferencias observadas en los resultados pueden explicarse debido a diferentes factores ambientales, genéticos, prácticas agronómicas o procesos de vinificación donde proviene el orujo analizado (Doshi *et al.*, 2006).

Cuadro 12. Compuestos bioactivos presentes en los hidrolizados de los orujos de uva para vino rosado y vino blanco.

Hidrolizado	Azúcares reductores (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Fenoles totales ^a (g/L)	Flavonoides totales ^b (g/L)	Actividad antioxidante ^c (%)
Orujo de vino rosado	13.61 ± 0.70a	24.24 ± 4.5a	1.64 ± 0.23a	10.45 ± 0.96a	1.26 ± 2.19a
Orujo de vino blanco	13.62 ± 0.45a	19.74 ± 3.0a	3.27 ± 0.21b	7.53 ± 2.54a	50.07 ± 2.96b

Los datos son expresados como valores promedio ± desviación estándar (n = 3).

Medias en la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes (p ≤ 0.05)

^a Fenoles totales: cuantificados como equivalentes de ácido gálico.

^b Flavonoides totales: cuantificados como equivalentes de quercetina.

^c Actividad antioxidante: determinada como la actividad de captación de radicales DPPH

10.4 Efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de etanol empleando los hidrolizados de los residuos vinícolas.

En cada hidrolizado, se evaluó y realizó una cinética de producción de etanol mediante el análisis del consumo de sustrato, generación de biomasa, producción de CO₂, etanol y el cálculo de sus parámetros cinéticos.

10.4.1 Hidrolizados de orujo de vino rosado

Se evaluó el hidrolizado enriquecido con dos distintas fuentes de nitrógeno, nitrato de potasio (KNO₃) y extracto de levadura, al igual que un medio control (15 g/L glucosa, 1.5 g/L nitrato de potasio, 1.5 g/L fosfato monobásico de potasio y 1.5 g/L sulfato de magnesio) (Cuadro 13).

El medio control tuvo una conversión de sustrato de 9.9%, significativamente menor a los medios con hidrolizado (67.28 – 84.58%). Por lo que la producción de biomasa (0.07 g/L), CO₂ (0.10 g/L), etanol (0.53 g/L) y sus respectivos rendimientos, fueron significativamente inferiores.

Cuadro 13. Evaluación de la producción de bioetanol empleando hidrolizados de orujo de vino rosado enriquecido con diferentes fuentes de nitrógeno.

Medio	Azúcares iniciales (g/L)	Azúcares residuales (g/L)	Biomasa (g/L)	CO ₂ (g/L)	Etanol (g/L)	Y _{X/S}	Y _{CO₂/S}	Y _{Etanol/S} ¹	Conversión de sustrato (%)
Control	10.38 ± 0.53b	9.35 ± 0.88c	0.07 ± 0.06a	0.10 ± 0.04a	0.53 ± 0.45a	0.09 ± 0.11a	0.12 ± 0.07a	0.51 ± 0.00	9.90 ± 8.46a
Hidrolizado enriquecido con KNO ₃	9.06 ± 0.68a	2.96 ± 0.00b	4.96 ± 0.18c	0.92 ± 0.05b	3.14 ± 0.04b	0.81 ± 0.03b	0.15 ± 0.01b	0.51 ± 0.00	67.28 ± 0.03b
Hidrolizado enriquecido con extracto de levadura	9.33 ± 0.33a	0.98 ± 0.79a	2.14 ± 0.26b	2.51 ± 0.19c	4.03 ± 0.01c	0.27 ± 0.03a	0.32 ± 0.02c	0.51 ± 0.00	84.58 ± 0.13c

Los datos son expresados como valores promedio ± desviación estándar (n = 3). Medias en la misma columna con letra diferente son significativamente diferentes de acuerdo a la Prueba de Tukey (p≤0.05).

¹ Y_{Etanol/S}: cálculo de rendimiento teórico de producción de etanol.

El hidrolizado enriquecido con KNO₃ inició con 9.06 g/L de azúcares reductores y terminó con 2.96 g/L, obteniendo una conversión de sustrato de 67.28%, significativamente mayor al control. En este medio, la producción de biomasa se destacó por sus altos valores al compararlo con los otros medios, ya que, se produjeron 4.96 g/L de biomasa. La producción de CO₂ (0.92 g/L) y etanol (3.14 g/L) igualmente fueron mayor al control. Este hidrolizado obtuvo el rendimiento más alto de biomasa respecto al sustrato consumido (0.81).

El hidrolizado enriquecido con extracto de levadura obtuvo una conversión de sustrato del 84.58%, mayor a todos los medios evaluados. Este medio se destacó por una alta producción de etanol (4.03 g/L) significativamente mayor al resto de los tratamientos.

Además de los azúcares fermentables, otro componente esencial en la producción de etanol y crecimiento de levaduras es la fuente de nitrógeno, ya que, es un macronutriente importante para mantener el balance carbono-nitrógeno. *S. cerevisiae* puede utilizar fuentes orgánicas, inorgánicas o ambas de nitrógeno. Sin embargo, no todas contribuyen al crecimiento de la misma manera debido a su disponibilidad (Li *et al.*, 2017).

En la evaluación de los hidrolizados de orujo, se observó que el extracto de levadura mejoró el crecimiento y producción de etanol, esto se explica porque a diferencia del KNO₃ el extracto de levadura es una fuente de nitrógeno compleja, ya que, incluye otros nutrientes como vitaminas, péptidos y sales inorgánicas que pueden contribuir en los requerimientos de *S. cerevisiae* y promover su crecimiento (Hakobyan *et al.*, 2012 y Li *et al.*, 2017).

10.4.2 Hidrolizados de orujo de vino blanco

Se evaluó el hidrolizado enriquecido con dos distintas fuentes de nitrógeno, nitrato de potasio (KNO₃) y extracto de Levadura, al igual que dos medios control, uno identificado como “control” (15 g/L glucosa, 1.5 g/L nitrato de potasio, 1.5 g/L fosfato monobásico de potasio y 1.5 g/L sulfato de magnesio) y caldo papa dextrosa (Cuadro 14).

