



FACULTAD DE QUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**EVALUACIÓN DIFERENTES PRETRATAMIENTOS EN LA
PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE LA CÁSCARA DE
CACAHUATE**

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

LILIANA ACOSTA CAPILLA



MÉXICO, D.F

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Raúl Genaro Aguilar Caballero
VOCAL: Profesor: Juan Diego Ortiz Palma Pérez
SECRETARIO: Profesor: Jorge Arturo Aburto Anell
1er. SUPLENTE: Profesor: Armando Conca Torres
2° SUPLENTE: Profesor: Agustín Reyo Herrera

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO

ASESOR DEL TEMA

Jorge Arturo Aburto Anell

SUPERVISOR TÉCNICO

Agustín Reyo Herrera

SUSTENTANTE

Liliana Acosta Capilla

El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la oportunidad de vivir y de haberme puesto siempre en el lugar y tiempo correcto.

Les agradezco profundamente a mis padres que con su apoyo, esfuerzo, amor y ejemplo me han llevado a ser la persona que soy. Su lucha constante me ha demostrado que siempre hay que pelear por nuestros ideales.

A mis hermanos que siempre están en mis éxitos y fracasos, apoyándome incondicionalmente. Gracias por ser ustedes.

A mi abuelita Socorro por su inmenso cariño y dedicación, por todo el tiempo que ha estado conmigo y que de igual manera me ha conducido a lo que hoy soy.

A mis tíos Ramón, José Rubén y Enrique por su gran cariño y porque han sido un gran ejemplo de superación constante.

A Antonio por todas las enseñanzas que me has dado, tu apoyo en los mejores y peores momentos y todas esas inolvidables vivencias a lo largo de estos años que estoy segura que vivirán siempre en mí. Gracias por todos esos consejos que me han llevado a crecer en todos los aspectos de mi vida.

A la UNAM, por haberme forjado tanto en mis estudios universitarios como en mi desarrollo personal. Siempre llevaré el grabado el orgullo de pertenecer a esta institución

A mis profesores, en especial al Dr. Jorge Aburto por sus enseñanzas y lecciones y ser parte fundamental de este trabajo.

A todos mis amigos, compañeros y personas que han pasado por mi vida, por las que se quedaron y por las que pasaron fugazmente porque estoy segura que aprendí algo de todas y me condujeron a ser una mejor persona.

Al Instituto Mexicano del Petróleo por darme la oportunidad y el apoyo de realizar este trabajo en sus instalaciones.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
CAPÍTULO 1. Antecedentes	4
1.1. Bioetanol como combustible	4
1.1.1 Bioetanol.....	4
1.1.2 Generalidades en la producción de etanol.....	6
1.2 Material lignocelulósico: Cáscara de cacahuete	8
1.2.1 Composición de la cáscara de cacahuete	8
1.2.2 Producción mundial de cacahuete	11
1.2.3 Producción nacional de cacahuete y zonas productoras de cacahuete en México	12
1.3 Hidrólisis del material lignocelulósico y conversión a azúcares	13
1.3.1 Métodos de hidrólisis	14
1.3.1.1 Hidrólisis ácida.....	14
1.3.1.1 Hidrólisis enzimática	15
1.4 Métodos de pretratamiento en el material lignocelulósico	17
1.4.1. Mecánico	18
1.4.2. Ácido.....	19
1.4.3 Organosolv	21
1.4.4 Alcalino-Peróxido	22
1.5 Fermentación alcohólica	23
1.5.1 Factores que influyen en la fermentación alcohólica tradicional ...	23

1.5.2 Factores que influye en la fermentación alcohólica a partir de materiales lignocelulósicos	24
1.6 Objetivos e hipótesis	25
CAPÍTULO 2. Metodología y diseño experimental	26
2.1 Proceso global	26
2.2 Métodos experimentales	27
CAPÍTULO 3. Resultados y discusión	47
3.1 Obtención de la harina de cáscara de cacahuete	27
3.2 Lavado de la harina de cáscara de cacahuete.....	48
3.3 Efecto de los pretratamiento en la harina de cáscara de cacahuete.....	50
3.3.1 Obtención de azúcares reductores y totales en los jarabes provenientes de los pretratamientos.....	50
3.3.2 Efecto de los pretratamientos en la estructura de la harina de cáscara de cacahuete: Microscopía Electrónica de Barrido (ASEM).....	54
3.3.3 Efecto de los pretratamientos en la cristalinidad de la celulosa de la harina de cáscara de cacahuete: Difracción de Rayos X.....	56
3.4 Hidrólisis (Sacarificación)	59
3.4.1 Efecto de la sacarificación en la estructura de la harina de cáscara de cacahuete: Microscopía Electrónica de Barrido (ASEM)	63
3.4.2 Efecto de la sacarificación en la cristalinidad de la celulosa de la harina de cáscara de cacahuete: Difracción de Rayos X.....	65
3.5 Fermentación	67
3.6 Obtención de etanol	72

