



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE
SALVADO DE TRIGO. EFECTO DE DIFERENTES
PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A

BRENDA YAZMÍN MEDRANO BUENROSTRO



MÉXICO, D.F.



2010

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Raúl Genaro Aguilar Caballero

Vocal: Armando Conca Torres

Secretario: Jorge Arturo Aburto Anell

1er. suplente: Ismael Bustos Jaimes

2° suplente: Francisco Ruíz Terán

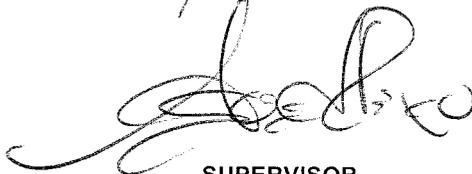
Sitio donde se desarrollo el tema:

INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO



ASESOR

Jorge Arturo Aburto Anell



SUPERVISOR

Agustín Reyó Herrera



SUSTENTANTE

Brenda Yazmín Medrano Buenrostro

A DR. JORGE A. ABURTO ANELL

A MI FAMILIA

A MI JURADO

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	4
1.1 Biocombustibles.....	4
1.2 Bioetanol.....	5
1.3 Obtención de bioetanol a partir de materia lignocelulósico.....	7
1.4 Etanol en el mundo.....	10
1.5 Perspectiva de etanol en México.....	12
1.6 El trigo.....	14
1.7 Obtención de bioetanol a partir de salvado de trigo.....	17
1.8 OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
1.8.1 Objetivo general.....	27
1.8.2 Objetivos específico.....	27
1.8.3 Hipótesis.....	28
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
2.1 Diagrama.....	29
2.2 Metodología descriptiva.....	30
2.2.1 Operación de lavado del salvado de trigo.....	30
2.2.2 Pretratamiento.....	36
2.2.3 Sacarificación del salvado de trigo.....	39
2.2.4 Obtención de etanol por fermentación de jarabes obtenidos.....	42

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	46
3.1 Lavado.....	46
3.2 Pretratamientos.....	48
3.3 Sacarificación.....	54
3.4 Fermentación.....	64
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74

RESUMEN

En la actualidad, se está intentando reemplazar parcialmente a los combustibles fósiles para reducir las emisiones de gases y disminuir así el calentamiento global. Por ello, se ha fomentado el uso de biocombustibles con el fin de reducir el problema de contaminación en el mundo. Sin embargo, la viabilidad de un combustible depende de varios factores, tales como proveer de una ganancia neta de energía, tener beneficios ambientales, resultar económicamente competitivo y no afectar el abastecimiento de alimentos. De esta forma, el reto de la producción de biocombustibles es, precisamente, cumplir con estas exigencias. Para ello, en la actualidad se ha fomentado la tecnología de etanol de segunda generación, la cual se refiere a la accesibilidad del material lignocelulósico mediante agentes de hidrólisis que permitan incrementar el rendimiento en azúcares reductores susceptibles de fermentación alcohólica.

En este trabajo se evaluó el efecto de tres tipos de pretratamientos químicos del salvado de trigo con la finalidad de aumentar la accesibilidad del material (celulosa, hemicelulosa y lignina) a una posterior sacarificación ácida y que permita el aumento de la cantidad de azúcares fermentables para su posterior conversión a etanol. De los resultados obtenidos, el pretratamiento químico ácido diluido fue el que produjo un mayor número de azúcares reductores ($0.3020 \text{ g}_{\text{AR}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$). Así, los azúcares reductores obtenidos en los jarabes sacarificados aumentaron en el orden del pretratamiento utilizado, organosolv <

Alcalino/peróxido < Lavado < ácido. Sin embargo, la fermentación de los azúcares generados en el pretratamiento ácido diluido sólo permitió obtener 48.2% de rendimiento de etanol con respecto al teórico. El resultado puede deberse a la generación de derivados de furfural durante el pretratamiento y sacarificación. En efecto, la formación de subproductos indeseables, como el furfural y 5-hidroximetil furfural (HMF), inhiben el crecimiento de la levadura, y en consecuencia se produce un efecto inhibitorio en la capacidad fermentativa del microorganismo (Martínez *et. al*, 2000). El etanol producido por gramo de AR (azúcares reductores) aumentó en el orden del pretratamiento ácido < alcalino/peróxido < organosolv < lavado. Éste último permitió obtener un rendimiento del 100% de etanol producido a partir de los azúcares fermentables disponibles en el jarabe sacarificado.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Biocombustibles

El uso de biocombustibles fue impulsado con mayor brío en el mundo a partir del establecimiento del Protocolo de Kioto. Diversos estudios han demostrado que los biocombustibles emiten entre el 40% y 80% de gases de efecto invernadero en comparación con los combustibles fósiles (Comisión Europea, 2000). Otras de las principales razones de fomentar el uso de biocombustibles son la reactivación de la agricultura, la reducción de la dependencia de combustibles fósiles y la reducción de contaminantes locales (Gómez *et al.* 2008).

Se entiende por Biocombustible la materia (sólido, líquido y gas) de origen biológico que puede ser utilizada en la generación de energía y calor, y que a diferencia de los combustibles fósiles, son considerados como energía renovable. Los biocombustibles pueden clasificarse en función de su origen, el cual puede ser de: cultivos energéticos, de cultivos agrícolas, de tratamientos silvícolas, de industrias forestales, de industrias agroalimentarias, de industrias agro-alimentarias y restos de actividades humanas. También se clasifican según su apariencia física como son: sólido, líquido y gas (Camps y Marcos, 2008). A partir de la biomasa se obtienen biocombustibles que se catalogan de primera y segunda generación. Los biocombustibles de primera generación corresponden a los que se han producido a mayor escala mediante tecnología convencional por la simplicidad de su obtención y por su relativo bajo costo;

pero su principal desventaja es que se obtienen a partir de cultivos alimentarios. En los últimos años, se han fomentado técnicas para poder producir biocombustibles de segunda generación que se obtienen a partir de materiales lignocelulósicos. Sin embargo, no han alcanzado aun tanto auge económico como los de primera generación debido a sus altos costos. Se espera que en un futuro inmediato el avance tecnológico permita que los combustibles de segunda generación sean más viables y competitivos (FAO, 2008).

1.2 Bioetanol

La demanda global de energía sigue aumentando debido a la rápida expansión de la población humana y el aumento de la prosperidad industrial de los países en desarrollo. La utilización de combustibles fósiles a partir de el siglo pasado y los años siguientes ha incrementado drásticamente el nivel de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera de la Tierra (Ballesteros et al., 2006). Estos hechos junto con el inevitable agotamiento del suministro de energía del mundo, y la inestabilidad del mercado del petróleo han renovado el interés de la sociedad en la búsqueda de combustibles alternativos. El bioetanol ha sido considerado como una alternativa a los combustibles fósiles, al fin de aliviar la presión sobre los suministros de petróleo y de la carga ambiental de la quema de combustibles fósiles, así como ayudar a revitalizar las economías rurales y aumentar la seguridad energética nacional. En la actualidad, el bioetanol es el biocombustible más dominante y su producción mundial mostró una tendencia

al alza durante los últimos 25 años. Con un fuerte aumento desde el 2000, la capacidad de producción mundial en 2005 y 2006 fueron 45 y 49 mil millones de litros por año, respectivamente. Se prevé que la producción total en 2015 puede llegar a más de 115 mil millones de litros (Licht, 2006). El bioetanol puede producirse a partir de materias primas que contienen azúcares fermentables como la caña de azúcar y la remolacha que son ricas en sacarosa. Además, el etanol también puede ser producido a partir de algunos polisacáridos que pueden ser hidrolizados para la obtención de azúcares convertibles en alcohol etílico, como el almidón. Por otra parte, la biomasa lignocelulósica es la materia prima más prometedora para la producción de dicho combustible ya que se obtienen a partir de cultivos energéticos, madera y residuos agrícolas, los cuales representan la fuente mundial más abundante de la biomasa renovable (Lin y Tanaka, 2006). Entre los residuos agrícolas, la paja de trigo es la materia prima más grande de biomasa en Europa y el segundo más grande del mundo después de la paja de arroz (Kim y Dale, 2004). Alrededor de un 21% de los alimentos en el mundo depende de la cosecha de trigo y su producción mundial debe ser aumentada para satisfacer la creciente demanda de consumo humano (Ortiz et al., 2008). Considerando lo anterior, la paja del trigo serviría como una materia prima potencial para la producción de etanol en el siglo 21.

1.3 Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos

La utilización de biomasa lignocelulósica, constituidos por celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 1), ofrece un gran potencial como fuente de biomasa para la producción de etanol. No obstante, su uso todavía requiere un análisis en profundidad, ya que en la actualidad no es una tecnología suficientemente viable. Debido a la composición de la biomasa, su hidrólisis resulta ser una dificultad técnica, ya que requiere de un tratamiento previo que consiste en la eliminación de la lignina, la hidrólisis parcial o total de la hemicelulosa y la disminución de la fracción cristalina de la celulosa en relación con la celulosa amorfa.

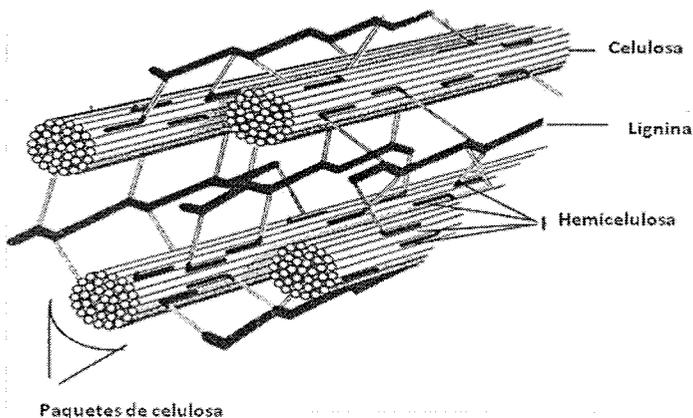


Figura 1. Estructura de la biomasa lignocelulósica (Mc Murphy, 2002).

La celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa lignocelulósica, es un polímero de alto peso molecular lineal de β -1,4 unidades de glucosa (Figura 2), y debido a su conformación estructural, se agrupa en estructuras superiores de gran cristalinidad (Fan et al., 1982), lo que dificulta su hidrólisis y conversión a azúcares fermentables. Sin embargo, una vez que se producen los azúcares simples, éstos pueden fermentarse sin dificultad. La celulosa puede ser hidrolizada a etanol mediante procesos ácidos o enzimáticos (Cardona y Sánchez, 2007). En lo que respecta a la hemicelulosa, ésta fracción está formada por polímeros de azúcares de cinco átomos de carbono ramificados que consiste principalmente en la pentosa xilosa y arabinosa, y las hexosas manosa, glucosa, galactosa y ácidos urónicos (Saka, 1991). La hemicelulosa es fácilmente hidrolizable ya que no presenta estructura cristalina; sin embargo, la xilosa es un azúcar que no es fermentado a etanol por las levaduras tradicionales, resultando una dificultad técnica y económica para la producción de etanol. La última fracción es la lignina, un polímero tridimensional de unidades de fenilpropano ligadas por enlaces éster y C-C (Figura 3), que al asociarse con la celulosa constituyen una verdadera barrera física a la penetración de los enzimas y agentes hidrolizantes, por lo que es necesario eliminar la lignina (Abril y Abril, 2009).

En consecuencia, las tecnologías que se requieren para dicho proceso son más complejas, lo que eleva el costo de producción de etanol en comparación con la caña, remolacha o maíz. Sin embargo, existen enormes posibilidades para la producción de etanol a gran escala, así como su consumo mundial como un

combustible renovable debido a que muchos de los materiales lignocelulósicos son subproductos de las actividades agrícolas, residuos industriales o residuos domésticos. Así, se considera que la biomasa lignocelulósica se convertirá en la principal materia prima para la producción de etanol en el futuro próximo.

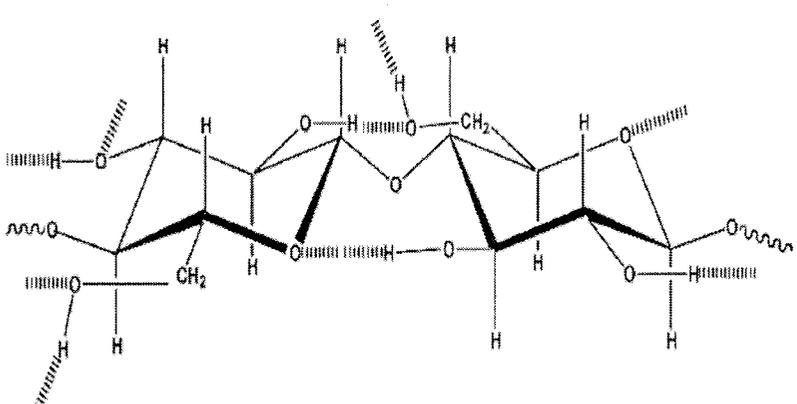


Figura 2. Unidad estructural de celulosa (Mohan *et al*, 2006).

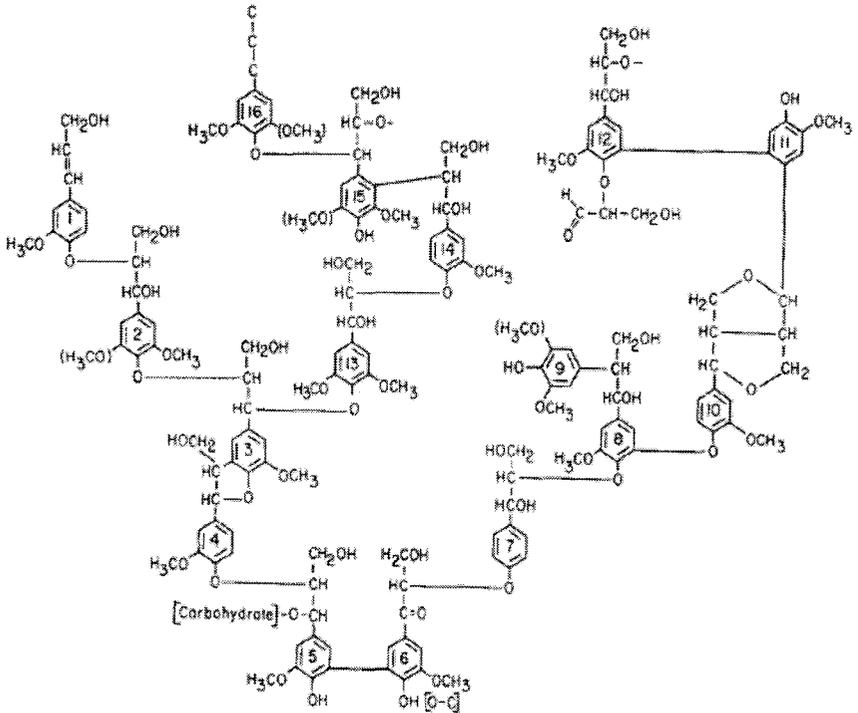


Figura 3. Estructura de la Lignina (Adler, 1976).