Cuadro 14. Evaluación de la producción de bioetanol empleando hidrolizados de orujo de vino blanco enriquecido con diferentes fuentes de nitrógeno.

Medio	Azúcares iniciales (g/L)	Azúcares residuales (g/L)	Biomasa (g/L)	CO ₂ (g/L)	Etanol (g/L)	Y _{X/S}	Y _{CO₂/S}	Y _{Etanol/S} ²	Conversión de sustrato (%)
Control	7.95 ± 0.02c	5.72 ± 0.33d	0.22 ± 0.07 a	0.3 ± 0.03 a	1.14 ± 0.17a	0.02 ± 0.01a	0.13 ± 0.01a	0.51± 0.00	27.99 ± 4.20a
PDC ¹	10.38 ± 0.15d	0.46 ± 0.15a	1.77 ± 0.17c	3.95 ± 0.00d	5.07 ± 0.08d	0.15 ± 0.05b	0.40 ± 0.01d	0.51± 0.00	95.52 ± 1.48d
Hidrolizado enriquecido con KNO ₃	7.21 ± 0.00b	1.81 ± 0.03 c	1.20 ± 0.11b	1.30 ± 0.04b	2.76 ± 0.02b	0.14 ± 0.02b	0.24 ± 0.01b	0.51± 0.00	74.95 ± 0.47b
Hidrolizado enriquecido con extracto de levadura	6.87 ± 0.12a	0.66 ± 0.05b	1.83 ± 0.22c	1.91 ± 0.11c	3.18 ± 0.02c	0.22 ± 0.03c	0.31 ± 0.02c	0.51± 0.00	90.45 ± 0.71c

Los datos son expresados como valores promedio ± desviación estándar (n = 3). Medias en la misma columna con letra diferente son significativamente diferentes de acuerdo a la Prueba de Tukey (p≤0.05).

¹ PDC: caldo papa dextrosa

² Y_{Etanol/S}: cálculo de rendimiento teórico de producción de etanol.

El medio control tuvo una conversión de sustrato de 27.99%, significativamente menor a los medios con hidrolizado (74.95% y 90.45%) y

PDC (95.52%). Por lo que la producción de biomasa (0.22 g/L), CO₂ (0.3 g/L) y etanol (1.14 g/L) fueron significativamente inferiores. Cabe destacar que se observaron valores mayores al medio control formulado con hidrolizado de orujo de vino rosado.

El hidrolizado enriquecido con KNO₃ inició con 7.21 g/L de azúcares reductores y terminó con 1.81 g/L, que equivale a una conversión de sustrato de 74.95%, mayor al control, lo que se refleja en sus valores de producción de biomasa (1.20 g/L), CO₂ (1.30 g/L) y etanol (2.76 g/L). De igual forma, los valores con este tratamiento fueron mayores a los obtenidos utilizando el hidrolizado de orujo de vino rosado.

El PDC, obtuvo una conversión de sustrato del 95.52%, lo cual se esperaba al ser un medio complejo. Cabe destacar que se obtuvieron valores significativamente mayores al resto de los tratamientos, obteniéndose 5.07 g/L de etanol, 3.95 g/L de CO₂ y su producción de biomasa fue similar a la del hidrolizado enriquecido con extracto de levadura (1.77 g/L).

El hidrolizado enriquecido con extracto de levadura, obtuvo una conversión de sustrato del 90.45%, mayor a la obtenida utilizando el hidrolizado de orujo de vino rosado, también fue mayor al medio control y al hidrolizado enriquecido con KNO₃. La producción de etanol fue de 3.18 g/L y 1.91 g/L de CO₂. A pesar de que es menor al obtenido en PDC, el hidrolizado enriquecido con extracto de levadura inició con menor concentración de azúcares reductores (6.87 g/L) que el PDC (10.38 g/L). En este medio se obtuvo el valor más alto en producción de biomasa (1.83 g/L), valor similar al producido por PDC (1.77 g/L).

En los medios enriquecidos con extracto de levadura, los hidrolizados de orujo de vino blanco y de vino rosado obtuvieron mejores resultados con respecto a los otros medios evaluados. Los hidrolizados con extracto de levadura obtuvieron rendimientos similares de formación de biomasa, etanol y CO₂.

La presencia de compuestos bioactivos en el hidrolizado de ambos orujos, por ejemplo, compuestos fenólicos, son de gran relevancia ya que se ha reportado que algunos microorganismos, particularmente, levaduras, pueden degradar y/o utilizarlos como fuente de carbono y promover su crecimiento (Coulibaly *et al.*, 2020).

Asimismo, se ha reportado que la presencia de aminoácidos (lisina, tirosina, arginina, histidina y fenilalanina) en el orujo de uva, tiene un impacto en el crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* (Fairbairn *et al.*, 2017 y Monteiro *et al.*, 2020).

10.5 Cinéticas de producción de etanol a partir de hidrolizados de orujos de uva

Tras el análisis de los resultados obtenidos en la evaluación de los hidrolizados enriquecidos con distintas fuentes de nitrógeno, se seleccionó el hidrolizado enriquecido con extracto de levadura por haber tenido resultados destacables y así continuar con las evaluaciones subsecuentes.

10.5.1 Hidrolizados de orujo de vino rosado

Se evaluó la cinética de producción de etanol, CO₂, biomasa, consumo de azúcares reductores y cambios de pH a lo largo de 24 horas, los valores obtenidos se presentan en la Figura 25. Como resultado se observó que a partir de las 4 h de fermentación se presentó un consumo acelerado de azúcares reductores y una producción de etanol, llegando a un punto máximo a las 12 h aproximadamente. La biomasa inició su fase exponencial a las 4 h y se mantuvo en la fase estacionaria a partir de las 12 h hasta las 24 h. Es importante mencionar que durante el transcurso del cultivo se observó una disminución en el pH, indicando el consumo de azúcares y la producción de etanol.