Conclusiones y recomendaciones	75
Bibliografía.....	78

RESUMEN

El presente trabajo se enfoca al estudio de distintos pretratamientos fisicoquímicos de la cáscara de cacahuete con la finalidad de aumentar la accesibilidad de la estructura a agentes de sacarificación que permitan maximizar la generación de azúcares fermentables y así favorecer la producción y rendimiento de etanol. Se realizaron 4 pretratamientos sobre el material lignocelulósico: mecánico, ácido diluido, organosolv y alcalino peróxido. Después del pretratamiento se procedió a realizar una hidrólisis ácida obteniéndose jarabes que fueron caracterizados en relación a los azúcares totales y reductores generados en el proceso así como en la formación de derivados de furfural mediante HPLC. Así mismo, se efectuó la caracterización de sólidos generados con el fin de observar los efectos de cada pretratamiento sobre la estructura y cristalinidad de la celulosa mediante difracción de rayos X (DRX) y microscopía ambiental de barrido electrónico (MABE). Finalmente, se realizó la fermentación de los diferentes jarabes con una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, se cuantificó la cantidad de etanol generada de cada pretratamiento-sacarificación mediante cromatografía de gases.

INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles son todos aquellos que provengan de biomasa y que han sido procesados mediante tratamientos químicos, enzimáticos, físicos o biológicos. Éstos son utilizados como fuente renovable de energía y en algunos casos como sustitutos de combustibles fósiles, es decir, petróleo, gas, carbón, etc. Algunos tipos de combustibles alternativos son el bioetanol, biodiesel, biohidrógeno y biogás.

El bioetanol de segunda generación puede obtenerse a partir de residuos lignocelulósicos por fermentación microbiana de azúcares solubles liberados a partir de la celulosa y hemicelulosa, proveniente de productos forestales, residuos tales como la paja, restos de maíz, bagazo o papel usado; mediante hidrólisis química, enzimática o microbiana.

Los residuos lignocelulósicos contienen una mezcla compleja de polímeros de carbohidratos llamados celulosa y hemicelulosa, además de lignina. La celulosa y la hemicelulosa son los que se pueden hidrolizar en azúcares simples y que son susceptibles de ser fermentados a etanol. Debido a que la lignina es un material polifenólico, no puede ser convertido a etanol mediante fermentación, por lo que forma parte del residuo del proceso.

Durante la última década, el mundo se enfrenta a un agotamiento continuo de los recursos energéticos basados mayoritariamente en combustibles fósiles y por consecuencia, combustibles no renovables. El uso de recursos energéticos renovables provenientes de residuos agrícolas permitirá el aumento de la disponibilidad y la estabilización de los precios de alimentos básicos para el consumo humano, como el maíz, el trigo, el sorgo y la caña de azúcar, oleaginosas, entre otros; y que comúnmente son utilizados para la obtención de bioetanol, biodiesel, biogás y biohidrógeno.

Por otro lado, el uso de residuos agrícolas para la producción de biocombustibles permitirá tener un menor impacto ambiental, debido al reciclaje de éstos subproductos.

El etanol producido a partir de residuos lignocelulósicos puede emplearse como sustituto de agentes oxigenantes como el ETBE (Éter etil-terbutílico) y el MTBE (Éter metil-terbutílico) en mezclas E-5, E-10 y E-20 (el dígito señala el contenido en peso de etanol en la mezcla) sin tener que alterar los motores de los automóviles. De esta manera, se pretende usar un agente oxigenante de las gasolinas más benigno con el medio ambiente que los oxigenantes mencionados, reducir la importación de gasolina y agentes oxigenantes por parte de PEMEX, incentivar la aparición de la industria agroquímica de etanol así como reforzar la seguridad energética.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1. BIOETANOL COMO COMBUSTIBLE

1.1.1. Bioetanol

El etanol o alcohol etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) es el líquido más utilizado de los biocombustibles.

El bioetanol se obtiene a partir de la fermentación de los azúcares contenidos en las siguientes materias primas:

1. Materias ricas en sacarosa: caña de azúcar, remolacha.
2. Materias ricas en almidón: cereales (trigo, maíz, cebada) y tubérculos (patata, yuca).
3. Materias ricas en celulosa: madera, residuos agrícolas, otros residuos de naturaleza lignocelulósica.