1.4 Etanol en el mundo

Con los niveles sin precedentes que están alcanzando los precios del petróleo crudo, crecen las perspectivas mundiales para el etanol usado como combustible automotor. El panorama de productores cuenta con dos agentes en un casi duopolio: Brasil y Estados Unidos. Le siguen muy de lejos China, la UE e India. Brasil y E.E.U.U., juntos producen más del 70% de estos combustibles,

siendo también los mayores consumidores. Estados Unidos y Brasil, cuentan en efecto con proporciones casi iguales del mercado mundial. Brasil ha estado en el liderazgo por años, aunque en 2006 E.E.U.U le ha sobrepasado, con una producción estimada en cerca de 18,4 billones de litros de etanol contra 17 de Brasil (Figura 4).

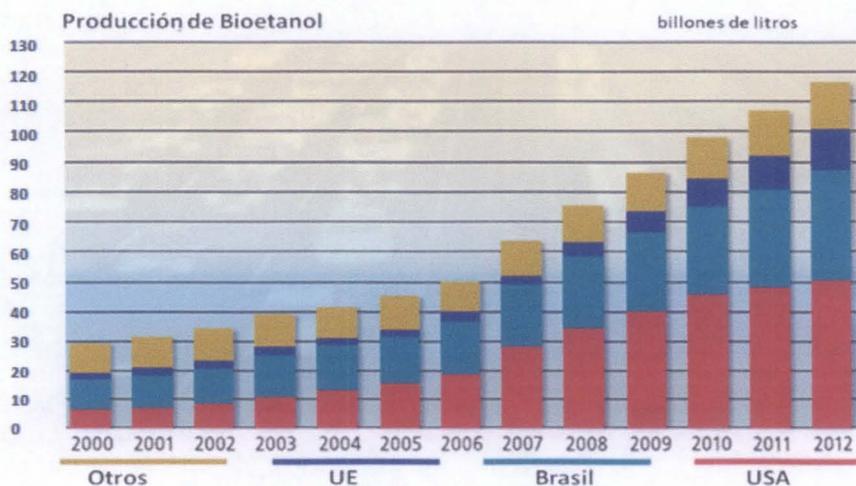


Figura 4. Producción y previsiones de producción de etanol para 2008/2012 sobre la base de las capacidades de producción y los objetivos en los principales países productores a nivel mundial (UNICA, 2008).

1.5 Perspectiva de etanol en México

México posee una sociedad de consumo y de creciente expansión. Hoy en día, donde el consumo de energía es inevitable, es importante analizar la dependencia que tenemos principalmente del petróleo y del gas natural, en nuestro consumo energético. Con el objetivo de reducir los riesgos inherentes al alto consumo de dichos combustibles fósiles, se busca diversificar la matriz energética incluyendo una mayor participación de fuentes renovables y usando de manera óptima las fuentes de energía y combustibles, como por ejemplo los biocombustibles. En nuestro país ha tomado relevancia la introducción del etanol como combustible automotor, el cual generaría beneficios tales como creación de empleo, desarrollo de la economía rural, ampliación de las infraestructuras sociales en zonas rurales, mejora de la seguridad energética, conservación de los recursos petrolíferos, mejor gestión del agua, expansión de la agricultura a tierras más secas, ahorro en los intercambios exteriores, motivación de la comunidad científica y tecnológica, incentivos a la industria de bienes de producción, mejora del medio ambiente local y global. En la figura 5 muestra el plan de desarrollo de Bioetanol que tiene México en los siguientes años (SENER, 2005).

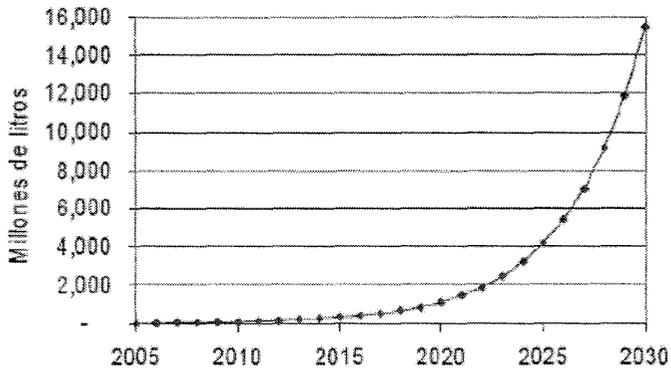


Figura 5. Plan de desarrollo de Bioetanol en México

México presenta suficientes condiciones para considerar seriamente la progresiva introducción de etanol anhidro combustible en su matriz energética. Entre los principales usos del etanol está la preparación de carburantes para vehículos automotores. El etanol permite un aumento del índice de octano, y por lo tanto, la reducción del consumo y reducción de la contaminación (10 a 15 % menos de monóxido de carbono e hidrocarburos). El etanol se puede mezclar con la gasolina sin plomo de un 10 % a un 25 % sin dificultad. En ciertos motores, se ha logrado incorporar hasta en un 100 % (Verdesio, 2003; Almeida, 2006). El etanol podría así, sustituir al metil terbutil éter (MTBE), producto oxigenante con el que se reformulan las gasolinas en México desde 1989, y que ha permitido reducir las emisiones de CO₂. Esta acción es muy importante pues el MTBE, por ser un compuesto muy estable, de baja degradación y muy soluble en agua, ha resultado ser un contaminante de aguas subterráneas (Nava, 2006). Por otro lado, en algunas regiones, su uso ha disminuido por los

riesgos que éste puede representar para la salud, ya que ha sido clasificado como potencialmente carcinógeno (Lemire, 2004; EPA, 2007).

1.6 El trigo

El trigo es una planta gramínea de la familia del césped. Este cereal se cultiva ampliamente en los países de clima templado y en las zonas más frescas de los países tropicales. El grano de trigo está constituido por tres partes: endospermo, salvado y germen (Figura 6):

- Endospermo: Constituye alrededor del 83% del peso total del grano de trigo, está constituido por proteína y almidón y de esta fracción se obtiene la harina blanca.
- Salvado: Constituye el 14.5 % del grano y mayoritariamente está compuesta de hemicelulosa, celulosa, proteínas, grasas, vitaminas y minerales.
- Germen: Representa el 2.5% del peso y mayoritariamente está constituido de lípidos y vitaminas, predominantemente de vitamina E y B (Pamplona, 2007).

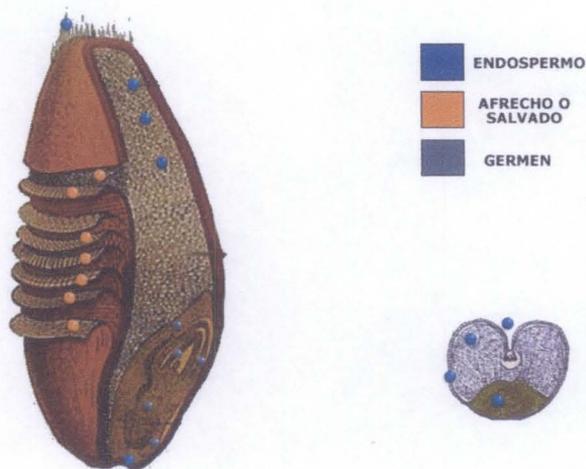


Figura 6. Estructura del grano de trigo (CANIMOLT, 2009)

El trigo (*Triticum aestivum L.*) es uno de los cereales más cultivados en el mundo, ocupando el segundo lugar en producción de cereales y sexto a nivel de producción de alimentos y productos agrícolas (FAOSTAT, FAO, 2009). Los principales productores mundiales de trigo son China, India y los EE.UU., mientras que México no es un representante productor de trigo, pues no aparece en los 20 primeros productores a nivel mundial. Sin embargo, el trigo es el séptimo producto agrícola para consumo humano en producción nacional con un producción total de 4, 017,481 toneladas (SIAP, 2008). En la tabla 1 se muestra el resumen nacional por estado en el Año agrícola 2008, hasta el 31 de enero del 2009, mostrando el avance que se ha tenido en siembras y cosechas de Trigo grano.

Estado	Superficie (ha)		Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)
	sembrada	cosechada	obtenida	obtenido
Baja California	96,491	91,647	535,401	5.842
Baja California Sur	3,170	3,170	18,715	5.904
Coahuila	5,789	5,604	18,118	3.233
Chiapas	172	84	42	0.500
Chihuahua	37,699	36,685	189,836	5.175
Durango	29,339	27,927	84,495	3.026
Guanajuato	116,889	113,537	607,134	5.347
Hidalgo	3,321	3,301	7,301	2.212
Jalisco	34,018	33,806	182,742	5.406
México	13,031	13,031	35,465	2.722
Michoacán	35,908	35,180	187,175	5.320
Morelos	453	403	1,329	3.298
Nuevo León	18,334	13,594	43,432	3.195
Oaxaca	15,484	14,849	16,529	1.113
Puebla	4,141	4,104	8,506	2.072
Querétaro	704	697	2,609	3.743
San Luis Potosí	3,055	2,555	2,165	0.847
Sinaloa	15,008	15,008	68,409	4.558
Sonora	288,777	288,736	1,769,717	6.129
Tamaulipas	60	58	135	2.328
Tlaxcala	46,062	45,646	122,551	2.685
Veracruz	664	664	972	1.463
Zacatecas	49,382	48,114	114,704	2.384
Total	817,952	798,401	4,017,481	5.032

Tabla 1. Avance de siembras y cosechas de Trigo grano (SIAP, 2008).

1.7 Obtención de etanol a partir de Salvado de trigo

El trigo es un cultivo muy ampliamente sembrado en el mundo, se planta en más de 115 naciones y en diferentes condiciones ambientales. En los últimos 100 años, los rendimientos de trigo han aumentado, así como la producción mundial anual de trigo seco (Atwell, 2001). La principal utilización del trigo grano es en la industria molinera, la cual al transformar el trigo en harina, genera subproductos como el salvado y germen de trigo. El salvado de trigo (ST) es producido en el mundo en grandes cantidades como un subproducto de la transformación del trigo a harina, y constituye una importante fuente subutilizada de azúcares. Por otra parte, es también una buena fuente de hemicelulosa (Tabla 2), contribuyendo de este modo en una buena fuente de azúcares solubles como: xilosa arabinosa y glucosa. La hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa permitirá obtener azúcares en su forma simple para posteriormente fermentarlos y obtener etanol. En la industria comúnmente no se utiliza el ST para producir etanol, por lo que su utilización aumentaría considerablemente la producción.

	g/100g (BS)
Celulosa	7.57 ± 0.17
Hemicelulosa	31.19 ± 0.30
Lignina	4.06 ± 0.09
Proteína	16.29 ± 0.06
Cenizas	6.53 ± 0.01

Tabla 2. Composición de salvado de trigo en base seca (Brijwani *et. al*, 2009).

La composición química global del salvado de trigo podría variar ligeramente dependiendo de la especie del trigo, el suelo y las condiciones climáticas. El ST contiene una gran cantidad de hemicelulosa y menor contenido de celulosa en comparación con la paja de trigo, celulosa 33-40, hemicelulosa 20-25, y lignina 15-20 (% w / w), respectivamente (Prasad *et al.*, 2007). Por la complejidad estructural de la matriz lignocelulósica, la producción de etanol a partir de salvado de trigo requiere, al menos cuatro operaciones importantes, como la unidad de pretratamiento, hidrólisis, fermentación y destilación; a diferencia de biomasa de sacarosa, almidón o fécula. La materia lignocelulósica como el salvado de trigo requiere de un tratamiento previo para hacer accesible la celulosa para una despolimerización eficiente (Hendriks y Zeeman, 2009). La hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa se ve obstaculizada por la estructura del polímero en forma de microfibrillas (Figura 7).

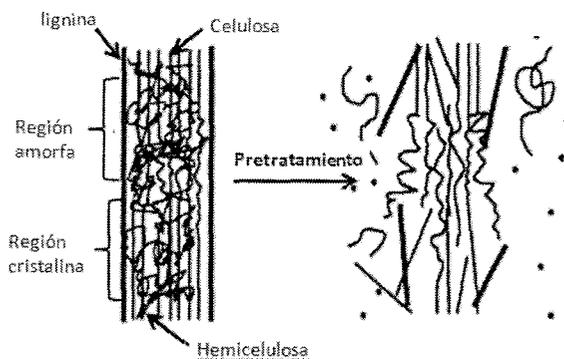


Figura 7. Efecto de Pretratamiento sobre la materia lignocelulósica

(Nathan *et al.*, 2004).

Debido a la dificultad para hidrolizar la materia lignocelulósica se han implantado varios métodos que han sido diseñados para aumentar la hidrólisis, la degradación parcial de los polisacáridos, además de la apertura de las fibras y el acceso a la penetración de los productos químicos o las enzimas en el interior de la estructura. Los métodos existentes para facilitar la hidrólisis de materia lignocelulósica pueden ser físicos, físico-químicos, químicos y enzimáticos (Tabla 3). Para la obtención de etanol, no solo la hidrólisis presenta dificultad en el proceso, también lo es la sacarificación, y los subproductos que inhiben la fermentación. El furfural y 5-hidroximetil furfural son un subproducto que resulta del pretratamiento y la sacarificación y que afecta gravemente a dicho proceso, inhibiendo la fermentación.

Métodos	Procedimientos/Agentes	Observaciones	Ejemplos de materiales pretratados	Referencia
Pretratamientos químicos				
Hidrólisis con ácido diluido	H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ al 1-5%. Procesos de flujo continuo para baja carga de sólidos (5-10% peso sustrato/peso mezcla) a T=120-190 C; procesos por lotes a lata carda de sólidos (10-40%) a T=120-160. Presiones cercana a 1 MPa.	Hidrólisis de 80-100% de la hemicelulosa, altas conversiones de xilano a xilosa. La alta temperatura es favorable para la hidrólisis de celulosa. Se requiere neutralizar el pH para posterior hidrólisis enzimática. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se distribuye.	Desechos de maíz, bagazo de caña, madera de álamo, switchgrass, paja de trigo, astillas de álamo.	Sun y Cheng, 2002; Schell et al., 2003; Rodríguez-Chong et al., 2004; Esteghlalian et al., 1997; Wooley et al., 1999; Lynd et al., 2002.
Hidrólisis con ácido concentrado	H ₂ SO ₄ al 10-30%, 170-190 C, relación al 1:1,6 sólido-líquidos. Ácido paracético 21-60%, sistema tipo silo.	Se requiere la recuperación del ácido. Tiempos de residencia mayores que en la hidrólisis con ácido diluido.	Bagazo de caña, aserrín de madera dura.	Cuzens y Millar, 1997; Teixeira et al., 1999.