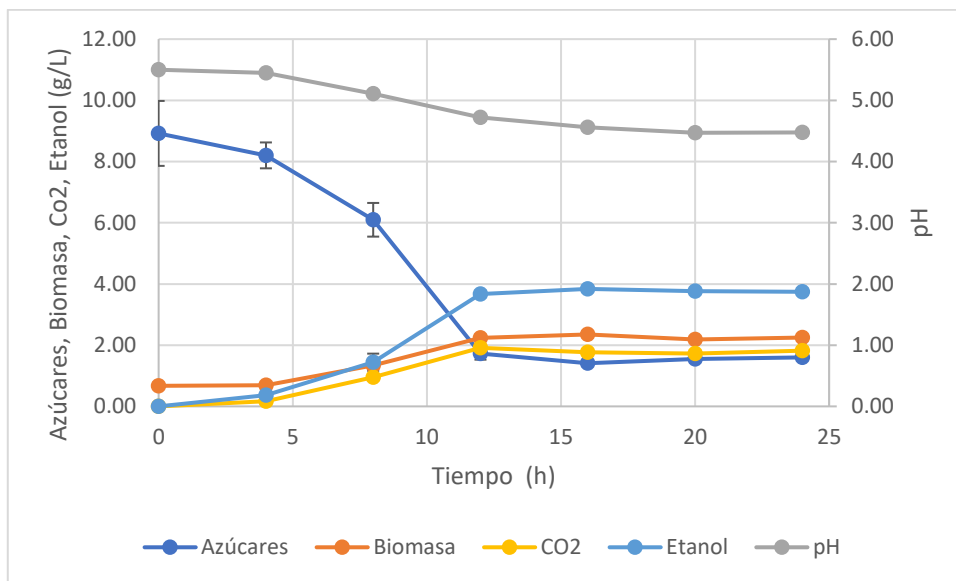


Figura 25. Cinéticas de producción de bioetanol, CO₂, biomasa, consumo de azúcares reductores y cambios de pH empleando el hidrolizado de orujo rosado enriquecido con extracto de levadura a lo largo de 24 h.

Es importante mencionar que se calcularon diferentes parámetros cinéticos involucrados en la producción de bioetanol. Se calculó el rendimiento celular $Y_{X/S}$ (g de células/ g de azúcares consumidos), el rendimiento de formación de CO₂ $Y_{CO_2/S}$ (g de CO₂ / g de azúcares consumidos) y de formación de etanol $Y_{Etanol/S}$ (g de Etanol / g de azúcares consumidos). También se calculó el rendimiento de formación de etanol sobre biomasa generada $Y_{Etanol/X}$ (g de Etanol / g de biomasa) y rendimiento de CO₂ sobre biomasa generada $Y_{CO_2/X}$ (g de CO₂ / g de biomasa), lo cual nos indica la eficiencia de producción del metabolito por biomasa.

Finalmente se calcularon las tasas específicas de consumo de sustrato, de producción de etanol, producción de CO₂ y la tasa específica de crecimiento (Cuadro 15).

Cuadro 15. Parámetros cinéticos en la producción de bioetanol empleando el hidrolizado de orujo rosado enriquecido con extracto de levadura a lo largo de 24 h.

Rendimientos				
$Y_{X/S}$	$Y_{CO_2/S}$	$Y_{Etanol/S}$	$Y_{CO_2/X}$	$Y_{Etanol/X}$
0.22 ± 0.06	0.25 ± 0.01	0.51 ± 0.00	1.33 ± 0.30	2.48 ± 0.66
Tasas específicas				Conversión de sustrato (%)
$q_s (h^{-1})$	$q_{CO_2/X} (h^{-1})$	$q_{Etanol/X} (h^{-1})$	$\mu (h^{-1})$	82.02 ± 0.54
0.72 ± 0.24	0.20 ± 0.04	0.36 ± 0.10	0.1466	

En la producción de bioetanol empleando el medio de hidrolizado de orujo rosado enriquecido con extracto de levadura se obtuvo un $Y_{Etanol/S}$ de 0.51, mayor al $Y_{X/S}$ (0.22) y $Y_{CO_2/S}$ 0.25, lo cual se esperaba al ser la producción de etanol primordial. En esta cinética se observó una alta tasa específica de consumo de sustrato ($0.72 h^{-1}$), en comparación con las tasas de producción de etanol ($0.36 h^{-1}$) y de CO_2 ($0.20 h^{-1}$). Su tasa específica de crecimiento fue de $0.1466 h^{-1}$.

10.5.2 Hidrolizados de orujo de vino blanco

En este estudio se desarrolló la cinética de producción de etanol, CO_2 , biomasa, consumo de azúcares reductores y cambios de pH a lo largo de 24 h con el medio de hidrolizado de orujo blanco enriquecido con extracto de levadura. Los valores obtenidos se presentan en la Figura 26.

Al igual que lo observado en el hidrolizado rosado, a partir de las 4 h hasta las 12 h de fermentación se presentó la fase exponencial del cultivo, que se caracterizó por un consumo acelerado de azúcares reductores y producción de etanol, CO_2 y biomasa.

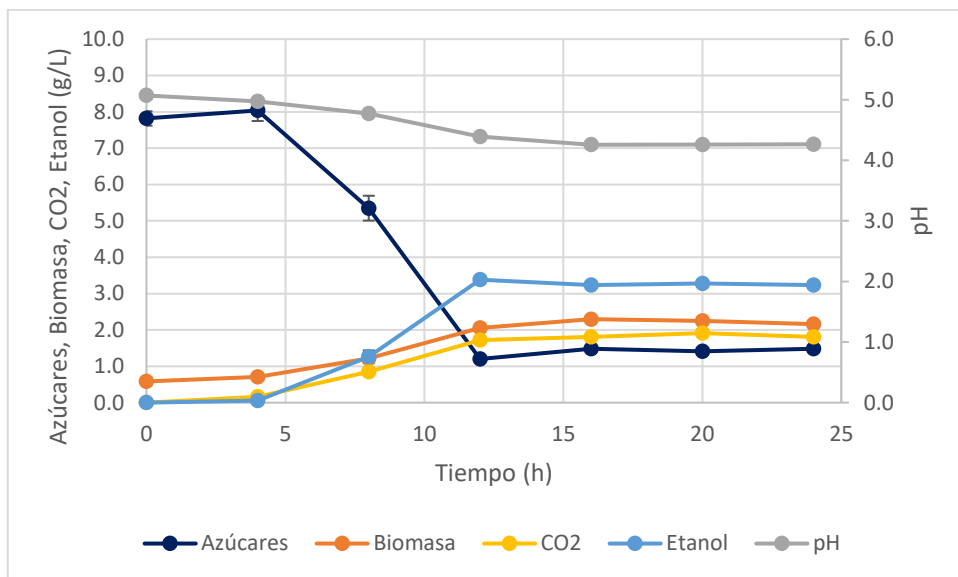


Figura 26. Cinéticas de producción de bioetanol, CO₂, biomasa, consumo de azúcares reductores y cambios de pH empleando el hidrolizado de orujo blanco enriquecido con extracto de levadura a lo largo de 24 h.