A diferencia de los biocombustibles de primera generación que están basados en la producción de etanol a partir de materias primas comestibles, el etanol de segunda generación es obtenido a partir de residuos agrícolas o residuos lignocelulósicos que no comprometen la oferta de alimentos para la alimentación humana y por lo tanto no incide directamente en el precio de los alimentos. No obstante, la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa para la obtención de azúcares fermentables es un paso determinante en la producción de etanol y puede representar hasta un 50% del precio de producción del etanol.

El bioetanol permite substituir parcialmente o totalmente a los combustibles utilizados en vehículos automotorizados así como a los agentes oxigenantes

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

como el Éter metil-terbutílico (MTBE, por sus siglas en inglés) y el Éter etil-terbutílico (ETBE, por sus siglas en inglés) ya que éste aumenta el octanaje y reduce la emisión de contaminantes, p. ej. 10-15% menos de monóxido de carbono e hidrocarburos (Vázquez, H., Dacosta, O., 2007). El etanol se puede mezclar con la gasolina sin plomo de un 10 a 25% sin necesidad de modificar los motores de los vehículos.

En México, el etanol se produce principalmente a partir de azúcar de caña. Alrededor del 50% de los 58 ingenios azucareros cuentan con infraestructura para la producción de etanol. En los últimos años, la industria azucarera ha tenido crisis debido a la importación de fructosa para su uso como edulcorante.

No se espera que el combustible etanol desplace completamente a la gasolina del mercado en ningún momento. Por el contrario, el etanol puede alargar los recursos petrolíferos logrando una moderada cuota de mercado y ahorrando gasolina para el futuro.

La Secretaría de Energía (SENER), recomienda un programa de introducción gradual del etanol con tres fases o escenarios. En la primera fase (2007-2012) se tendría como meta producir 411.9 miles de m³ de etanol el cual se obtendría principalmente de mieles de caña de azúcar y se dirigiría a reemplazar al metanol en los éteres producidos en el mercado nacional (MTBE y TAME) para fabricar ETBE. El etanol como componente del ETBE fabricado en México correspondería a una penetración del 5.7% en volumen de un porcentaje de las gasolinas suministradas a las Zonas Metropolitanas.

Para 2012, y sobre la base de etanol de jugo de caña de azúcar de cultivo de temporal en pastizales y tierras marginales, así como en proyectos de etanol que podrían desarrollarse a partir de otros insumos, podría tener lugar la sustitución del 5.7% de todas las gasolinas de las áreas metropolitanas, correspondiendo a una demanda de 1,110.6 miles de m³. De 2012 en adelante, y sobre la base de caña de azúcar y otros posibles insumos, como el cultivo múltiple anual sorgo dulce o maíz, el 10% de todas las gasolinas en México podría ser reemplazado por etanol, correspondiendo a una producción de

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

4,406.3 miles de m³. En todos estos desarrollos podría haber oportunidades para la exportación e importación de etanol, directamente o como ETBE. (Maser, O., Rodríguez. N, (2006))

1.1.2. Generalidades de la producción de etanol

El empleo de alcohol industrial comenzó a principios del siglo XIX con el surgimiento de la industria de la síntesis química que perduró por muchos años. Debido a la actual demanda energética, el etanol procedente de la fermentación ha ganado relevancia. En los países con gran excedente agrícolas (Brasil, Estados Unidos, Canadá y Sudáfrica) se ha obtenido por fermentación el etanol a partir de materias primas ricas en carbohidratos como la sacarosa, almidón y los materiales celulósicos.

Generalmente, el etanol se obtiene mediante procesos continuos (Figura 1.) , en donde la fermentación del mosto se lleva a cabo en un tanque cilindro-cónico inoculado con una levadura que se cultivó en un medio aparte. La multiplicación continua de la levadura se realiza en un tanque de pre-fermentación con jarabes azucarados esterilizados que sirven de inóculo para el tanque de fermentación principal. Entre las etapas de fermentación y destilación, la levadura se puede separar e inocularse en otro sustrato para una siguiente fermentación. Si se emplean materiales amiláceos o mezcla de cereales enteros, no es posible recuperar la levadura de la mezcla de fermentación el residuo, y se utiliza para la alimentación animal y se comercializa como granos de destilería deshidratados, en lugar del gluten de maíz. (Ricord, E, .1990)