Tabla 3.1 Pretratamientos aplicados al material lignocelulósico.

Métodos	Procedimientos/ Agentes	Observaciones	Ejemplos de materiales pretratados	Referencia
Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h, 60 C	Remoción de lignina 24-55% para madera dura con contenido inicial de lignina de 20%, difícil remoción para maderas blandas con contenidos de lignina > 26%. Hidrólisis de >50% de la hemicelulosa. Sustancial hinchamiento de la celulosa. Conversión durante la hidrólisis. De celulosa: 78% (paja de arroz), 67,1% (bagazo). Conversión durante la hidrólisis. De celulosa: proceso convencional, aprox. 54% NaOH+H ₂ O ₂ aprox. 65% (hojas de caña de azúcar).	Madera dura, pajas con poco contenido de lignina (10-18%), desechos de maíz, bagazo de caña de azúcar, hojas de caña de azúcar.	Sun y Cheng, 2002; rivers y Ernet, 1998; Hari Krishna et al., 1998; Lynd et al., 2002.
Designificación oxidativa	Peroxidasa y H ₂ O ₂ al 2%, 20 C, 8h.	Solubilización de 50% de lignina y de casi la totalidad de hemicelulosa. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 95% (aserrín).	Bagazo de caña.	Sun y Cheng, 2002
Proceso organosolv	Disolventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol, entre otros) o su mezcla con 1% de H ₂ SO ₄ o HCl.	Ruptura de lignina interior y de las uniones de hemicelulosa. Solubilización casi total de lignina. Hidrólisis casi total de la hemicelulosa. Altos rendimientos de xilosa. Recuperación de solventes y su remoción del sistema para no inhibir los procesos biológicos subsiguientes.	Madera de álamo.	Sun y Cheng, 2002; Ressonng y Capatar, 1996; Lynd et al., 2002.

Tabla 3.2 Pretratamientos aplicados al material lignocelulósico

Métodos	Procedimientos /Agentes	Observaciones	Ejemplos de materiales pretratados	Referencia
Ozonólisis	Ozono, reacción a temperatura y presión ambientales	Degradación principalmente de lignina. Conversión durante la hidrólisis de celulosa. No se forman inhibidores	Paja de trigo, bagazo, heno verde, cacahuete, pino, paja de algodón y aserrín de álamo	Sun y Cheng, 2002;
Pretratamiento biológico				
Pretratamiento con hongos	Hongos de pudrición blanca, blanda y parda. Producción de celulasas por fermentación en sustrato sólido.	Los hongos producen celulasas, hemicelulasas y enzimas degradadoras de lignina: lignasas, ligninoperoxidasas, polifenoloxiladasas, lacasas y enzimas reductoras de quinonas. Proceso muy lento: <i>Pleurotus ostreatus</i> convierte 35% de la paja en azúcares reductores en cinco semanas. Hongos de la pudrición parda degradan celulosa, Hongos de la pudrición blanca degrada celulosa y lignina.	Paja de trigo, deshechos de maíz.	Sun y Cheng, 2002; Tengerdy y Szakacs, 2003
Pretratamientos físicos				
Pulverizado mecánico	Reducción a astillas, trituración, molienda.	Molinos: vibratorios de bolsas (tamaño: 0,2-2 mm), de cuchilla o martillo (tamaño final: 3-6 mm).	Residuos de madera y forestales (paja, madera dura), deshecho de maíz, bagazo de caña, alfalfa).	Sun y Cheng, 2002; Rivers y Emert, 1998; Cadoche y López; 1989; Papatheofanous et al., 1998; Alvo y Belkacemi, 1997.

Tabla 3.3 Pretratamientos aplicados al material lignocelulósico

Métodos	Procedimiento s/Agentes	Observaciones	Ejemplos de materiales pretratados	Referencia
Pirólisis	T>300 C	Formación de productos volátiles y carbón. Residuos de la pirólisis pueden someterse a hidrólisis acidas suave (1H H ₂ SO ₄ , T=97 C, 2,5h) para producir 80-85% AR (>50% de glucosa). Puede realizarse al vacío: 400 C, p=1mm Hg, 20 min (algodón de desecho).	Madera, algodón de desecho.	Sun y Cheng, 2002; Yu y Zhang, 2003.
Pretratamientos físico-químicos				
Explosión de fibra con amoniaco (AFEX)	Dosis 1-2 Kg de amoniaco/Kg de biomasa saca, 90°C, 30min.	Se requiere recuperación de amoniaco, no produce inhibidores. Conversión durante la hidrólisis de celulosa> 90%. Para biomasa con alto contenido de lignina no es muy eficiente. Hidrólisis del 0-60% de la hemicelulosa en dependencia de la humedad.	Materiales herbáceos (paja de trigo y cebada, cascarilla de arroz, deshechos de maíz), residuos sólidos urbanos, papel periódico, alfalfa, astillas de aspen y gabazo.	Sun y Cheng, 2002; Dale et al., 1996, Lynd et al., 2002.

Tabla 3.4 Pretratamientos aplicados al material lignocelulósico

Métodos	Procedimiento s/Agentes	Observaciones	Ejemplos de materiales pretratados	Referencia
Agua líquida caliente (LHW)	Agua caliente presurizada T=170-230 °C, 1-46 min.	Concentraciones de sólidos <20%. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, >50% oligómeros. Solubilización parcial de lignina (20-50%). Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90%. Baja o nula formación de inhibidores.	Materiales herbáceos (paja de trigo y cebada, cascarilla de arroz, deshechos de maíz, switchgrass), residuos sólidos urbanos, papel periódico, alfalfa, astillas de aspen y bagazo.	Lynd, 1996; Laser et al., 2002; Lynd et al., 2002.
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160-260 °C, p=0,69-4,85 MPa por varios segundos o minutos, luego descompresión hasta presión atmosférica.	Altas concentraciones de sólidos. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, destrucción de la parte xilosa obtenida, formación de inhibidores, se requiere posterior lavado con agua. Al combinarse con H ₂ SO ₄ SO ₂ o CO ₂ mejora la eficiencia de la posterior hidrólisis enzimática disminuyendo inhibidores. Reducción del tamaño con menor gasto energético comparado con pulverización. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se distribuye.	Bagazo de caña.	Sun y Cheng, 2002; Kaar et al., 1998; Moniruzzaman, 1996; De Bari et al., 2002; Heitz et al., 1987; Södersröm et al., 2003; Lynd et al., 2002.
Explosión con CO ₂	Dosis de 4 Kg CO ₂ /Kg de fibra, p=5.62 Mpa.	Conversión a glucosa durante la Hidrólisis de celulosa > 75% (alfalfa). No forma compuesto inhibidores.	mezcla de papel reciclado	Sun y Cheng, 2002;

Tabla 3.5 Pretratamientos aplicados al material lignocelulósico

Normalmente, la hidrólisis ácida se realiza con ácidos como el H_2SO_4 o HCl , a temperaturas entre 120°C y 200°C (Gretlein y Converse, 1991; Torget y Hsu, 1994). Los rendimientos de etanol obtenido mediante hidrólisis ácida diluida y la fermentación son sólo el 50-60% de los valores teóricos (Wyman, 1994). Esto puede deberse a que durante la hidrólisis, que implica condiciones de acidez y alta temperatura, puede conducir a la formación y liberación de una serie de compuestos inhibidores de la fermentación alcohólica (Figura 8).

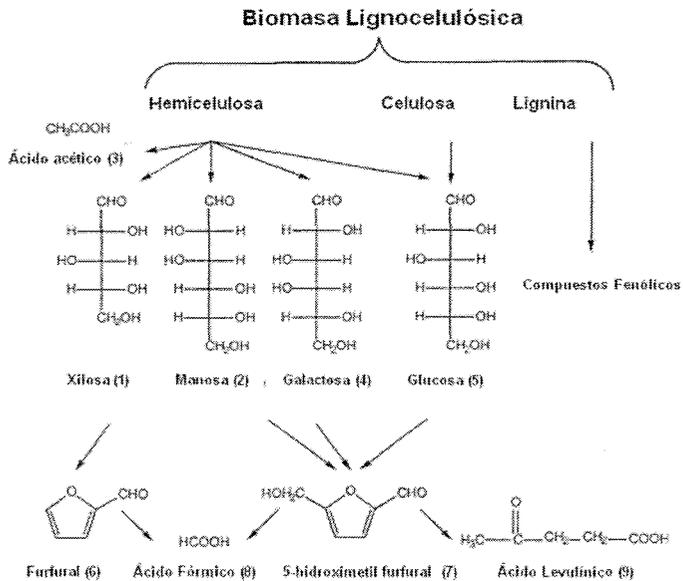


Figura 8. Reacciones que se producen durante la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

En la hidrólisis de la hemicelulosa se liberan xilosa, manosa, ácido acético, la galactosa, y glucosa (Fig. 8, nos. 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente). La celulosa se hidroliza a glucosa. A alta temperatura y presión, la xilosa se degrada a furfural (Fig. 8, no. 6) (Dunlop, 1948). Del mismo modo, 5-hidroximetil furfural (HMF) (Fig. 8, no. 7) se forma a partir de la degradación de las hexosas (Ulbricht et al., 1984). El ácido fórmico (Fig. 8, no. 8) se forma de la descarboxilación del furfural y HMF (Dunlop, 1948 y Ulbricht et al., 1984). El ácido levulínico (Fig. 8, no. 9) está formado por la degradación de HMF (Ulbricht et al, 1984). En altas concentraciones, estos compuestos retrasan la fermentación de los hidrolizados y debe ser eliminados o diluidos, para minimizar el problema de la inhibición de la actividad microbiana causada por la degradación de dichos productos.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo General

- Comparar tres métodos químicos de pretratamiento de salvado de trigo para determinar cuál de ellos permite una mayor accesibilidad del salvado de trigo y es más eficiente en la generación de azúcares reductores en la sacarificación, así como su posterior fermentación a etanol.

1.8.2 Objetivos específicos

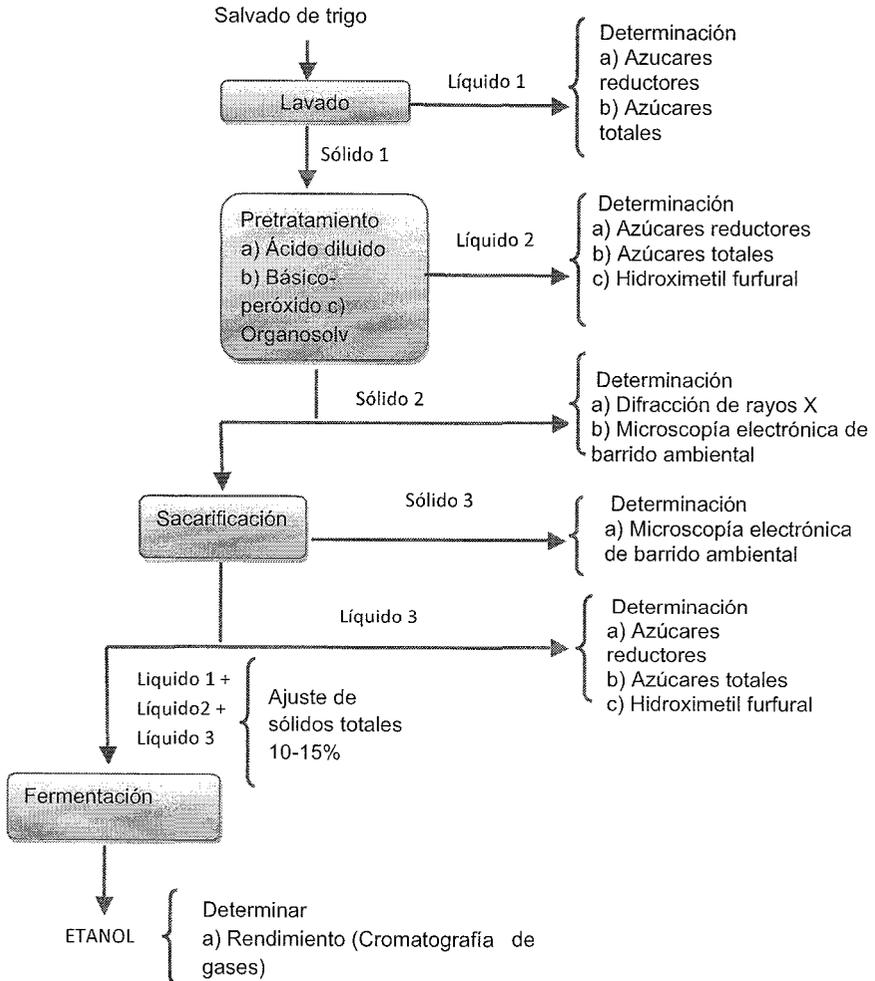
- Determinar los azúcares reductores y totales de las fracciones líquidas que se generán de las operaciones de lavado, pretratamiento y sacarificación, mediante los método DNS y fenol-sulfúrico, con el fin de establecer un estimado de la cantidad de los azúcares presentes en cada una de las fracciones.
- Determinar la formación de furfural y HMF con las fracciones líquidas obtenidas durante los procesos del pretratamiento y sacarificación
- Realizar la fermentación de los jarabes provenientes de los diferentes pretratamientos y de la sacarificación para la producción de etanol.
- Evaluar la producción de etanol a partir de los diferentes pretratamientos del salvado de trigo.

1.8.3 HIPÓTESIS

El pretratamiento químico permitirá aumentar la accesibilidad del salvado de trigo al agente de sacarificación, por lo que se mejorará la eficiencia de generación de azúcares reductores y su posterior fermentación a etanol.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1 Diagrama de obtención de etanol



2.2 Metodología descriptiva

Material biológico

Muestra: Salvado de trigo de Harinera Beleño S.A. de CV. de Tequisquiapan , Querétaro.

2.2.1 Operación de lavado del salvado de trigo

Los azúcares solubles en el salvado de trigo pueden ser recuperados si el salvado se somete a un proceso de lavado para solubilizar los azúcares presentes y evitar que puedan ser degradados durante la etapa del pretratamiento y la sacarificación.