En el Cuadro 16 se concentran los resultados de los cálculos de rendimiento de formación de biomasa, formación de CO₂ y formación de etanol por sustrato consumido. Así como los rendimientos de formación de etanol y CO₂ por biomasa generada y las tasas específicas de consumo de sustrato, de producción de etanol, producción de CO₂ y la tasa específica de crecimiento

Cuadro 16. Parámetros cinéticos en la producción de bioetanol empleando el hidrolizado de orujo blanco enriquecido con extracto de levadura a lo largo de 24 h.

Rendimientos				
$Y_{X/S}$	$Y_{CO_2/S}$	$Y_{Etanol/S}$	$Y_{CO_2/X}$	$Y_{Etanol/X}$
0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.00	0.51 ± 0.00	1.15 ± 0.10	2.07 ± 0.20
Tasas específicas				Conversión de sustrato (%)
$q_s (h^{-1})$	$q_{CO_2/X} (h^{-1})$	$q_{Etanol/X} (h^{-1})$	$\mu (h^{-1})$	
0.41 ± 0.04	0.12 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.1015	81.00 ± 0.67

Cabe destacar que el $Y_{\text{Etanol/S}}$ fue de 0.51, igual que en el hidrolizado de orujo rosado. Mientras que los rendimientos El rendimiento de formación de biomasa (0.25) y de CO_2 (0.29) fueron mayores en comparación el hidrolizado de orujo rosado.

En cuanto a las tasas específicas de consumo de sustrato (0.41 h^{-1}), de producción de etanol (0.21 h^{-1}), de CO_2 (0.12 h^{-1}) y la tasa de crecimiento (0.1015 h^{-1}), todos estos parámetros cinéticos fueron menores a los obtenidos con el hidrolizado de orujo rosado.

Los hidrolizados de orujo de vino rosado y de vino blanco tras el método 2 de hidrólisis, la concentración de azúcares reductores no presentó diferencias significativas entre ellas (13.61 y 13.62 g/L); sin embargo, la producción de etanol fue distinta.

Al analizar los parámetros cinéticos, se observó que el hidrolizado de orujo de vino rosado tuvo mejores resultados, obteniendo los valores más altos en la $q_{\text{Etanol/X}}$, μ y en el porcentaje de conversión de sustrato.

Cabe destacar que la concentración de flavonoides en el hidrolizado de orujo de vino rosado fue mayor y se ha demostrado que la quercetina (un flavonol presente en la piel de la uva) puede actuar como modulador de vías de señalización celular relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y la integridad de la pared celular para ejercer efectos protectores contra estrés celular de *S. cerevisiae*, como es el estrés oxidativo (Vilaça *et al.*, 2012)

XI. CONCLUSIONES

En el presente estudio se realizó una caracterización y evaluación de muestras de residuos vinícolas del Valle de Guadalupe, para ser utilizados como materia prima en la producción de bioetanol. Se evaluaron dos métodos de hidrólisis de los orujos, observándose que el método 2 favoreció una mayor concentración de azúcares reductores en los hidrolizados de orujos de vino rosado y blanco (13.61 ± 0.70 y 13.62 ± 0.45 g/L, respectivamente).

Con base en la caracterización fisicoquímica de los orujos se observaron variaciones en la composición másica de los orujos de vino rosado (71% agua, 4% semilla y 26%hollejo) y de vino blanco (76% agua, 4% semilla y 19% hollejos). Así como en el contenido de compuestos bioactivos en los hidrolizados de vino rosado y blanco: fenoles totales (1.64 ± 0.23 y 3.27 ± 0.21 , respectivamente), flavonoides totales (10.45 ± 0.96 y 7.53 ± 2.54 , respectivamente) y actividad antioxidante (1.26 ± 2.19 y 50.07 ± 2.96 , respectivamente).

De acuerdo con los resultados de diseño y evaluación de diferentes medios de cultivo para la producción de bioetanol, se observó que los hidrolizados de orujo de vino rosado y de vino blanco enriquecidos con extracto de levadura obtuvieron mejores resultados en la producción de etanol (4.03 ± 0.01 g/L y 3.18 ± 0.02 g/L) en comparación con los medios con KNO_3 (3.14 ± 0.04 g/L y 2.76 ± 0.02 g/L) y el medio control.

Cabe destacar que con el hidrolizado de orujo de vino rosado se obtuvo una mayor velocidad específica de producción de etanol ($q_{\text{Etanol/X}}=0.36 \pm 0.10 \text{ h}^{-1}$), velocidad de crecimiento ($\mu=0.1466 \text{ h}^{-1}$) y porcentaje de conversión de sustrato ($82.02 \pm 0.54 \%$) en comparación con el orujo de vino blanco ($0.21 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$), (0.1015 h^{-1}) y ($81.00 \pm 0.67 \%$).

Por lo tanto, los resultados de este estudio demuestran que los hidrolizados de orujos de vino rosado y vino blanco pueden ser utilizados como fuente de azúcares para la producción de bioetanol tras someterlos a pretratamientos de hidrólisis.

XII. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en este estudio se visualizan las siguientes áreas de investigación para próximos estudios:

Desarrollar cinéticas de producción de etanol en un biorreactor que permita el control de las condiciones de operación (pH, temperatura, agitación) y la optimización del proceso.