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

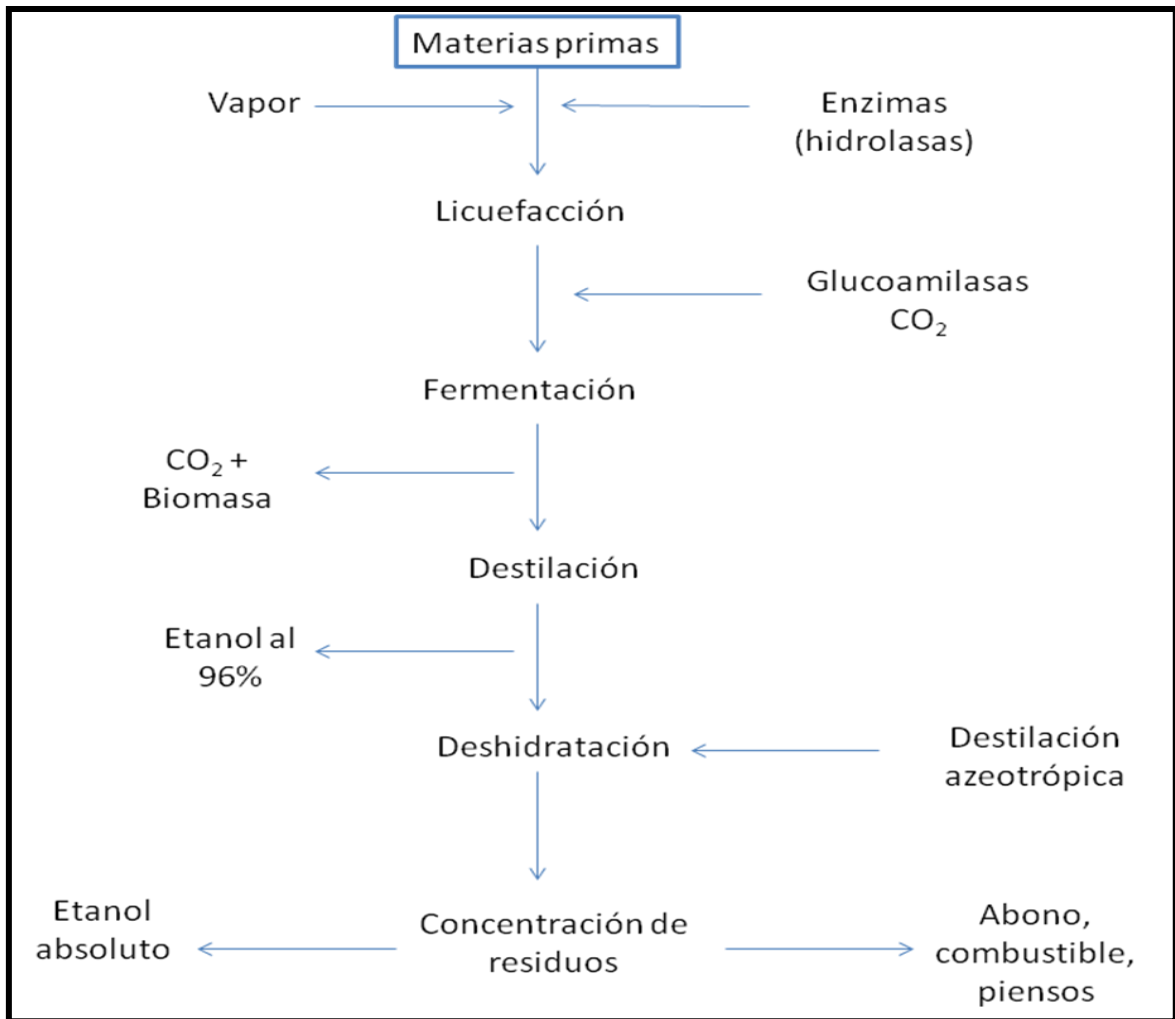


Figura 1. Diagrama de un proceso clásico de fermentación continuo para la producción de etanol.

La fermentación clásica se desarrolla en 3 fases.

- Las primeras 12-24 horas, la levadura se multiplica rápidamente en condiciones aerobias.
- La fase intermedia que ocurre de 12 -48 horas se obtiene el alcohol, con la sacarificación posterior de oligosacáridos presentes en el jarabe (melazas), mientras que se presenta la muerte de las células fermentativas acompañada de la liberación de calor.
- La fase final que se da entre las 48 y 72 horas en donde disminuye la producción de etanol.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.2. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO: CÁSCARA DE CACAHUATE

1.2.1. Composición de la cáscara de cacahuate

La composición química de la cáscara de cacahuate consiste principalmente de fibra cruda, en la que se resalta la celulosa y la lignina (Tabla 1). Sin embargo un análisis más detallado nos muestra la presencia de polímeros de celulosa (glucano), xilano y mananos; así como de azúcares libres de tipo pentosas (Tabla 2).