El material y reactivos se mencionarán al describir cada técnica.

Material y reactivos:

- Centrífuga Marca: Beckman. Modelo: J2-21M/E
- Horno de convección. Marca: Felisa.
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Thermo Spectronic. Software: Vision 32.
- Ácido sulfúrico concentrado Marca: J.T.Baker.
- Solución de fenol al 5%.

- Reactivo DNS.

Técnica operación de lavado:

Se pesó 12.5g en una balanza el salvado de trigo por duplicado y se colocaron en tubos para centrifuga de plástico de 500mL, adicionándole 125mL de agua destilada a cada uno. Posteriormente se colocaron los tubos en una centrifuga Beckman (J2-21M/E) a una velocidad de 8000 rpm por 10 minutos. Se centrifugaron para separar la fracción acuosa del salvado. Mediante filtración al vacío se separó la fracción acuosa, la cual se le determinaron azúcares totales y reductores mediante la técnica del Fenol-H₂SO₄ y del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), respectivamente; por duplicado y se estimó el grado de polimerización (GP) a dicha solución.

$$Gp=M/M_0$$

Se etiquetaron y congelaron los jarabes provenientes del lavado hasta su utilización en la etapa de fermentación.

La parte sólida (salvado de trigo) se sometió a un proceso de secado a una temperatura de 60° C por 24 horas o hasta peso constante. El salvado de trigo seco se caracterizó mediante estudios de Difracción de rayos X (XRD) (Equipo: Difractómetro de Rayos X Marca: D8-Discover), y Análisis de morfología por Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ASAE).

Determinación de azúcares totales

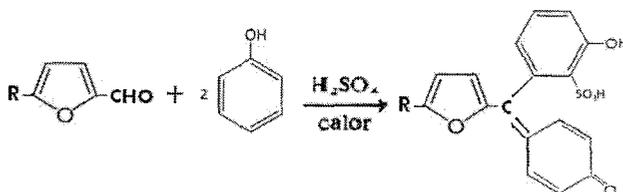
- Método de Fenol- sulfúrico

Fundamento (BeMiller,, 2003)

Este método propuesto por Dubois *et al* en 1956 se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensible a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol. Este método es fácil, eficaz y rápido. Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos.

La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto se realiza una curva patrón.

Reacción



Material y reactivos:

- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Termo Spectronic Software: Vision 32
- Celdas de cuarzo
- Ácido sulfúrico concentrado (96.6% pureza) Marca: J.T.Baker
- Solución de Fenol al 5 % (Pesar 5 g de Fenol (Marca: Sigma-Aldrich) y aforar a 100 mL).
- Agua destilada.

Técnica de fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al, 1956). Preparar una solución o suspensión de la muestra en agua, procurando que los carbohidratos se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (10-100 μ g/mL). En tubos de ensaye perfectamente etiquetados, colocar 1 mL de la solución o suspensión acuosa de la muestra. Para cada tubo adicionar 1 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Mezclando perfectamente, adicionar cuidadosamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, homogeneizar. Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 30 min.) y determinar la intensidad del color naranja obtenido en un colorímetro a 490 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua. Calcular la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra a partir de una curva patrón preparada con el carbohidrato de interés en el intervalo del método (10-100 μ g de glucosa/mL), tratada de la misma manera que el problema.

Determinación de carbohidratos reductores

- *Método ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)*

Fundamento

El grupo aldehído presente en la glucosa reduce a grupo 3-nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico para producir el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que al reaccionar con la fenilhidrazina presente en el reactivo DNS produce una ozazona (compuesto colorido) que puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de 540 nm.

Observaciones referentes al fundamento de la técnica:

- Hay reducción de compuesto nitro para obtención de aminas.
- El aldehído es oxidado pero no es claro como.

La reacción no se puede deducir.

Material y reactivos:

- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Termo Spectronic Software: Vision 32.
- Celdas de cuarzo.
- Reactivo DNS (Disolver en caliente 6.3g de ácido 3,5-Dinitrosalicílico (Marca: Sigma-Aldrich) en 200 mL de agua destilada donde previamente se disolvieron 21.4 g de Hidróxido de Sodio (Marca: J.T.Baker). En otro

vaso de precipitados, adicionar 140g de tartrato de sodio y potasio (Marca: J.T.Baker) a 250 mL de agua destilada y calentar hasta disolución. Adicionar 5 g de Fenol (Marca: Sigma-Aldrich) y 5 g de Bisulfito de Sodio (Marca: Sigma-Aldrich). Mezclar las dos soluciones y ajustar el volumen final a 1000 mL con agua destilada).

Técnica de azúcares reductores (BeMiller, 2003)

Tomar 1mL de la solución acuosa de la muestra, adicionar 1mL del reactivo de DNS y calentar por 5 min en un baño de agua hirviente, enfriar y diluir con 8mL de agua destilada. Leer la absorbancia del color producido a 540 nm frente a un blanco de reactivos y agua tratado igual que la muestra. Cuantificar los azúcares reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar preparada con el carbohidrato reductor de interés en concentraciones de 0.2 a 2 mg/mL.

2.2.2 Pretratamiento

Esta es la segunda operación del diagrama de proceso. En esta parte se va a realizar tres tratamientos al sólido que quedó después del lavado. Los tres pretratamientos son:

- a) Pretratamiento ácido diluido.
- b) Pretratamiento Organosolv (acetona/agua)
- c) Pretratamiento básico oxidante.

- *Pretratamiento ácido diluido*

Fundamento:

El objetivo del método es hacer más accesible el material para la etapa posterior. Sirve para la hidrólisis del 50% de lignina y de casi la totalidad de la hemicelulosa.

Técnica

Se pesaron 0.5g de salvado de trigo lavado, por duplicado y se colocaron en matraces con rosca (marca PYREX) de 250mL, después se le adicionaron 5mL de H₂SO₄ concentrado y se pusieron en una incubadora a 30°C con una velocidad de agitación de 250 rpm por 1 hora. Transcurrida la hora, se le agregaron a los matraces 115 mL de agua destilada (para llegar al 3% H₂SO₄), y se introdujeron en la autoclave a 121° C durante 1h. AL cabo de 1h, se prosiguió a filtrar los jarabes para separar la fracción acuosa a la cual se le

determinaron azúcares totales y reductores mediante la técnica del Fenol- H_2SO_4 y del Ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS) respectivamente, por duplicado. A la fracción sólida resultante se sometió a un proceso de secado a 60°C por 24h. Al sólido seco se caracterizó mediante estudios de Difracción de rayos X (XRD) (Difractómetro de Rayos X, D8-Discover), y Análisis de morfología por Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ASAE).

- Pretratamiento básico oxidante

Fundamento:

Es un método de extracción basado en el uso de soluciones alcalinas diluidas de peróxido de hidrógeno para solubilizar la lignina presente en los materiales lignocelulósicos.

Técnica (Saha y Cotta, 2007)

En este tratamiento se trabajó con 4.5%, 10% y 15% de sólidos, para ello se pesaron 0.675g, 1.500g y 2.250g de ST lavado, respectivamente. Los sólidos ya pesados se colocaron en matraces con rosca Erlenmeyer (PYREX) de 250mL, ya etiquetados se le adiciona 15mL de agua destilada (15% w / v) con H_2O_2 (7.5, %, v / v) y el pH ajustado a 11.5 utilizando NaOH. Se mezcla y se incuba a 150 rpm a 35°C durante 24 h.

- Pretratamiento Organosolv (acetona/agua)

Fundamento:

Se emplea una mezcla de disolventes orgánicos o acuosos junto con un catalizador ácido (clorhídrico o sulfúrico) para romper los enlaces internos de la lignina y la hemicelulosa. Entre los disolventes orgánicos empleados en el proceso se encuentran: metanol, etanol, acetona y etilenglicol. También pueden emplearse ácidos orgánicos como el ácido oxálico, acetilsalicílico y salicílico. Con objeto de reducir costos y evitar problemas en la posterior etapa de fermentación, se deben reciclar los disolventes.

Técnica (Araque et. al, 2007)

Para este tratamiento se pesaron 2.67g de ST lavado y se pusieron en un reactor Parr de 0.1 L, después se vertieron 19mL de agua/acetona (1:1), solución acuosa de ácido sulfúrico como catalizador (0,9% w/w) y una relación de fase sólida/líquida de 1:7. Ya listo el reactor, se programó a una temperatura de 180°C por un lapso de 45min, y una presión de 240psig. Después de que se transcurrió el tiempo, se dejó enfriar el reactor a temperatura ambiente. El jarabe resultante se filtró al vacío para separarlo del sólido resultante. A la parte acuosa se le determinó azúcares totales y reductores mediante la técnica del Fenol-H₂SO₄ y del Ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS) respectivamente por duplicado. A la fracción sólida se le sometió a un proceso de secado a 60° C por 24h. Al sólido ya seco se caracterizó mediante estudios de Difracción de

rayos X (XRD) (Difractómetro de Rayos X, D8-Discover), y Análisis de morfología por Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ASAE).

2.2.3 Sacarificación del salvado de trigo

Fundamento:

Las cadenas de celulosa y hemicelulosa que conforman la estructura del salvado, pueden ser hidrolizadas para generar monosacáridos (glucosa, en mayor proporción, así como p. ej. xilosa y manosa) mediante el ataque a los enlaces glucosídicos que mantienen unidas las unidades de monosacáridos en las cadenas. Para llevar a cabo la sacarificación, siendo una de estas alternativas, el uso de soluciones ácidas (H_2SO_4 10% v/v) en la materia prima y el calentamiento a 121° C por un tiempo de 60 minutos.

Se evaluó la capacidad de sacarificación mediante el uso de una solución de H_2SO_4 al 10% (v/v) con el objeto de observar un incremento en la cantidad de azúcares totales a muestras de Salvado de trigo proveniente de los pretratamientos: ácido diluido, organosolv (acetona/agua) y básico-oxidante.

- Material y reactivos:
- Celdas de cuarzo
- Autoclave Marca: Yamato. Modelo: SE510.
- Papel filtro Whatman No. 40

- Filtros de membrana 0.2 μm
- Estufa de convección. Marca: Felisa.
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Thermo Spectronic. Software: Vision 32
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) Marca: HP Modelo.1100. Software: HP ChemStation.
- Solución de NaOH 5M
- Solución de Fenol al 5%
- Reactivo DNS
- Ácido sulfúrico concentrado. Marca: J.T. Baker.
- Acetonitrilo grado HPLC. Marca: Tecsiquim.

Técnica:

Se pesó aproximadamente 0.5 g de los sólidos resultante de cada pretratamiento aplicado en dicho estudio y se pusieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con una adición de 125 mL de H_2SO_4 al 10%. Se Taparon los matraces y se metieron a la autoclave a una temperatura de 121° C por un tiempo de 60 minutos. Transcurrido este tiempo, se separaron las fases acuosas de las fracciones sólidas mediante filtración al vacío utilizando papel filtro Whatman No. 40. Después se tomaron 2mL para neutralizarlo con solución de NaOH 2M y llevar a un aforo de 5mL para almacenar en viales y posteriormente se cuantificaron AR y AT y derivados de furfural.

El residuo sólido se sometió a un proceso de secado en estufa a temperatura de 40° C hasta peso constante. Se pesó la fracción seca y se determinó el porcentaje de pérdida en función de la cantidad de ST inicial y la fracción sólida no sacarificada.

Llevar la fracción acuosa a un volumen de 50 mL

En la fracción acuosa se cuantificaron los azúcares totales y reductores mediante las técnicas de Fenol-H₂SO₄ y del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) respectivamente (por duplicado). De igual manera, en la fracción acuosa se cuantificó furfural y HMF mediante la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), filtrando 1 mL de la fase acuosa con un filtro de membrana de 0.2 µm y colocada en un vial de 1 mL. Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la cuantificación de furfural y HMF fueron las siguientes:

Columna: Bondpack C18

Marca: Waters

Fase Móvil: Agua: Acetonitrilo (70:30)

Flujo: 1 mL /min.

Volumen de inyección: 20µL

Temperatura: ambiente.

2.2.4 Obtención de etanol por fermentación de jarabes obtenidos

Fundamento:

Cuando el oxígeno está presente, las levaduras crecen eficientemente formando, a partir del azúcar presente en el medio, biomasa y CO₂. Sin embargo, en ausencia de oxígeno, las levaduras cambian a metabolismo anaeróbico, que se traduce en la formación de una menor cantidad de biomasa, así como la formación de etanol.

La celulosa y la hemicelulosa, al ser hidrolizadas, generan moléculas de glucosa y xilosa principalmente; las primeras pueden ser fermentadas por las levaduras, en condiciones anaerobias, para producir etanol. En cuanto a las segundas pueden ser fermentadas mediante una mezcla de microorganismos silvestres o recombinantes con la capacidad de fermentar pentosas.

Muestra:

Jarabes generados por los tratamientos los pretratamientos: Lavado, ácido diluido, organosolv y básico-oxidante.

Material y reactivos:

- Filtros de membrana 0.2 µm
- Papel filtro Whatman No. 40
- Tubos de centrifuga Falcon 50 mL
- Celdas de cuarzo.

- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Thermo Spectronic. Software: Vision 32.
- Cromatógrafo de gases Marca: HP. Modelo: 6890. Software: HP ChemStation.
- Autoclave Marca: Yamato. Modelo: SE510.
- Centrífuga Marca: Eppendorf A-35. Modelo: 5810R.
- Agitadora Mecánica. Marca: Brunswicks.
- Extracto de levadura Ultrapuro. Marca: USB.
- Solución de fenol 5%
- Reactivo DNS
- Ácido Sulfúrico concentrado Marca: J.T.Baker.
- Levadura liofilizada (*S. cerevisiae*). Marca: Oviedo.

Técnica:

Para la preparación de los medios de cultivo, en matraces con rosca Erlenmeyer (PYREX) se realizó la mezcla de jarabes (pretratados, sacarificados y lavado). Las mezclas preparadas fueron las siguientes:

- Jarabes provenientes de la muestra lavada: 100 mL de jarabe de la muestra lavado de lavado de salvado de trigo, en donde se tiene 0.817g/L azúcares reductores y 6.58 g/L azúcares totales.

- Jarabes provenientes del pretratamiento básico/oxidante al 15%: 10 mL de jarabe de la muestra lavada, 10 mL de jarabe proveniente del pretratamiento y 80 mL de jarabe proveniente de la sacarificación
- Jarabes provenientes del pretratamiento ácido: 10 mL de jarabe de la muestra lavada y 90 mL de jarabe proveniente del pretratamiento/sacarificación.
- Jarabes provenientes del pretratamiento organosolv: 50 mL de jarabe de la muestra lavada y 50mL de jarabe proveniente del pretratamiento.