Identificar los azúcares, fenoles y flavonoides presentes en los hidrolizados de orujo de vino rosado y vino blanco a través de métodos cromatográficos, al igual que los productos secundarios de la fermentación.

Realizar la cuantificación del etanol por métodos cromatográficos, ya que, debido a limitaciones de equipos e instrumentos de análisis en este estudio la producción de etanol reportada fue teórica.

Evaluar la producción de etanol con diferentes tipos de levaduras y/o microorganismos modificados genéticamente para incrementar los rendimientos de producción de etanol y evitar la inhibición por producto.

Por último, establecer las bases tecnológicas para la implementación del proceso de producción de bioetanol a una escala piloto, empleando los residuos vinícolas del Valle de Guadalupe como materia prima.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abo, B. O., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., Ma, H., & Wang, Q. (2019). Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Reviews on environmental health*, 34(1), 57–68. <https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0054>
- Agrobit. (2020). Cultivo de uva. Agrobit.com.: http://www.agrobit.com/Documentos/G_2_Microemp%5C431_mi000001uv%5B1%5D.htm
- Aguilar, T., Loyola, C., de Bruijn, J. *et al.* Effect of thermomaceration and enzymatic maceration on phenolic compounds of grape must enriched by grape pomace, vine leaves and canes. *Eur Food Res Technol* 242, 1149–1158 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2619-3>
- Aguirre, A.; Lobato, A.; Muñoz, I y Valenzuela, j. (2001). Propagación de la vid. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina. Boletín Técnico #56, 26p. <http://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/123456789/32145>
- Almanza-Merchán, Pedro & Cely, Pablo & Fischer, Gerhard. (2012). Manual de viticultura tropical. Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia. 119p.
- Andersen, F. E., Moreno, M. S., & Díaz, M. S. (2013). Producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica: estimación dinámica de parámetros con enfoque simultáneo. *Iberoamerican Journal of Industrial Engineering*, 5(10), 219-231.
- Antoni, D., Zverlov, V. V., & Schwarz, W. H. (2007). Biofuels from microbes. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(1), 23–35. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1163-x>
- Arellano Perales, C. (2015). *Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática*. Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana. <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46812/ArellanoPeralesCarla.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Armas Lima, C. I. (2014). *Viticultura y cambio climático*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de la Rioja.
- Ayodele, B. V., Alsaffar, M. A., & Mustapa, S. I. (2019). *An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks*. *Journal of Cleaner Production*, 118857. doi:10.1016/j.jclepro.2019.118857
- Balat, M. B. (2008). Progress in Bioethanol Processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551-573. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2007.11.001>

- Bajpai P. (2013) *Advances in Bioethanol*. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1584-4_84
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T. and Pandey, R. (2010), Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 4: 77-93. <https://doi.org/10.1002/bbb.188>
- Becerra, M., Houssein, K., Grundy Meza, E. E., (2017) *Encallado de injertos de la variedad borgoña en cámara de forzada en dos patrones de VID (Vitis vinífera L.)*. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.. <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/3089>
- Beres, C., Costa, G., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A., Cruz, A., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L., & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste management (New York, N.Y.)*, 68, 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
- Biofuels*. (2012). Biofuels Facts. *BIOFUEL*. <http://biofuel.org.uk/biofuel-facts.html>
- Boullosa, R. (2017). Produccion Nacional: la industria del vino mexicano *El Conocedor*. <http://revistaelconocedor.com/produccion-nacional-la-industria-del-vino-mexicano/>
- Brinchi, L., Cotana, F., Fortunati, E., & Kenny, J. M. (2013). Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications. *Carbohydrate polymers*, 94(1), 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.033>
- Buendía, M. R. P., & Martínez, J. M. M. (2012). Historia del cultivo de la vid y el vino; su expresión en la Biblia. *Revista de la Facultad de Educación de Albacete*, 27, 217-246.
- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., & Šantek, B. (2018). Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food technology and biotechnology*, 56(3), 289–311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>
- Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., & Pérez-Murcia, M. D. (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste management (New York, N.Y.)*, 28(2), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.013>

- Carta Gonzales, J. A., Calero Perez, R., Colmenar Santos, A., & Castro Gil, M. A. (2012). Centrales de Energías Renovables: Generación Eléctrica con Energías Renovables. Madrid: Pearson.
- Castillo-Hernández, P., Mendoza-Domínguez, A., & Caballero-Mata, P.. (2012). Análisis de las propiedades fisicoquímicas de gasolina y diesel mexicanos reformulados con Etanol. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 13(3), 293-306. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432012000300004&lng=es&tlng=es.
- Chiaromonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P. and Cherchi, F. (2012) Review of Pretreatment Processes for Lignocellulosic Ethanol Production, and Development of an Innovative Method. *Biomass and Bioenergy*, 46, 25-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.020>
- Cholewiński, Maciej & Pospolita, Wojciech & Jesionek, Krzysztof. (2017). The Application of Grape Pomace as a Solid Biofuel in Combustion Technologies. 10.26649/musci.2017.070.
- Código Internacional de Prácticas Enológicas. (2016). Vinos: Definición. Ficha Código OIV. Edición 01/2016.: <http://www.oiv.int/public/medias/3752/f-code-i-31es.pdf>
- Cofradía del Vino de Mexicali. (2020). Semblanza de la región vitivinícola de Baja California, México.: http://www.cofradiadelvino.com.mx/vino_de_bc.php
- Consejo Mexicano Vitivinícola. (2018). Plan Rector 2018. Comité Nacional del Sistema Producto Producto Vid. https://uvayvino.org.mx/docs/plan_rector_2018.pdf
- Coulibaly, W. H., Jean-Paul Bouatenin, K. M., Boli, Z., Kohi Alfred, K., Tra Bi, Y. C., Cellaire N'sa, K. M., Cot, M., Djameh, C., & Djè, K. M. (2020). Influence of yeasts on bioactive compounds content of traditional sorghum beer (tchapalo) produced in Côte d'Ivoire. *Current research in food science*, 3, 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.06.001>
- Cuervo, L., Folch, J. L., & Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11-25. <http://www.researchgate.net/publication/266610846>
- Dacosta, O & Vazquez, H.J. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de la energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*(8), 249-259. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432007000400004&lng=es&tlng=es.
- Díez, C. B. (2013). *Obtención de Bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con Pichia stipitis.*

Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
<https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/4556/TEISIS501-140301.pdf;jsessionid=D86E4460A41DF3850B38A24B2C106C86?sequence=1>

- Doshi, P., P. Adsule, and K. Banerjee. 2006. Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv. Kishmish Chorny (Sharad Seedless) during maturation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41:1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01214.x>
- Du, B., Song, Y., Hu, X., Liao, X., Ni, Y. & Li, Q. (2011). Oligosaccharides prepared by acid hydrolysis of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata*) pulp and their prebiotic activities. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 982– 987. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02580.x>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Egüés, I., Serrano, L., Amendola, D., De Faveri, D. M., Spigno, G., & Labidi, J. (2013). Fermentable sugars recovery from grape stalks for bioethanol production. *Renewable Energy*, 60, 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.06.006>
- Energías Renovables (2018). La producción de bioetanol en Europa creció. *RENEWABLE ENERGY MAGAZINE* <https://www.energias-renovables.com/biocarburantes/la-produccion-de-bioetanol-en-europa-crecio-20150717>
- Energy Information Administration of United States of America. (2020) <https://www.eia.gov/>
- Evcan, E., Tari, C., & Özen, B. (2012). Bioethanol production from low cost agro-industrial waste products. *New Biotechnology*, (29), S40.
- Faba, L., Díaz, E., & Ordóñez, S. (2014). Transformación de biomasa en biocombustibles de segunda generación. *Madera y bosques*, 20(3), 11-24. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712014000300002&lng=es&tlng=es
- Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H. T., Ferreira, A. C., & Bauer, F. F. (2017). The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Frontiers in microbiology*, 8, 2554. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02554>
- FAO. (2009). Bases de datos FAOLEX. <http://www.fao.org/faolex/results/details/es/?details=LEX-FAOC088319>

- Fernandes L, Casal S, Cruz R, Pereira JA, Ramalhosa E. (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International* 50:161–6.
- FLANZY, C. (2000). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. A. Madrid Vicente, Ediciones; Ediciones Mundi-Prensa. 783 p.
- Fondo Vitivinícola (2009). *La cultura de la vid y el vino*. Fondo vitivinícola de Mendoza. Argentina. 193 pp.
- FREGONI, M. 2007. Viticultura y cambio climático. *Revista Enología*. 2, 1-9.
- García-Lomillo, J., & González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of wine pomace in the food industry: approaches and functions. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(1), 3-22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238>
- Gazzola, D., Vincenzi, S., Gastaldon, L., Tolin, S., Pasini, G., & Curioni, A. (2014). The proteins of the grape (*Vitis vinifera* L.) seed endosperm: fractionation and identification of the major components. *Food chemistry*, 155, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.032>
- González-Centeno MR, Rossello´ C, Simal S, Garau MC, Lopez F, Femenia A. 2010. Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT – Food Sci Technol* 43:1580–6.
- Curdo, N. (2016). *Mejoramiento de la levadura Saccharomyces cerevisiae Y138 por ingeniería evolutiva para la producción de bioetanol de segunda generación*. Tesis de Licenciatura. Institutos de Investigaciones Biotecnológicas. 107 pp.
- H., I. (2003). Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology*(103), 273-280.
- Hakobyan, L., Gabrielyan, L., & Trchounian, A. (2012). Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by Rhodobacter sphaeroides strains from mineral springs. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(8), 6519–6526. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.077>
- Hamman, R. Jr., Savage, S., & Larsen, H. (1998). *The Colorado grape growers' guide*. Colorado State University. <http://www.ext.colostate.edu/pubs/garden/550a.pdf>
- Hidalgo, L. & Hidalgo, J. (2011). *Tratado de viticultura*. Madrid: Mundi Prensa.
- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes

for biofuels production. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5813), 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>

Hogervorst J. C., Miljić U., & Puškaš, V. (2017). Extraction of bioactive compounds from grape processing by-products. In Charis M. Galanakis (Eds.), *Grape Processing By-Products* (pp105-135). *Handbook of Academic Press*. ISBN 9780128098707 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00005-3>

Ibeto, C. N., Ofoefule, A. U., & Agbo, K. E. (2011). A global overview of biomass potentials for bioethanol production; A renewable alternative fuel. *Trends in Applied Sciences Research*, 410-425.

InfoAGro. (2018). Mexico abrira la primera planta de biorefineria de etanol. *INFOAGRO*. <http://infoagro.com/mexico/mexico-abrira-la-primera-planta-de-biorefineria-de-etanol-con-una-inversion-de-100-millones-de-dolares/>

Instituto Mexicano del Petróleo. (2017). Bioetanol. *Reporte de Inteligencia Tecnológica*. Disponible en [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/296708/IT Bioetanol 01022 018.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/296708/IT_Bioetanol_01022_018.pdf)

International Organisation of Vine and Wine. (2019). 2019 Statistical Report n World Vitiviniculture. <http://www.oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf>

Jackson, R. S. (2014). *Wine Science: Principles and Applications*. Academic Press. Fourth Edition. Academic Press. United States of America.

Jaworska, M., & Vogt, O. (2013). Sorbitol and cellulose derivatives as gelling agents. *Chemik*, 67(3), 242-249.

Jeffries, T. G. (2007). Genome sequence of the lignocellulosic- bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Natura Biotechnology*(25), 319-326.