Componente	%
Humedad	8-10
Proteína cruda	6-7
Grasa	1-2
Fibra cruda	60-67
Celulosa	35-45
Lignina	27-33
Cenizas	2-4

Tabla 1. Composición química de la cáscara de cacahuate según Woodroof (1983)

Componente	%
Lignina	34.8
Glucano	21.1
Extractivos	14.2
Proteína	11.1
Xilano	7.9
Cenizas	3.4
Arabinosa	0.7
Galactano	0.2
Mananos	0.1
Otros (carbohidratos libres)	6.5

Tabla 2. Composición química de la cáscara de cacahuate. Yeboah, et. Al (2003)

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

La fibra celulósica está formada por regiones cristalinas separadas por regiones amorfas o menos cristalinas. Una de las fracciones más abundantes en la estructura vegetal de la cáscara de cacahuate es la celulosa. La celulosa, es un polímero lineal de glucosa unido por enlaces β -(1, 4)-glucosídicos. La unidad básica está constituida por unidades de celobiosa, es decir, dos glucosas anhidras unidas por enlace β (Figura 3.). Las cadenas de celulosa interactúan entre sí mediante puentes de hidrógeno y forman las llamadas microfibrillas. Estas fibrillas están ligadas entre sí por la hemicelulosa, polímeros amorfos de diferentes azúcares y otros polímeros como pectina y cubiertos por cadenas de lignina. La compleja y rígida estructura de la celulosa la hace resistente a tratamientos químicos, físicos y biológicos (Taherzadeh, M, Karimi, K. 2008).

Las moléculas de celulosa forman enlaces por puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. La presencia de estos enlaces tiene un efecto importante en la reactividad que presentan las cadenas celulósicas. Las zonas de elevada cristalinidad son difíciles de penetrar por disolventes, reactivos y enzimas. Por el contrario, las zonas amorfas son más accesibles y más susceptibles a todas las reacciones químicas.

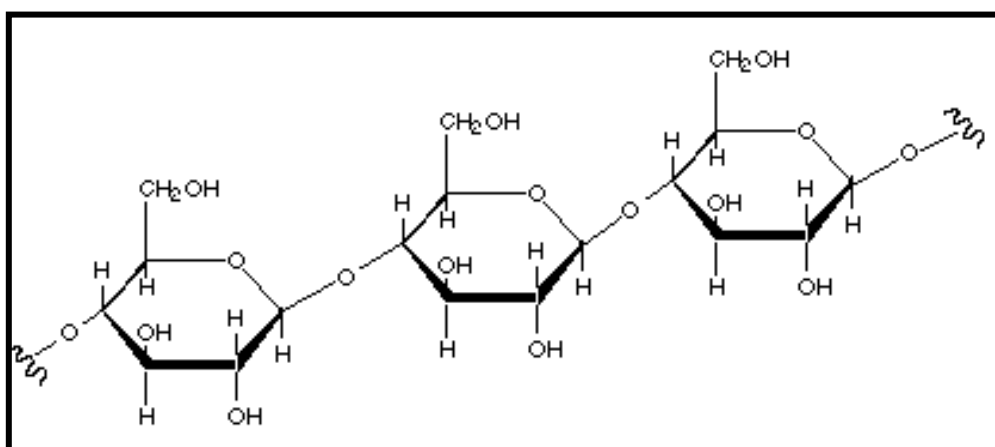


Figura 3. Estructura molecular de la celulosa

La hemicelulosa es un heteropolisacárido compuesto de galactosa, glucosa, arabinosa y pocas cantidades de ramnosa, ácido glucurónico, ácido metil glucurónico y ácido galacturónico. En contraste con la celulosa, que es

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

cristalina y fuerte, la hemicelulosa tiene una estructura amorfa y ramificada al azar con poca resistencia a la hidrólisis, pero pueden llegar a serlo cuando son sometidos a condiciones ácidas (Taherzadeh, M, Karimi, K. 2008).