Se vertieron 100mL de los jarabes mezclados de cada pretratamiento ya neutralizados, y se les adicionaron a cada uno 1 g de extracto de levadura para aportar nutrimentos a las levadura. Se prepararon un blanco de fermentación que contiene 1% de glucosa y de extracto de levadura. Posteriormente, los jarabes se sometieron a un proceso de esterilización en autoclave a una temperatura de 121° C por un periodo de 15 minutos. Los jarabes esterilizados se enfriaron hasta alcanzar temperatura ambiente y se inocularan con 1g de levadura (*S. cerevisiae*), en condiciones estériles.

Se colocaron los jarabes inoculados en una agitadora con un control de temperatura de 28° C y a una velocidad de agitación a 60 rpm por un periodo de 48 horas. Transcurrido el tiempo de fermentación, se vertieron los jarabes fermentados en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a una velocidad de 8000 rpm por 10 minutos. La parte acuosa resultante se vertió en viales de vidrio con rosca, para su posterior cuantificación de AR y AT mediante las

técnicas del Ácido 3,5-Dinitrosalicílico y del Fenol-H₂SO₄, respectivamente (por duplicado). También a la fase acuosa se le cuantificó el etanol producido por la levadura, esto se llevo a cabo filtrando aproximadamente 1 mL del jarabe fermentado, depositándolo en un vial de 1 mL, y se coloco en el cromatógrafo de gases. Se elaboro una curva patrón de etanol con concentraciones de 0.02 a 0.2 % de etanol medida en el cromatógrafo de gases. Las condiciones de trabajo en el cromatógrafo de gases fueron las mismas, para la curva patrón y la muestra problema.

La cuantificación del etanol se realizó en un cromatógrafo de gases bajo las siguientes condiciones:

Columna: AF-WAX 30m x 0.53 mm

Capilar (diámetro): 120 µm

Marca: Alltech

Fase móvil: He

Flujo: 40 mL /minuto

Temperatura: 250 ° C

Volumen de inyección: 1 µL

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

3.1 Lavado

El proceso de lavado se realizó para recuperar y cuantificar los azúcares solubles presentes en la muestra inicial del salvado de trigo (ST). Este proceso se utilizó como referencia de los azúcares presentes que se tiene inicialmente en la muestra. Los polisacáridos solubles que puede contener el ST son: 16,2% de almidón y el 2,8% de fibra soluble 1,7% b-glucano (Cui et al, 1999). Con ello se comparó el efecto que tienen los pretratamientos analizados en el presente estudio (ácido diluido, básico-peróxido y organosolv) sobre la muestra lavada de ST.

En el jarabe resultante del proceso de lavado de la muestra de salvado de trigo se obtuvieron 0.817 (0.08%) y 6.58 (0.658%)g/L de azúcares reductores (AR) y totales (AT), respectivamente. Estos resultados están muy alejados por los reportados por (Cui *et al*,1999) Sin embargo, con estos datos se determinó el grado de polimerización (GP), el cual fue de 8.05 y el porcentaje de sólidos retenidos en la muestra lavada que fue de 83.4%. El grado de polimerización indica el valor promedio del número de monómero de azúcar que conforman al oligosacárido o polisacárido. Por otra parte, el lavado de ST permitió la solubilización del 17.6% de la muestra inicial. La fracción sólida resultante de los pretratamientos se estudió mediante análisis de morfología por Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ASAE). La caracterización de la estructura cristalina por Difracción de rayos X (XRD) (Diffractómetro de Rayos X, D8-

Discover) se presentará y discutirá posteriormente. Para comprender mejor el efecto que causan los pretratamientos aplicados al salvado de trigo, se realizó un estudio microscópico mediante ASEM a la muestra inicial de salvado de trigo. En la Figura 9, se muestra el salvado de trigo original en donde se observa en color más claro unos gránulos que podrían ser de almidón, mientras que se observan fibras rectas del ST con una superficie lisa y suave.

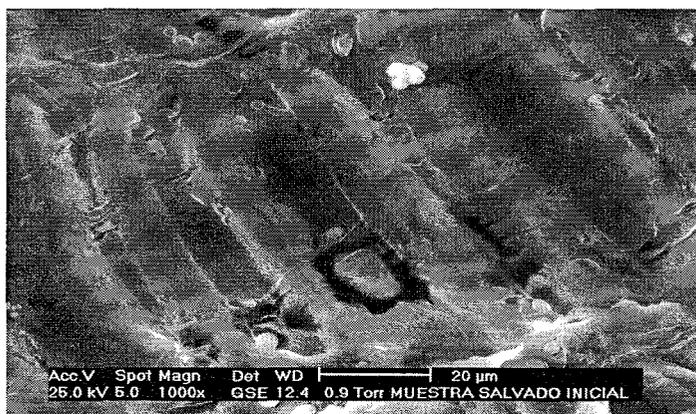


Figura 9. Micrografía de microscopía ASEM del salvado de trigo inicial.

3.2 Pretratamientos

En la figura 10, se muestra el rendimiento de azúcares generados después de aplicar los pretratamientos químicos de ácido diluido, Organosolv y básico-peróxido (4.5%, 10% y 15 % de sólidos). Con la finalidad de aumentar la disponibilidad del ST (materia lignocelulósica), y facilitar la sacarificación para su posterior fermentación. Para ello, se comparó primero la generación de azúcares reductores y totales en cada uno de los pretratamientos ya citados.

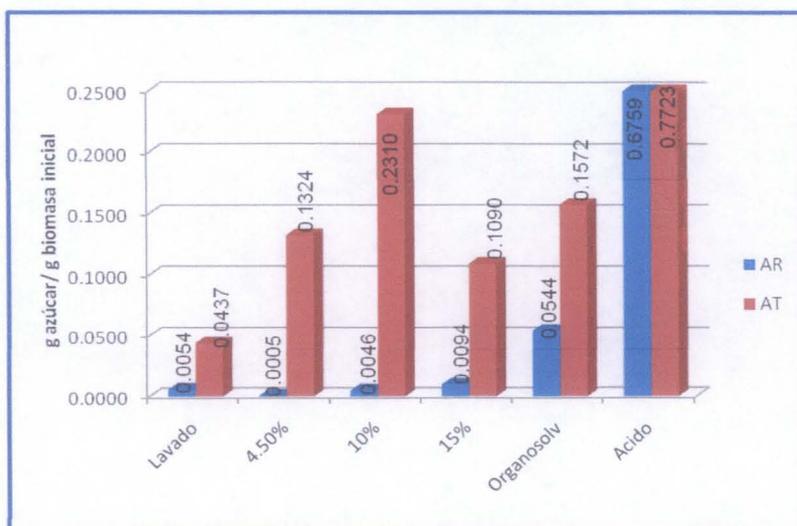


Figura 10. Azúcares (g de azúcares/g de muestra inicial) en pretratamientos químicos

Se observa que los mejores resultados en relación con el rendimiento de los AR fue el jarabe proveniente del pretratamiento ácido diluido. En dicho tratamiento se obtuvo un total de sólidos de 5.1°Bx, 0.6080 $\frac{\text{azúcares}}{\text{g}_{\text{biomasa inicial}}}$ y 0.7728 $\frac{\text{g}_{\text{azúcares}}}{\text{g}_{\text{biomasa inicial}}}$ de AR y AT, respectivamente. Esto indica que hubo un rendimiento muy alto de AR, en comparación a lo que reportan otros autores de 0.504 $\frac{\text{azúcares}}{\text{g}_{\text{biomasa inicial}}}$ obtenidos por hidrólisis ácida con un 1% H₂SO₄ realizado a 130 ° C por 40 minutos (Palmarola-Adrados, 2005). A partir de los resultados de AR y AT se calculó un grado de polimerización de 1.14 y los sólidos que no se lograron solubilizar fue de 7%, el resto fue el material que si se solubilizó (93%) mediante el tratamiento ácido diluido. Este pretratamiento resultó muy eficiente para solubilizar el salvado de trigo y generar azúcares simples, pues en comparación con otros autores reportan 49% a 63% de material solubilizado, bajo condiciones similares (Talebnia *et al.*, 2010). Además de los azúcares que se generaron durante el Pretratamiento/sacarificación, varios subproductos se forman en el proceso de hidrólisis (Larsson, et al., 1999). Entre ellos, los más importantes son el furfural y 5-hidroximetil furfural formado por la descomposición de pentosas y hexosas, respectivamente. Este proceso de degradación depende en gran medida de la temperatura, tiempo de permanencia y concentración del ácido.

La generación de derivados de furfural reducen la tasa de fermentación y promueven la fase de latencia prolongada en la levadura (Almeida J. *et al.*, 2009). Para ello se realizó un análisis por cromatografía por HPLC a los filtrados de los jarabes de cada pretratamiento, resultando el pretratamiento ácido diluido

el único que generó $0.658\text{g/L}_{\text{jarabe}}$ y $0.800\text{g/L}_{\text{jarabe}}$ de furfural y HMF, respectivamente. Los pretratamientos de organosolv y básico oxidante no generaron derivados de furfural dentro del umbral de detección por HPLC. Sin embargo, los efectos de inhibición sustancial tanto en la célula, como en el crecimiento y la producción de etanol se han notificado en concentraciones típicas para los hidrolizados de lignocelulósica. Los estudios reportan que una concentración de $0.5\text{--}2.0\text{ g/L}$ de furfural puede reducir un 43 a 89%, y de 1.0 a 5.0 g/L de HMF reduce el 65 a 90 % la productividad del proceso de fermentación de la levadura *S. cerevisiae* (Delgenes et al. 1996).

EL segundo pretratamiento que mejor solubilizó al ST fue el pretratamiento Organosolv con 3.8°Bx , $0.1572\text{g}_{\text{azúcares}}/\text{g}_{\text{biomasa inicial}}$ y $0.0544\text{g}_{\text{azúcares}}/\text{g}_{\text{biomasa inicial}}$ de AT y AR, respectivamente. Con los datos de AT y AR se calculó un grado de polimerización de 2.88. Mientras que los sólidos que no se lograron solubilizar constituyó el 37.45%, el resto fue el material que si se solubilizó (62.55%) mediante dicho tratamiento. En el pretratamiento Organosolv, la accesibilidad de la pared celular se desarrolla mediante la creación de macroporos en el material, posteriormente, se disuelven los fragmentos de la lignina bajo condiciones ácidas, permitiendo una mejor hidrólisis de la hemicelulosa (Sun et al., 2004), además de modificaciones en la región cristalina de la celulosa (Sannigrahi et al., 2010).

En cuanto al pretratamiento básico-peróxido, el que mejor resultados brindó fue el de 15% w/w de sólidos con un jarabe con 2.0°Bx , $0.0095\text{g}_{\text{azúcares}}/\text{g}_{\text{biomasa inicial}}$ y $0.1090\text{g}_{\text{azúcares}}/\text{g}_{\text{biomasa inicial}}$ de AR y AT, respectivamente. Con estos últimos

datos se obtuvo un grado de polimerización de 11.50 y 52.88% de sólidos insolubles. En un estudio utilizando paja de trigo se reportó que más de la mitad de la lignina y la mayor parte de la hemicelulosa se solubilizaron; por lo que el pretratamiento básico/oxidante no resultó ser el menos eficaz para la hidrólisis de la biomasa lignocelulosa en comparación con otros pretratamientos (Talebnia *et.al.* 2010).

El análisis por ASEM de los sólidos resultantes del pretratamiento permitirá observar su efecto sobre la morfología del material lignocelulósico (Figura 11 a 13). Las fibras del sólido resultante del pretratamiento básico peróxido del 15% se observa un menor deterioro en las fibras en comparación con los demás sólidos (Figura 11). Sin embargo, la superficie se ve rugosa y con presencia de gránulos que podrían ser de almidón, pero con mayor acentuación de surcos e hendiduras en determinadas zonas de las fibras. En el sólido de ST pretratado por organosolv se observa aún la presencia de surcos, además de presentar el material hinchado en la superficie y que se atribuye a la solubilización de la lignina y absorción del disolvente por las fibras del ST (Figura 12). El tratamiento de ácido diluido del ST provocó un mayor efecto sobre las fibras y sólo son visibles rastros de ellas, dejando al descubierto una estructura aparentemente diferente, la cual no se puede observar con claridad. (Figura 14). Así, el pretratamiento de ácido diluido resultó ser el mejor proceso para hidrolizar las fibras de celulosa, pues atacó más fuertemente la estructura del salvado de trigo; sin embargo, hay fracciones que no se pudieron hidrolizar (Figura 13).

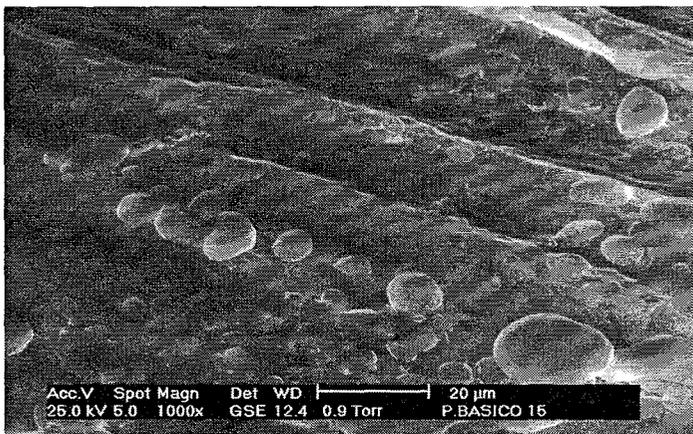


Figura 11. Foto de microscopía ASEM del sólido resultante del pretratamiento básico-peróxido al 15% w/w.

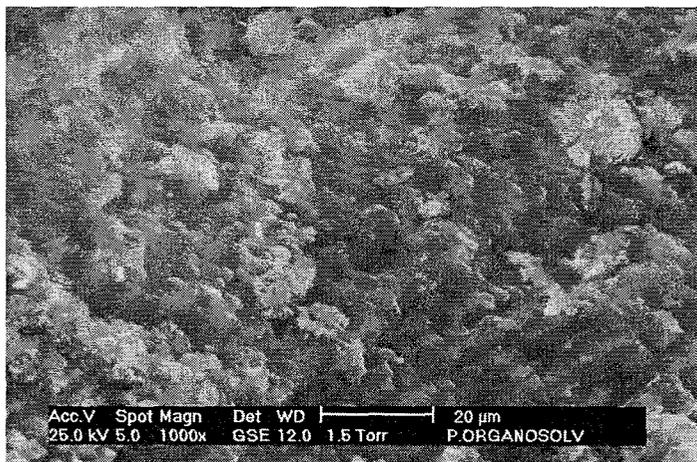


Figura 12. Foto de microscopía ASEM del sólido resultante del pretratamiento organosolv.