Jornada, L. (2017). Impulsan construccion de 10 plantas de etanol en México. *Vanguardia MX*. <https://www.vanguardia.com.mx/articulo/impulsan-construccion-de-10-plantas-de-etanol-en-mexico>

Karagöz, P., Rocha, I. V., Özkan, M., & Angelidaki, I. (2012). Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation. *Bioresource technology*, 104, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.075>

Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(13), 3713–3717. <https://doi.org/10.1021/jf020071c>

- Kim, Y. K., Guo, Q., & Packer, L. (2002). Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology*, 172(2), 149–156. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00585-6](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00585-6)
- Lapornik, Brigita & Prošek, Mirko & Wondra, Alenka. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036>
- Li, Z., Wang, D., & Shi, Y.-C. (2017). Effects of nitrogen source on ethanol production in very high gravity fermentation of corn starch. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 70, 229–235. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jtice.2016.10.055>
- Liu, C.-G., Li, K., Wen, Y., Geng, B.-Y., Liu, Q., & Lin, Y.-H. (2019). *Bioethanol: New opportunities for an ancient product*. *Advances in Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2018.12.002>
- Logan, T. (2015) Grape Pomace Biofuel Production. Stanford. <http://large.stanford.edu/courses/2015/ph240/logan2/>
- López González, L. M., Pereda Reyes, I., Escobar Román, R., Pedraza Garciga, J., & Romero Romero, O. (2018). Efecto de la aplicación de métodos de pre-tratamientos en el proceso de digestión anaerobia de la biomasa lignocelulósica. *Tecnología Química*, 38(2), 324-334.
- López Oyanedel, D. P. (2019). Sacarificación y fermentación simultánea de orujo de uva tinto para producción de bioetanol de segunda generación. Tesis de Licenciatura. Universidad Técnica Federico Santa María. <https://hdl.handle.net/11673/46948>
- Luo, X., Liu, J., Zheng, P. *et al.* Promoting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by inexpensive soy protein. *Biotechnol Biofuels* 12, 51 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1387-x>
- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., & Guimarães, V. M. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, 1, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>
- Marques, S., Moreno, A. D., Ballesteros, M., & Gírio, F. (2017). Starch Biomass for Biofuels, Biomaterials, and Chemicals. *Biomass and Green Chemistry*, 69–94. doi:10.1007/978-3-319-66736-2_4
- Martinez, G.A., Rbecchi, S., Decorti, D., Domingos, J.M.B., Natolino, A., Del Rio, D., Bertin, L., Da Porto, C., Fava, F., (2016). Towards multi-purpose biorefinery platforms for the valorisation of red grape pomace: production of polyphenols, volatile fatty acids, polyhydroxyalkanoates and biogas. *Green Chem.* 18, 261–270. <http://dx.doi.org/10.1039/c5gc01558h>.

- Martins, Fernanda & Lacava, Pedro & Andrade, Claudia & Garzuzi, Sandra. (2016). Alternative Fuels: A Review About Anhydrous and Hydrous Ethanol Properties. *SAE International*. <https://doi.org/10.4271/2016-36-0409>
- Mason, J., Aizhu, C., & Gu, H., (2017). China sets 2020 target for nationwide ethanol use to cut corn stocks. *REUTERS*. <https://www.reuters.com/article/us-china-biofuels-idUKKCN1BO03R>
- McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., & Voigt, M. M. (1996). Neolithic resinated wine. *Nature*, 381(6582), 480–481. <https://doi.org/10.1038/381480a0>
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., & Younblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: Structure properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40, 3941–3994.
- Morales de la Rosa, S. (2015). Hidrolisis acida de celulosa y biomasa lignocelulosica asistida con liquidos ionicos. Tesis Doctoral. Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Madrid:
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicilic acidreagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428
- Mohanty, S. K., & Swain, M. R. (2019). Bioethanol production from corn and wheat: food, fuel, and future. In *Bioethanol production from food crops* (pp. 45-59). Academic Press.
- Monteiro, G. C., Minatel, I. O., Junior, A. P., Gomez-Gomez, H. A., de Camargo, J. P. C., Diamante, M. S., Pereira Lima, G. P. (2020). Bioactive compounds and antioxidant capacity of grape pomace flours. *LWT*, 110053. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110053>
- Morales, H. F. (2014). *Produccion de Bioetanol a Partir de Material Lignocelulosico de Moringa Oleifera*. Bogota: Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/51322>
- Negro, C., Tommasi, L., & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87(1), 41–44. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00202-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00202-X)
- Nigam, P.S., Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.* 37, 52–68.
- Ohgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M. F., Galbe, M., Hahn-Hägerdal, B., & Zacchi, G. (2006). Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of biotechnology*, 126(4), 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.001>

Ojeda, K., Ávila, O., Suárez, J., Kafarov, V., 2011. Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production – Part 1. *Chem. Eng. Res. Des.* 89, 270–279.

Organización Internacional Vinícola. (2019) Estadísticas y Datos. Disponible en: <http://www.oiv.int/es/statistiques/recherche>

Binod, P., Janu, K. U., Sindhu, R., & Pandey, A. (2011). Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In *Biofuels* (pp. 229-250). Academic Press.

Pejo, E. (2009). *“Bioetanol de paja de trigo: Estrategias de integracion de las etapas del proceso”*. Tesis Doctoral Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

Perez, F. C. (2012). Biocarburantes, Presente Y Futuro: Claves de la sostenibilidad. Tesis de Maestría. Universidad de Sevilla.: http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/70410/fichero/TFM_MTQA_FCP.pdf

Perez, J. P. (2019). *Evaluacion de la funcionalidad de hidroizados provenientes de residuos vinicolas de Baja California*.

Perez, M. A. (2014). Estado del Arte de la Produccion de Biocombustibles avanzados en la Union Europea. Sevilla: Universidad de Sevilla. [Producción de biocombustibles avanzados en la unión europea](#)

Pedroza, M. A., Salinas, M. R., Alonso, G. L., & Zalacain, A. (2017). Oenological Applications of Winemaking By-Products. *Handbook of Grape Processing By-Products*, 215–232. doi:10.1016/b978-0-12-809870-7.00009-0

Prinsen, P. (2010). *Composicion quimica de diversos materiales lignocelulosicos de interes industrial y analisis estructural de sus ligninas*. Sevilla: Consejo Superior de Investigaciones Cientificas.