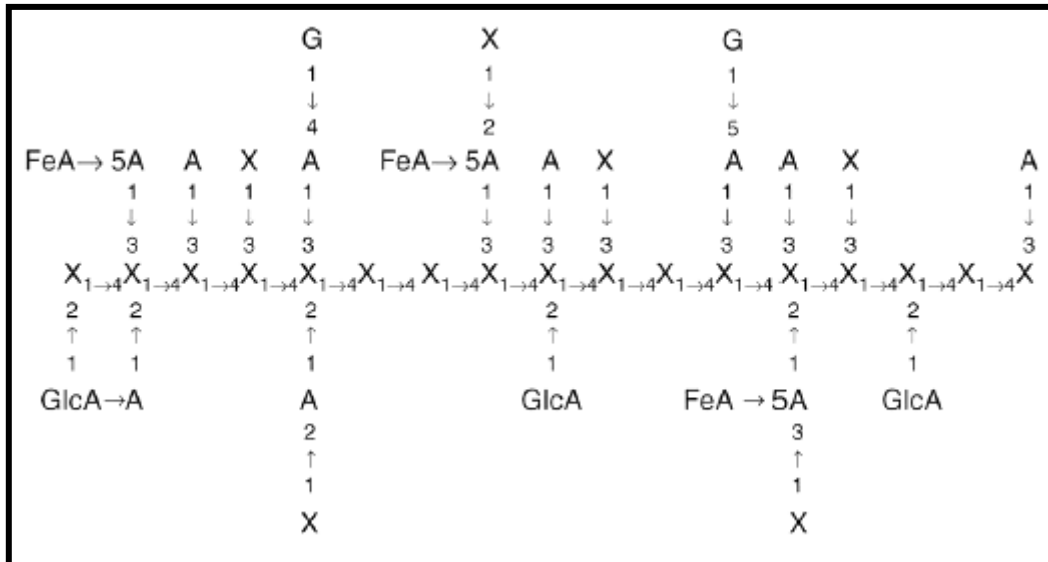


Figura 4. Estructura química básica de la hemicelulosa. A: arabinosa, FeA: ácido ferúlico, G: galactosa, Glc: ácido glucorónico, X: xilosa (Gray, K., Zhao, L., Emptage, M., 2006).

La lignina, después de la celulosa y hemicelulosa es el polímero más abundante en la naturaleza. Es una molécula muy compleja constituida de 3 unidades de fenilpropano (alcohol p- cumarílico, coniferílico y sinapílico) unidas en una estructura tridimensional. La lignina puede ser el componente más recalcitrante de la pared celular vegetal en donde más alta sea la proporción de lignina, habrá más resistencia a degradación química o enzimática, no es soluble y su estructura es ópticamente inactiva, por tal motivo, la lignina es uno de los inconvenientes de la fermentación de materiales lignocelulósicos (Taherzadeh, M, Karimi, K. 2008).