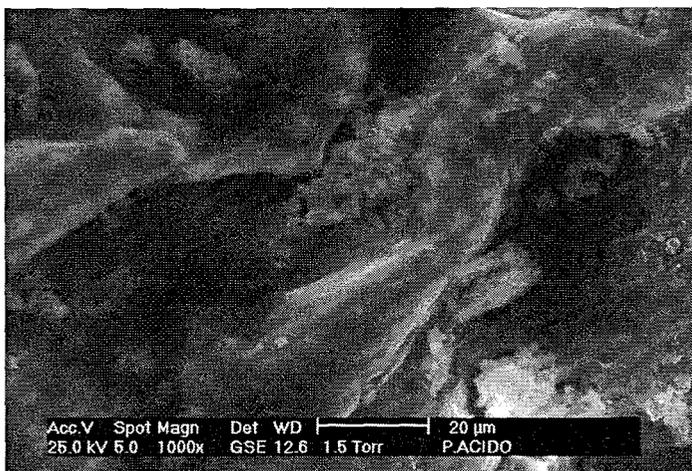


Figura 13. Foto de microscopía SEM del sólido resultante del pretratamiento ácido diluido 3% H_2SO_4 .

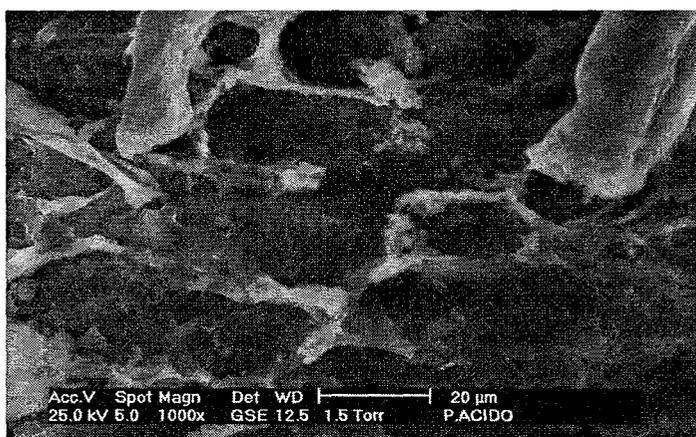


Figura 14. Foto de microscopía SEM del sólido resultante del pretratamiento ácido diluido 3% H_2SO_4 .

3.3 Sacarificación

Se realizó el proceso de sacarificación a los sólidos resultantes de ST de los pretratamientos aplicados para poder evaluar el efecto del pretratamiento en la generación de azúcares solubles. Para ello se sometieron los sólidos provenientes de cada pretratamiento a una hidrólisis ácida en la que el ácido descompone la hemicelulosa del ST para formar azúcares como la xilosa. El ácido también cataliza la hidrólisis de la fracción de celulosa para producir glucosa, que puede ser fermentada en etanol después de la neutralización (Wyman, 1994).

La cantidad de AR es significativamente menor que los AT antes de la sacarificación (Figura 14); mientras que el contenido de AR aumentó considerablemente después de la sacarificación, de tal forma que la proporción de ambos azúcares presentes en cada jarabe de sacarificación es casi la misma (Figura 15), y que se atribuyó a la hidrólisis de los polisacáridos del ST en azúcares simples. Se observa que la sacarificación del sólido de ST únicamente lavado produjo $0.5713 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa inicial}}$ y $0.6740 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa inicial}}$ de AR y AT, respectivamente. Esto nos permite indicar que el proceso de sacarificación fue más eficiente en comparación con el resto de los pretratamientos, sin incluir el pretratamiento/sacarificación con ácido diluido. Lo anterior puede explicarse en función del gran contenido de almidón presente en el ST como lo reporta un estudio donde se determinó $0.34 \text{ g}_{\text{almidón}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$

inicial en el jarabe obtenido mediante lavado (Palmarola-Adrados et al, 2005). Asimismo, se caracterizaron los jarabes de sacarificación en relación al grado de polimerización de los azúcares presentes. El jarabe proveniente del salvado lavado después de la sacarificación obtuvo un GP de 1.16 en comparación con un valor de 8.05 del jarabe antes de sacarificar. La disminución del GP indica que la sacarificación redujo el tamaño de los oligómeros presentes en dicho jarabe; resultando muy eficiente la sacarificación, pues se logró solubilizar el 95.92 % del material y quedando sólo un 4.07% de sólidos retenidos.

En cuanto a la sacarificación de los sólidos provenientes de los pretratamientos básico/oxidante, la concentración de azúcares reductores generados son muy parecidos 0.451, 0.456 y 0.444 $\text{g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa inicial}}$ de AR para las concentraciones de 4.5, 10 y 15% w/w, respectivamente. En resultados de un estudio similar se generaron 0.672 $\text{g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa inicial}}$ mediante la hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada con el método básico/peróxido (Talebnia et al, 2009). Finalmente, en los jarabes de sacarificación del pretratamiento básico/oxidante se obtuvo un GP de 1.35, 1.28 y 1.06 para las concentraciones de 4.5, 10 y 15% w/w, respectivamente.

En la sacarificación de los jarabes del pretratamiento organosolv no se generaron AR y se generó una cantidad muy pequeña de AT. Lo anterior puede explicarse por las condiciones drásticas de presión y temperatura durante el pretratamiento de organosolv, en el cual se degradaron los polisacáridos.

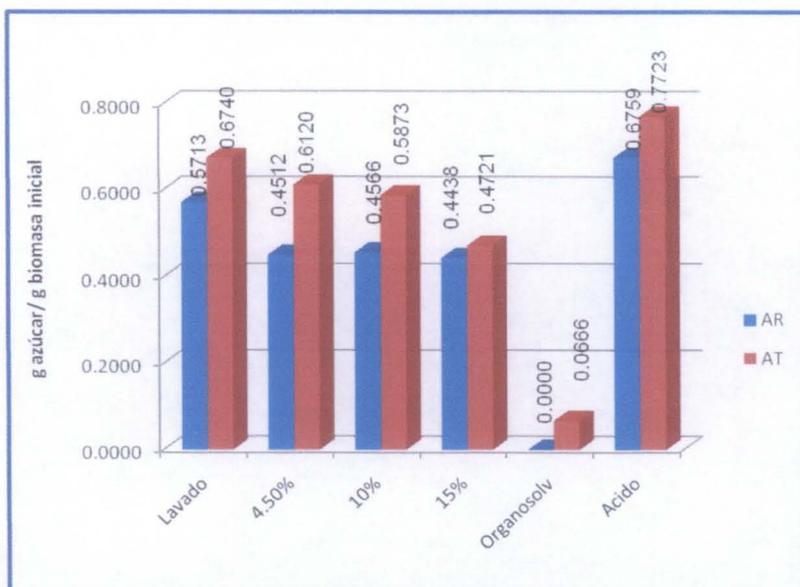


Figura 15. Azúcares (g azúcar/ g biomasa inicial) obtenidos en la sacarificación de sólidos con diferentes pretratamientos.

El GP después de la sacarificación disminuyó considerablemente en todos los jarabes provenientes de cada pretratamiento sacarificado (Figura 16), y que indica la despolimerización de los polisacáridos en prácticamente monosacáridos. También se observa que el GP tanto en el pretratamiento como en la sacarificación disminuyó en el orden básico/peróxido 4.5% < básico/peróxido 10% < Lavado < Ácido < básico/peróxido 15%. De esta forma se puede probar que la sacarificación ácida del ST fue muy eficiente, pues convirtió una fracción importante de polisacáridos a azúcares simples.

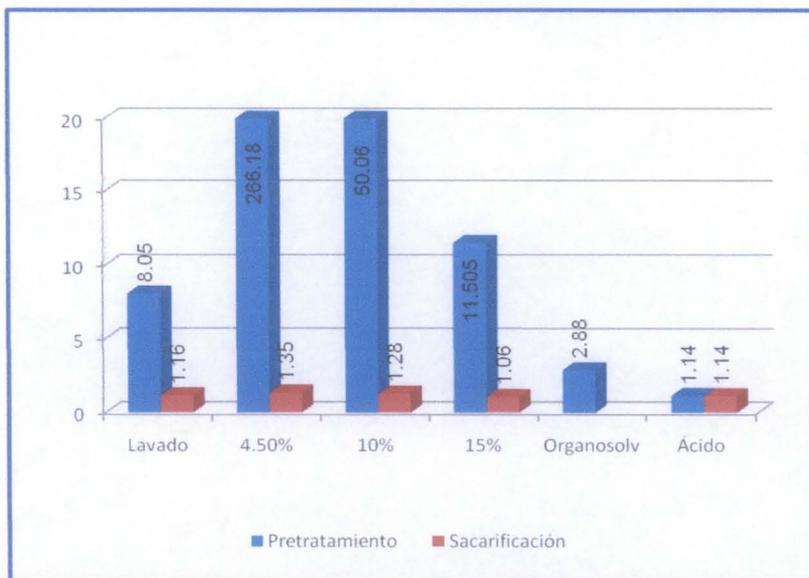


Figura 16. Grado de polimerización (GP) de los jarabes obtenidos en los diferentes pretratamientos y sacarificación.

A los sólidos resultantes de la sacarificación se les determinó un análisis morfológico para observar el deterioro que sufrió la materia lignocelulósica. En las figuras 17-19 se observa el deterioro de las fibras del ST. La figura 17 muestra el sólido resultante de la sacarificación del lavado que se aplicó al ST, se observan las fibras más rugosas, estriadas y desgastadas, e incluso puede verse una porción de la superficie que parece desprenderse de la misma fibra dejando un surco en su lugar. En cuanto al sólido sacarificado de ST básico/peróxido, se observan fibras más desvanecidas (Figura 18) en comparación con el sólido inicial (Figura 9). En la figura 17 aun se muestra

rastros de fibras con hinchamiento, provocado por el disolvente (como puede observarse en la figura 12) y deja expuesta el interior de las fibras que no se apreciaban en las figuras anteriores. Esto nos indica que la sacarificación del sólido tratado por organosolv logró una mayor penetración a la materia lignocelulósica en comparación con los otros pretratamientos. Aquí, se ha sugerido que la sacarificación del material lignocelulósico, tratado por organosolv permite una mayor accesibilidad a la pared celular mediante macroporos, resultado de la deslignificación durante el tratamiento organosolv (Sun et al, 2003).

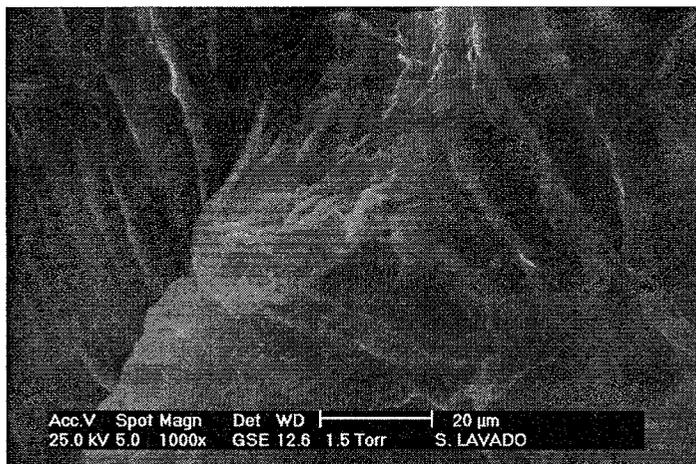


Figura 17. Foto de microscopía ASEM del sólido resultante de la sacarificación del salvado de trigo lavado.

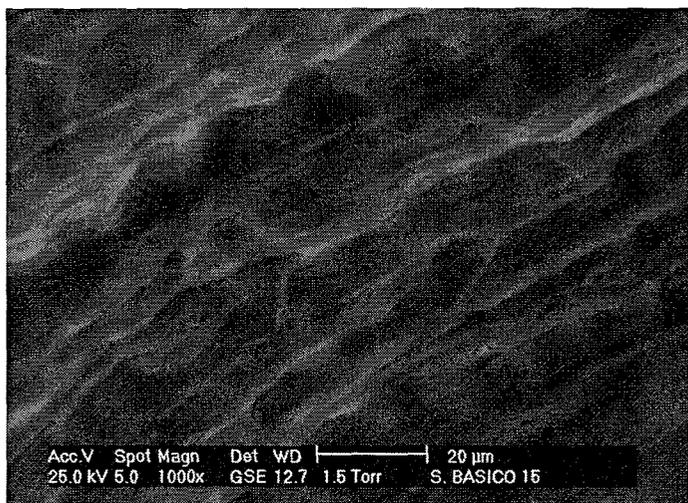


Figura 18. Foto de microscopía ASEM del sólido resultante del método básico-peróxido 15% después de la sacarificación.

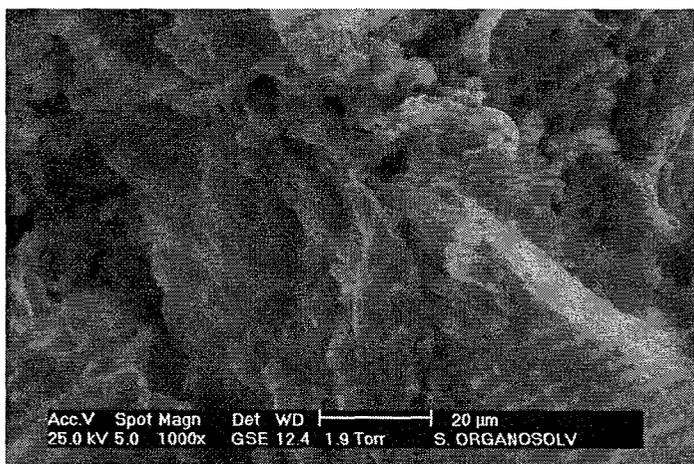


Figura 19. Foto de microscopía ASEM del sólido resultante del método organosolv después de la sacarificación.

El grado de cristalinidad de los residuos resultantes nos permite evaluar el deterioro de las fibras de celulosa, y proporcionar una idea del grado de hidrólisis del ST después de cada pretratamiento y sacarificación. En este trabajo, se evaluaron los valores de índice de cristalinidad (I_c) de los sólidos mediante los espectros de difracción de rayos X (DRX). Así, podemos evaluar el cambio de la relación cristalina/amorfa de la celulosa del salvado de trigo. En la figura 20, se observa la celulosa del salvado inicial (negro), y como se va modificando al tratar el ST con cada pretratamiento estudiado. Dicho cambio se nota más al aplicar el pretratamiento ácido diluido (verde), básico-peróxido 15% (rosa) y organosolv (magenta). Para cada pretratamiento se observa como varía la fracción cristalina y amorfa de la celulosa.