Putri, F., Silalahi, M. D., & Rinanti, A. (2018). *Starch producing in microalga biomass as a raw material for bioethanol*. MATEC Web of Conferences, 197, 13018. doi:10.1051/mateconf/20181971301

RFA. (2020). Annual World Fuel Ethanol Production (Mil.Gal.). Markets & Statistics. <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>

Rosa, S. M. (2015). *Hidrolisis acida de celulosa y biomasa lignocelulosica asistida con líquidos iónicos*. Tesis Doctorado. Universidad Autonoma de Madrid. [https://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales de la rosa silvia.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales_de_la_rosa_silvia.pdf)

Rubin E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), 841–845. <https://doi.org/10.1038/nature07190>

- Saini, J.K., Saini, R. & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech* 5, 337–353
<https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>
- SAGARPA. (2017) Impulsa SAGARPA producción de biocombustibles en México. Gobierno de México.<https://www.gob.mx/agricultura/prensa/impulsa-sagarpa-produccion-de-biocombustibles-en-mexico>
- SAGARPA. (2017). Uva Mexicana. Planeación agrícola 2017-2030. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257085/Potencial-Uva.pdf>
- Sanchez, O., & Cardona, C. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Biosource Technology*, 99, 5270-5295.
- Secretaria de Energia. (2018). Permisos de producción de bioenergéticos abril del 2018. Gobierno de México.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/313920/PERMISOS_DE_PRODUCION_03.04.18.pdf
- Serrano-Ruiz, R. L. (2011). Biocombustibles líquidos: procesos y tecnologías. *Química y Medio Ambiente*, 4(107), 383-389.
- Siegmeier, T., Blumenstein, B., & Möller, D. (2019). *Bioenergy Production and Organic Agriculture*. *Organic Farming*, 331–359. doi:10.1016/b978-0-12-813272-2.00012-4
- Sikarwar, V. S., Zhao, M., Fennell, P. S., Shah, N., & Anthony, E. J. (2017). Progress in biofuel production from gasification. *Progress in Energy and Combustion Science*, 61, 189-248. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2017.04.001>
- Singh, J. K., Vyas, P., Dubey, A., Upadhyaya, C. P., Kothari, R., Tyagi, V. V., & Kumar, A. (2018). Assessment of different pretreatment technologies for efficient bioconversion of lignocellulose to ethanol. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 10, 350–371. <https://doi.org/10.2741/S521>
- Soccol, C. R., Faraco, V., Karp, S. G., Vandenberghe, L. P., Thomaz-Soccol, V., Woiciechowski, A. L., & Pandey, A. (2019). Lignocellulosic bioethanol: current status and future perspectives. In *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels* (pp. 331-354). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00005-X>
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1–11.
[https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00212-7)

- Tzintzun-Camacho, O., Sánchez-Segura, L., Minchaca-Acosta, A.Z., Rosales-Colunga, L.M., Hernández-Orihuela, A., and Martínez-Antonio, A. 2016. Development of bacterial culture medium from avocado seed waste. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15:831-842. <http://rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/1046>.
- Tejeda, Lesly, Quintana, Julio, Pérez, Jairo, & Young, Harold. (2011). Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1), 111-116. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262011000100014&lng=en&tlng=es.
- Thiruvengadathan, Thirumalai Nambi, (2017) "Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* Cultivated In Sugarcorn Juice". Electronic Thesis and Dissertation Repository. 4645. Tesis de Maestria. Western University <https://ir.lib.uwo.ca/etd/4645>
- USDA. (2020). Plants Database. Natural Resources Conservation Service. United States Department of Agriculture. <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VIV15>
- Venkitasamy, C., Zhao, L., Zhang, R., & Pan, Z. (2019). Grapes. Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products, 133–163. doi:10.1016/b978-0-12-814138-0.00006-x
- Vilaça, R., Mendes, V., Mendes, M. V., Carreto, L., Amorim, M. A., de Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N., & Costa, V. (2012). Quercetin protects *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative stress by inducing trehalose biosynthesis and the cell wall integrity pathway. *PloS one*, 7(9), e45494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045494>
- Vinitodo. (2014). Introducción al Mundo del Vino. *VINITODO*. <http://vinitodo.com/wp-content/uploads/2014/04/Introducción-al-Mundo-del-Vino.pdf>
- Volynets, B., Ein-Mozaffari, F., & Dahman, Y. (2017). Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Processing and Synthesis*, 6(1), 1-22
- Walker, G. M. (2010). *Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol*. London: Ventus Publishing.
- Warrand, J. & Janssen, H.-G. (2007). Controlled production of oligosaccharides from amylose by acid-hydrolysis under microwave treatment: comparison with conventional heating. *Carbohydrate Polymers*, 69, 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.10.021>

- Zaky, Ahmed A. & Mohsen, El-Faham & Ashour, M & Asiamah, Ebenezer & Ashour, El-Faham & Sharaf, Ashraf. (2020). Utilization of grape pomace extract as a source of natural antioxidant in biscuits.
- Zamora-Hernández, Teresa & Prado-Fuentes, Adriana & Tafur, Jacqueline & Barrera-Figueroa, Blanca & Peña-Castro, Julián. (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educación Química*. 25. 122-127. [http://dx.doi.org/10.1016/S0187-893X\(14\)70534-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0187-893X(14)70534-8)
- Zavrel, M., Bross, D., Funke, M., Büchs, J., & Spiess, A. C. (2009). High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-)cellulose. *Bioresource technology*, 100(9), 2580–2587. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.052>
- Zheng, Y., Shi, J., Tu, M., & Cheng, Y.-S. (2017). *Principles and Development of Lignocellulosic Biomass Pretreatment for Biofuels*. *Advances in Bioenergy*, 1–68. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2017.03.001>
- Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y. S., Simmons, C. W., Zhang, R., Jenkins, B. M., & VanderGheynst, J. S. (2012). Ensilage and bioconversion of grape pomace into fuel ethanol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(44), 11128–11134. <https://doi.org/10.1021/jf303509v>
- Zhishen J., Mengcheng T. y Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64: 555-559.
- Zhou, X., Li, W., Mabon, R., & Broadbelt, L. J. (2016). *A Critical Review on Hemicellulose Pyrolysis*. *Energy Technology*, 5(1), 52–79. doi:10.1002/ente.201600327