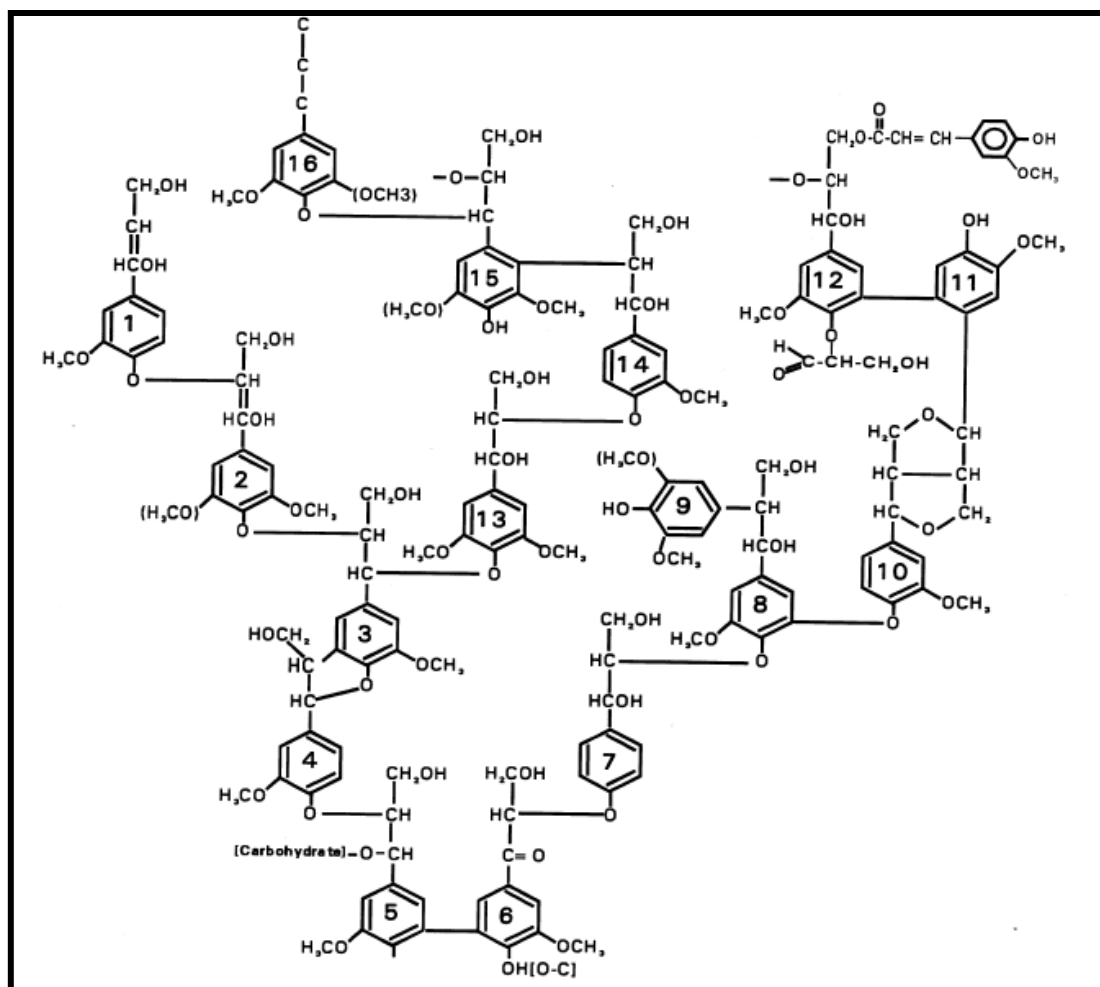


Figura 5. Estructura molecular de lignina (Lee, J. 1997)

1.2.2. Producción mundial de cacahuate

La producción mundial de cacahuate se estima aproximadamente en 38, 216,299 toneladas (FAO, 2008). El país con mayor producción de cacahuate es China con 14 millones de toneladas seguido por India con 7 millones de toneladas (Tabla 3).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

País	Producción (1000 toneladas)
China	14341075
India	7168000
Nigeria	3900000
Estados Unidos de América	2341630
Indonesia	773797
Argentina	625349
Ghana	470100
Brasil	312802
México	80735

Tabla 3. Producción mundial de cacahuete (FAO, 2008)

1.2.3. Producción nacional de cacahuete y zonas productoras de cacahuete en México

La planta de cacahuete se cultiva en México en mayo y la cosecha se recolecta a finales del otoño. La producción general en el 2008 fue de 80735 toneladas (Tabla 3) y abarca 23 de los 31 estados de toda la república. El área de cultivo de la planta es, a nivel nacional, de 90 mil hectáreas. Oaxaca, Puebla, Chihuahua, Sinaloa, Chiapas y Guerrero son los mayores estados productores de cacahuates, con un 80 por ciento de su total (Tabla 4).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Estado	Producción (toneladas)	Estado	Producción (toneladas)
Campeche	375.00	Nayarit	1,763.80
Chiapas	22,680	Oaxaca	8,675.04
Chihuahua	10,908.10	Puebla	10,729.88
Colima	93.30	Querétaro	9.00
Durango	352.20	San Luis Potosí	4,094.70
Guanajuato	2,422.56	Sinaloa	20,554.26
Guerrero	4,201.77	Sonora	932.70
Hidalgo	373.60	Tamaulipas	87.00
Jalisco	698.31	Veracruz	415.71
México	155.50	Yucatán	34.10
Michoacán	585.20	Zacatecas	221.10
Morelos	1,955.30		

Tabla 4. Estados productores de cacahuate en México (SIAP, 2007)

1.3. HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO Y SU CONVERSIÓN A AZÚCARES

Para la fermentación de materiales lignocelulósicos, la celulosa y hemicelulosa deben ser hidrolizados a azúcares simples empleando medios ácidos o enzimas. El complejo de hemicelulosa es convertido a una mezcla de azúcares solubles de cinco carbonos, xilosa y arabinosa, y azúcares solubles de seis carbonos, manosa y galactosa. Una pequeña parte de la celulosa también es convertida a glucosa en este paso.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