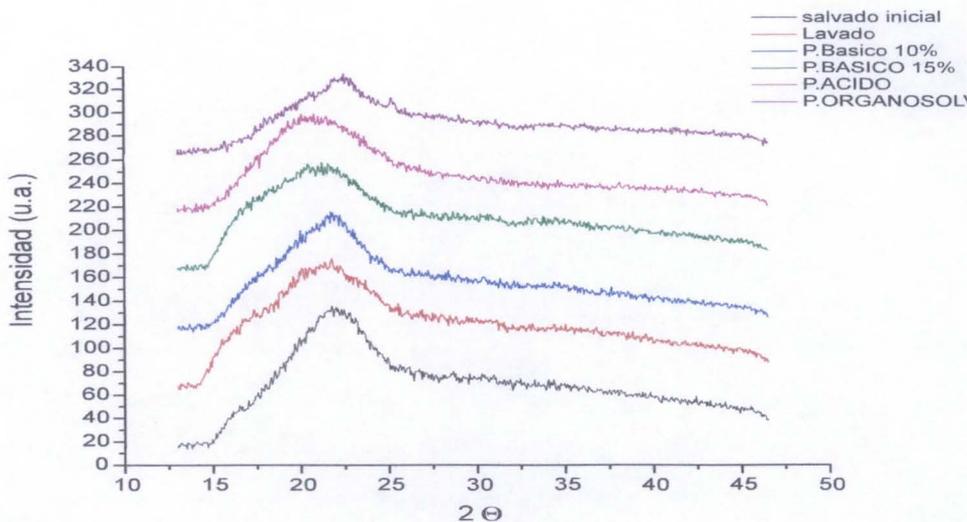


Figura 20. Diagramas de dispersión de rayos X del salvado de trigo después del pretratamiento.

En los diagramas de difracción se observa el efecto que produjo la sacarificación en los sólidos pretratados, pues la parte cristalina va disminuyendo y volviéndose más amorfa (Figura 21). Esto muestra la eficiencia del pretratamiento sobre la hidrólisis de la celulosa, en el pretratamiento básico-peróxido al 15% (verde) fue la que presentó mayor efecto sobre la zona cristalina, seguido de organosolv (magenta) y ácido diluido (café)

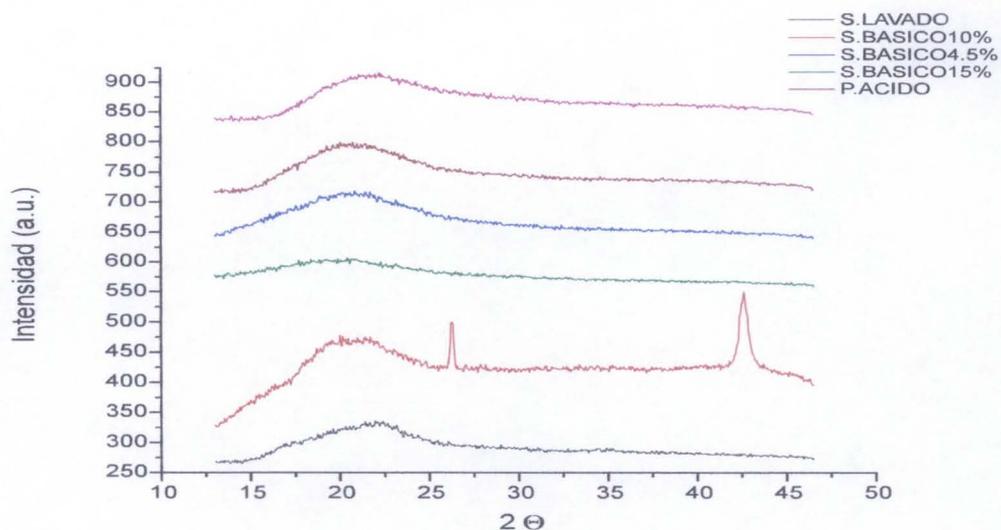


Figura 21. Diagramas de dispersión de rayos X del salvado de trigo después de la sacarificación.

Con la información de cada diagrama de difracción de los sólidos después del pretratamiento y sacarificación se evaluó el I_c (Figura 22). Para la determinación del I_c se utilizó la ecuación (1), donde I_{min} es la mínima intensidad a 2θ entre 18 y 19° (región amorfa de la celulosa nativa) e I_{max} es la intensidad máxima a 2θ entre 22 y 23° , que se atribuye a la región cristalina de la muestra (Ramos et al, 2005).

$$I_c = 1 - \left(\frac{I_{min}}{I_{max}} \right) \quad (1)$$

Al comparar el valor de I_c de los sólidos sujetos al proceso de pretratamiento y sacarificación, se distingue que el valor de I_c es mayor en los pretratamientos que en la sacarificación. El I_c va disminuyendo y se observa que el pretratamiento básico-peróxido (15% w/w) y ácido diluido fueron los que más disminuyeron la cristalinidad de la celulosa, seguidos de Organosolv, lavado y básico. En la sacarificación de los sólidos pretratados de ST, el valor de I_c disminuye de manera importante en todas las muestras analizadas pero en mayor grado en el pretratamiento básico-peróxido con 10 y 15% de sólidos.

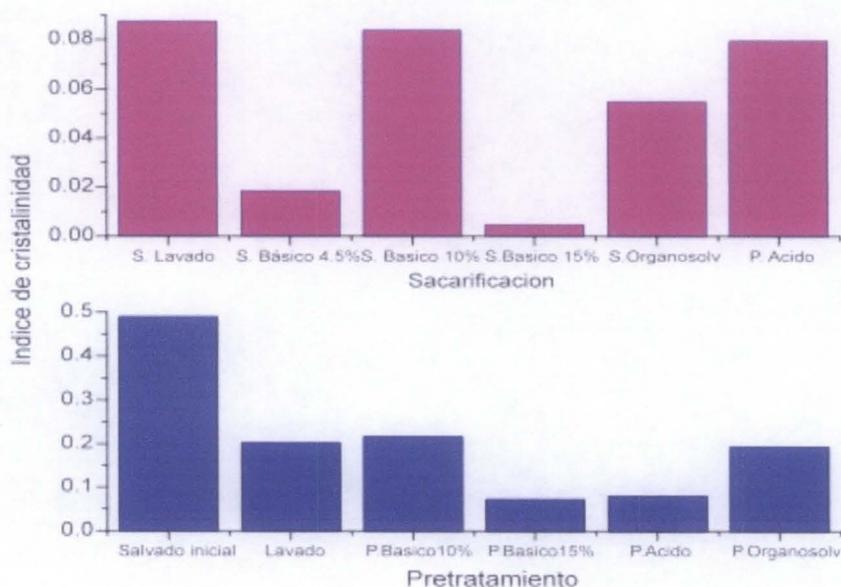


Figura 22. Valores del índice de cristalinidad (I_c) de los sólidos de ST sujetos a los diferentes pretratamientos y sacarificación

3.4 Fermentación

Para realizar la fermentación, se mezcló una fracción de los jarabes resultantes en cada paso del proceso de lavado, pretratamiento y sacarificación para cada pretratamiento aplicado. El mezclado se realizó de tal manera que el contenido de azúcares reductores de los jarabes de todos los pretratamientos fuera similar para fines de comparación. A cada mezcla de jarabes se determinó el contenido de derivados de furfural, AR, y AT. Se realizó un ensayo control que contenía únicamente extracto de levadura como fuente de carbono. El jarabe denominado Ácido diluido presentó la mayor cantidad de AR ($0.3020 \frac{\text{g}_{\text{azúcar}}}{\text{g}_{\text{biomasa inicial}}}$), seguido del Lavado, Básico/peróxido (15% w/w) y organosolv (Figura 23). Sin embargo, el contenido de AT varió de diferente forma con respecto a los AR, incrementando los AT en el orden Lavado<Organosolv<Básico/peróxido<Ácido. Por lo que la aplicación de un pretratamiento por organosolv o básico/peróxido al ST permite aumentar la generación de azúcares solubles.

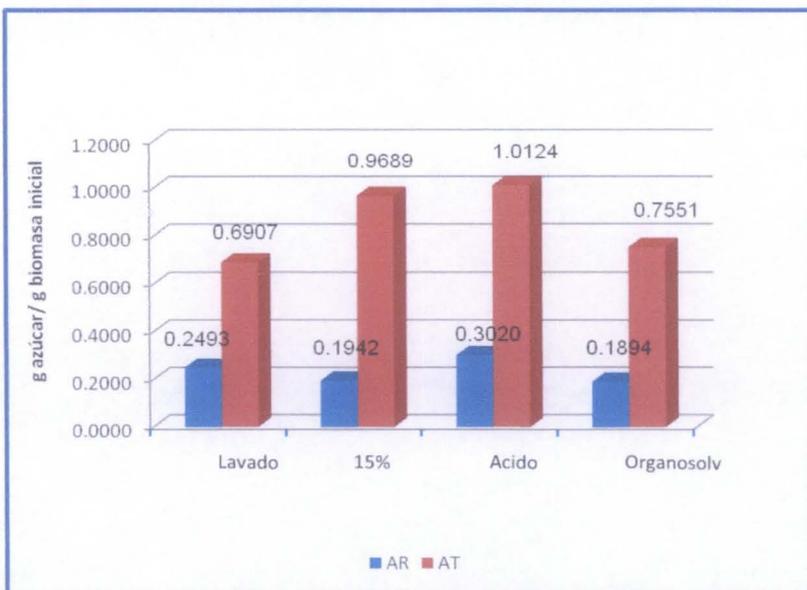


Figura 23. Contenido de azúcares ($\text{g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa inicial}}$) reductores (AR) y totales (AT) en cada mezcla de jarabe para cada pretratamiento-sacarificación antes de la fermentación.

Después de la fermentación, se determinó nuevamente el contenido de AR y AT a los jarabes para evaluar la cantidad de azúcares fermentables consumidos por la levadura. Se puede observar que el contenido de AR se redujo de manera significativa en todas las mezclas de jarabes, siendo los jarabes de los pretratamientos de Lavado y Ácido los que mostraron la mayor reducción de AR (Figura 24). Si bien el contenido de AT disminuye en todos los jarabes, el correspondiente al lavado muestra la mayor reducción e indica que parte de los oligosacáridos presentes y generados en el proceso de Lavado-Sacarificación

fueron también consumidos durante la fermentación. Aquí, es posible que los oligosacáridos presentes en el jarabe se hidrolizaran durante el proceso de esterilización (121°C, 15 min) y rindieran una mayor cantidad de azúcares reductores aptos para la fermentación; o bien que fueran metabolizados por la levadura. En efecto, ciertas levaduras tienen la capacidad de hidrolizar la sacarosa y otros oligómeros como la rafinosa (Atiyeh y Duvnjak, 2002).

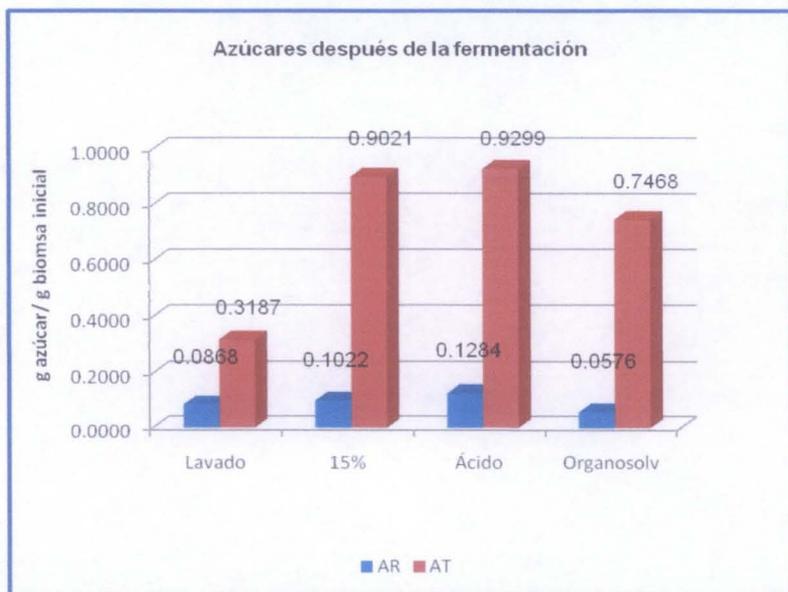


Figura 24. Contenido de azúcares ($\text{g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa inicial}}$) residuales en cada mezcla de jarabes para cada pretratamiento-sacarificación después de la fermentación.

Posteriormente, se determinó el contenido de etanol producido por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante cromatografía de gases con un detector de ionización de flama (FID, Figura 25).

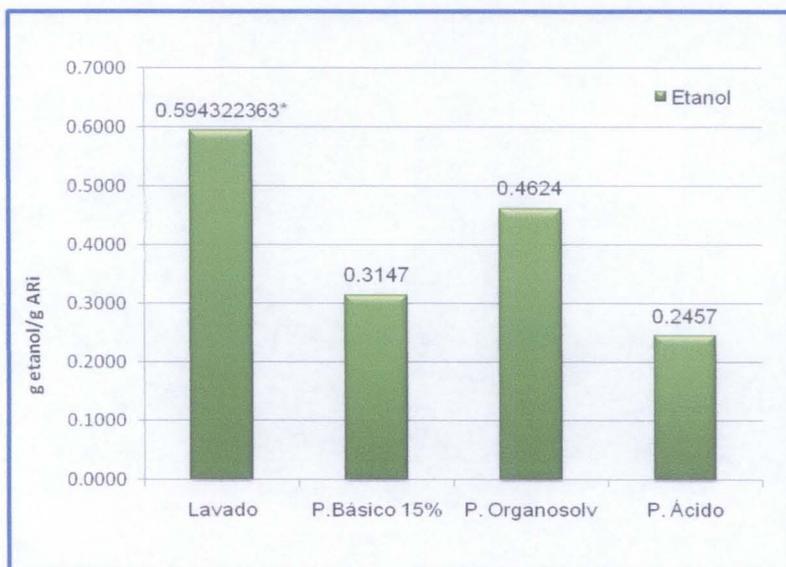


Figura 25. Producción de etanol a partir de los azúcares reductores generados para cada proceso de pretratamiento-sacarificación-fermentación. * Se consideró como AR iniciales (ARi) a los azúcares totales fermentados.

La levadura utilizada permitió la fermentación de los azúcares generados en cada proceso integral de Lavado-pretratamiento-sacarificación-fermentación a etanol. El mayor rendimiento de etanol se obtuvo en el proceso de Lavado-sacarificación, seguido de Organosolv, Básico/peróxido y ácido. Si bien el pretratamiento ácido generó la mayor cantidad de AR, sólo se alcanzó el 48.18 % de rendimiento teórico (Figura 26). Para esta determinación se tomo en cuenta los azúcares reductores iniciales generados a partir de cada pretratamiento-sacarificación aplicado y el rendimiento teórico de etanol a partir de la glucosa (Figura 27). Para determinar el rendimiento teórico se toma en cuenta que una molécula de glucosa produce 2 moléculas de etanol y 2 moléculas de dióxido de carbono, por lo que el rendimiento máximo teórico es de $0.51 \text{ g EtOH/g glucosa}$ (Murphy, 2004).



Figura 26. Rendimiento de etanol para cada proceso de pretratamiento-sacarificación-fermentación.



Figura 27. Esquema de la estequiometría de la fermentación de glucosa a etanol por levadura.

Si bien el pretratamiento ácido en conjunción con la sacarificación permitió obtener la mayor cantidad de AR (0.3020 g_{azúcar}/g biomasa inicial), sólo fue posible obtener el 48.2 % del etanol teórico. En cambio, el proceso de lavado-

sacarificación permitió obtener el máximo teórico de etanol a partir de 0.2493 g_{azúcar}/g_{biomasa inicial}, mientras que el proceso organolsov-sacarificación y básico/peróxido permitieron obtener el 90.7 y 61.7 % de etanol a partir de un menor contenido de AR (0.1894 y 0.1942 g_{azúcar}/g_{biomasa inicial}), respectivamente. Lo anterior puede explicarse en función del contenido de derivados de furfural presentes en cada combinación de jarabe y pretratamiento. Se encontró que la mezcla de jarabes para los procesos ácido y organolsov contenían 1.15 y 0.11 g/L de HMF, respectivamente. Asimismo, se detectó la generación de 0.58, 0.04 y 0.03 g /L de furfural en la sacarificación de los sólidos provenientes de los pretratamientos ácido, lavado y básico-peróxido (15% w/w), respectivamente.

Es bastante conocido que la presencia de HMF puede provocar un retraso largo en la fase de crecimiento de la levadura (Larsson et al., 1998), ocasionando la disminución de la productividad de etanol de un 65 a 90 % del proceso de fermentación de la *S. cerevisiae* (Delgenes et al., 1996). Así, la presencia de HMF en los jarabes provenientes de los procesos ácido y organosolv pudieron ser la causa de la menor producción de etanol.

CONCLUSIONES

Se evaluaron diferentes pretratamientos químico-térmicos (ácido diluido, básico-peróxido y organosolv) del salvado de trigo con el fin de evaluar su efecto en una sacarificación posterior. El pretratamiento ácido diluido con H_2SO_4 (3% v/v) produjo $0.6080 \frac{\text{azúcares}}{\text{g}_{\text{biomasa}} \text{ inicial}}$, y representó la mayor cantidad de AR generados en los pretratamientos evaluados. Sin embargo, el lavado previo del ST proporciona una fuente importante de azúcares que se incrementan después de la sacarificación del sólido lavado. La sacarificación ácida aplicada a los jarabes pretratados fue muy eficiente, pues se observa que el GP estuvo entre 1.06 (básico-peróxido 15%) y 1.35 (básico-peróxido 4.5%). Esto indica que la mayor parte de los polisacáridos fueron transformados a azúcares simples. Asimismo, el pretratamiento básico-peróxido 15% fue el que mejor transformó la parte cristalina de la celulosa a su parte amorfa, pues el valor de I_c (0.0714) fue menor en comparación con los demás pretratamientos.

Por otra parte, el rendimiento de etanol de la fermentación del jarabe proveniente del pretratamiento ácido diluido fue el más bajo en comparación con los otros sistemas de pretratamiento-sacarificación. Así, se generó solamente el 48.2% de rendimiento de etanol. Lo anterior puede deberse a la presencia de derivados de furfural provenientes de la deshidratación de azúcares durante el pretratamiento y/o sacarificación. En efecto, se determinaron 0.658 y 0.800 g/L_{jarabe} de furfural y HMF, respectivamente; lo cual

provocó la disminución de la capacidad fermentativa de la levadura *S. cerevisiae* en el jarabe proveniente del pretratamiento de ácido diluido. Lo anterior no se observó en la fermentación de los otros jarabes debido a que no presentan derivados de furfural como se demostró mediante el análisis por HPLC. Así, la eficiencia de la fermentación aumentó en el orden ácido < básico (15% w/v) < organosolv < lavado.

RECOMENDACIONES

El aumento del rendimiento de etanol mediante el pretratamiento-sacarificación de ácido diluido puede realizarse mediante la destoxificación del jarabe antes de efectuar la fermentación, de tal manera que disminuya el contenido de los derivados de furfural, que inhiben la actividad fermentativa de la levadura.

Por otra parte, es necesario variar las condiciones del pretratamiento organosolv para evitar que el sólido se degrade durante el pretratamiento. Así, se espera poder efectuar la sacarificación del sólido pretratado por organosolv que resulte en azúcares disponibles para la fermentación a etanol.

Es recomendable aumentar el contenido de sólidos en la etapa de pretratamiento y sacarificación de manera que se reduzca substancialmente el volumen de agua utilizada y se aumente la relación de biomasa/catalizador.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril, D., Abril, A (2004) Ethanol from lignocellulosic biomass. *Cien. Inv. Agr.* 36:177-190.
- Adler, Erich (1976). Lignin Chemistry – Past, Present and Future. *Wood Science and Thecnology.* 11:169-218.
- Adrados, P & Mat, G. (2004). Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology* 7:843-850.
- Almeida C., Esteves B. (2006). Nouveaux Défis pour les Biocarburants Brésiliens. *Biofutur* 269:32–36.
- Almeida, J., & Magnus B.(2009). Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:625-638.
- Araque, E., Parra, C., Freer, J., Contreras, D., Rodríguez, J., Mendonca, R., Baeza, J. (2008) Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* .43: 214–219.
- Atiyeh, H, & Duvnjak, Z. (2002). Production of fructose and ethanol from sugar beet molasses using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858. *Biotechnology Progress*, 18: 234-239.
- Atwell, W.A. (2001). An overview of wheat development, cultivation, and production. *Cereal Foods World* 46: 59–62.

- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabanas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M. (2006). Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 130:496–50.
- BeMiller, J.N. (2003) Carbohydrate analysis. In S.S. Nielsen (ed.), *Food Analysis*, 3rd Edn., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp.143-174.
- Brijwani, K , Harinder S Praveen V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry* 45:120–128.
- Camps, M. & Marcos M.F (2008). *Los biocombustibles* 2ª Ed. Madrid: Mundi-Prensa.
- CANIMOLT(Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo), en línea, internet 19 de agosto del 2009, disponible en http://www.harina.org/trigo_grano.php
- Cardona, C. & Sánchez, J., (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. 98: 2415-2457.
- Comisión Europea (2000) “Libro Verde: Hacia una estrategia europea de seguridad del abastecimiento energético”.
- Cui, W., Wood, P.J., Weisz, J. and Beer, M.U., 1999. Non-starch polysaccharides from pre-processed wheat bran: chemical composition and novel rheological properties. *Cereal Chemistry* 76, pp. 129–133.

- Dale, B., Leong, C., Pham, T., Ezquível, V., Ríos, I, Latimer, V. (1996). Hydrolysis of lignocellulosics at low enzyme levels: Application of the AFEX process. *Bioresource Technol.* 56: 111-116.
- Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM (1996). Effects of lignocelluloses degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enz Microb Technol* 19:220–225.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry.* 28:350-356.
- Dunlop A.P. (1948). Furfural formation and behaviour. *Ind. Eng.Chem.* 40: 204- 209.
- Environmental Protection Agency (2007), <http://www.epa.gov/mtbe/faq.html#concerns>
- Fan, L.T., Lee, Y.H. and Gharpuray, M.M., (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.* 23:158–187.
- FAO, Bosques y energía,(Roma: food & Agriculture,2008) pag. 27
- FAOSTAT.FAO, Producción agrícola, en línea, internet 20 de agosto 2009, disponible en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Gómez, J. José, S., Mariana A (2008). *Consideraciones ambientales en torno a los biocombustibles líquidos*. Santiago de Chile: Naciones Unidas. Serie 137:7-9.

- Grethlein, H. & Converse A. (1991). Common aspects of acid prehydrolysis and steam explosion for pretreating wood. *Bioresour.Technol.* 36: 77-82.
- Hendriks, A. & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100:10–18.
- Heitz, M., Carrasco, F., Rubio, M., Brown, A., Chornet, E., Overend, R. (1987). Physico-chemical characterization of lignocellulosic substrates via autohydrolysis: an application to tropical woods. *Biomass* 13: 255-273.
- Kaar, W., Gutiérrez, C., Kinshita, C (1998). Stem explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment of conversion to ethanol. *Biomass Bioenerg.* 14: 33-44.
- Kim, S. & Dale, B. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26: 361–375.
- Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N-O (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enz Microbial Technol* 24:151–159
- Laser, M., Shulman, D., Allen, S., Lihwa, J., Antal, Jr M., Lynd, L. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technol.* 21: 398-404.
- Lemire S., Ashley D., Olaya P. Romieu I., Welch S., Meneses F. and Hernández M. (2004). Environmental Exposure of Commuters in Mexico

- City to volatile Organic Compounds as Assessed by Blood Concentrations 1998. *Salud Pública de México* 46: 5–7.
- Licht, F.O., (2006). World Ethanol Market: The Outlook to 2015, Tunbridge Wells, *Agra Europe Special Report, UK*. 29: 1035-1039.
 - Lin, Y. & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 627–642.
 - Lynd, L. (1996). Overview and evaluation of fuel ethanol from lignocelluloses biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. *Annu. Rev. Energy Environ.* 21: 403-465.
 - Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, H., Pretorius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 66: 506-577.
 - Martinez, A., ME Rodriguez, SW York, JF Preston, and LO Ingram. Effects of Ca (OH)₂ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicelluloses hydrolysates. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 526–536.
 - Mohan, D., Pittman, U. Jr., Steele, P. H. (2006) Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical. *Review Energy & Fuels* 20:848-889.
 - Murphy, J., McCarthy K. (2005). Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied Energy* 82:148–166

- Nathan, M., Charles, W., Bruce, D., Richard, E., Lee, Y., Mark, H., Michael, L. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*. 96: 673- 686.
- Ortiz, R., Sayre, K., Govaerts, B., Gupta, R., Subbarao, G., Ban, T., Hodson, D., Dixon, J., Ortiz-Monasterio, I., Reynolds, M. (2008). Climate change: can wheat beat the heat? *Agriculture, Ecosystems and Environment* 126: 46–58.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B.(2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74:25-33.
- Pamplona, R. & Jorge D (2007). *Salud por los alimentos*. Madrid: safeliz. p. 294-297.
- Papatheofanous, M., Billa, E., Koullas, D., Monties, B., Koukios, E (1998).Optimizing multisteps mechanical-chemical fractionation of wheat straw components. *Ind. Crop. Prod.* 7: 249-256.
- Prasad, S., Singh, A., Joshi, H. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources Conservation and Recycling* 50: 1–39.
- Ramos, A., Assaf, j., Seoud, O., Frollini, E. (2005). Influence of the Supramolecular Structure and Physicochemical Properties of Cellulose on Its Dissolution in a Lithium Chloride/ N,N-Dimethylacetamide Solvent System. *Biomacromolecules*. 6:2638-2647.
- Rezzoug, S. & Capart R. (1996). Solvolysis and hydrotreatment of Wood to provide fuel. *Biomass Bioenerg.* 11: 343-352.

- Saha, B. & Cotta, M. (2006). Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnol Prog.* 22:449–53.
- Saha B., Cotta A. (2007). Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* 18:4528–532.
- Saka, S. (1991). Chemical composition and Distribution. Dekker, New York, pp. 3-58.
- Sánchez, C. & Carmona, C., “Producción de etanol carbúrate I: Obtención a partir de distintas materias primas”, *Interciencia* 1.11(2005): 671-678.
- Sannigrahi, P., Ragauskas A., Miller, S. (2010). Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. *Carbohydrate Research.* 10:1-23.
- SENER, http://www.sener.gob.mx/webSener/res/168/A2_Biomasa.pdf
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), en línea, internet 19 de febrero del 2010, disponible en <http://www.siap.gob.mx>
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M., Zacchi, G (2003) Two- step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. *Biomass Bioenerg.* 24: 475-486.
- Sun, X, Sun, R., Fowlerb, P., Bairdd, M. (2004). Isolation and characterisation of cellulose obtained by a two-stage treatment with

organosolv and cyanamide activated hydrogen peroxide from wheat straw. *Carbohydrate polymers*. 55: 379- 391.

- Sun, Y. & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* 83: 1-11.
- Talebnia F., Karakashev D., Angelidaki I. (2009). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*. 13:4744-53.
- Tengerdy, R., Szakacs, G. (2003). Bioconversion of lignocellulosic in solid substrate fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13: 169-179.
- Torget, R. & Hsu, T. (1994). Two-temperature dilute acid prehydrolysis of hardwood xylan using a percolation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45/46: 5-23.
- Ulbricht, R., Sharon, J., Thomas, J. (1984). A review of 5-hydroxymethylfurfura HMF in parental solutions. *Fundam. Appl. Toxicol.* 4: 843-853.
- UNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar), en línea, internet 19 de agosto del 2009, disponible en <http://english.unica.com.br>
- Verdesio J. (2003). Políticas públicas para la difusión de las nuevas energías renovables. Coloquio: "Energía, reformas estructurales y desarrollo en América Latina". Brasil. <http://www.unb.br/fav/renova/INDEX.html>
- Wooley, R., Ruth, M., Sheehan, J., Ibsen, K., Majdeski, H., Gálvez, A. (1999). *Lignocellulosic biomass to ethanol process design and*

economics utilizing co-current dilute acids prehydrolysis and enzymatic hydrolysis. Current and futuristic scenarios. National Renewable Energy Laboratory. Golden, Co, EEUU. 123pp.

- Wyman, C. (1994). Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.* 50: 3-16.
- Yu Z, Zhang H (2003). Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp.* YZ-1 and *Zymomonas Mobilis*. *Biomass Bioenerg.* 24: 257-262