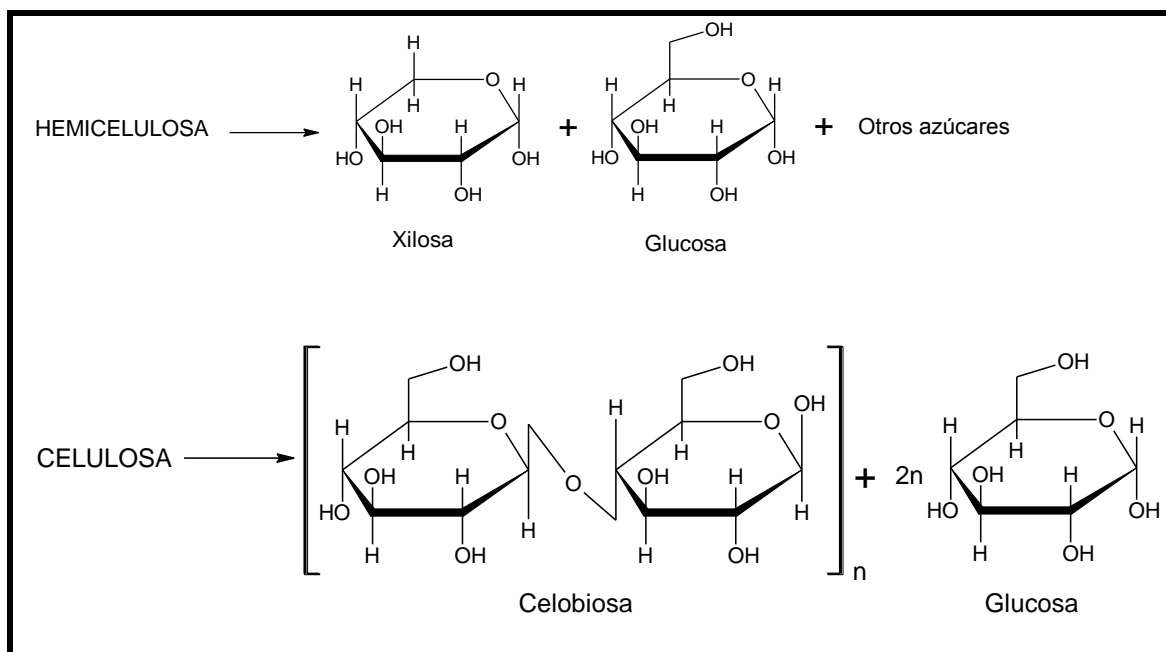


Figura 7. Esquema de la reacción de hidrólisis de la hemicelulosa y de la celulosa.

1.3.1. Métodos de hidrólisis

1.3.1.1. Hidrólisis ácida

Las técnicas de sacarificación química de la celulosa se pueden realizar a través de medios ácidos que pueden ser:

- Hidrólisis con ácido concentrado a baja temperatura (20-25°C)
- Hidrólisis con ácido diluido en caliente (170°C en adelante)

Los tratamientos con ácido diluido se aplican a los materiales verdes sin secado previo pero acarrear importantes problemas de corrosión a altas temperaturas. Se aplican principalmente a vegetales de escaso contenido de pentosanos (fracción de hemicelulosas constituidas por los azúcares en C₅). El ácido utilizado es el sulfúrico generalmente (Paquot, M., Thonart, P., 1986). Para hidrolizar la celulosa cristalina se emplean condiciones con ácido diluido (H₂SO₄ o HCl) a temperaturas entre 180 y 230°C a una concentración de 1.5% de ácido y se obtienen rendimientos del 50-60% en el caso de la celulosa de la madera. Sin embargo, algunos procesos de sacarificación con ácido diluido se

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

realizan con una concentración que va de 30 a 70 % de H₂SO₄ (Sánchez, O., Cardona, C., 2008). En estas condiciones se presenta la degradación de glucosa en HMF (Hidroximetilfurfural) así como la degradación de las pentosas a furfural y otros compuestos indeseables.

Los tratamientos con ácido concentrado se aplican mejor a los vegetales ricos en pentosanos y no implican problemas de corrosión tan significativos. Esta técnica requiere de un material de poca humedad. El ácido que se utiliza generalmente es el clorhídrico.

La celulosa amorfa y las hemicelulosas se hidrolizan con bastante rapidez. Durante la hidrólisis, el grado de cristalinidad de la celulosa aumenta y la rapidez de la hidrólisis disminuye: la estructura compacta y organizada de la red aminora el ataque del ácido, que sólo tiene lugar en la superficie (Paquot, M., Thonart, P., 1986).

En el proceso de hidrólisis la fracción amorfa de la celulosa va disminuyendo, dando lugar a azúcares simples así como derivados de furfural. La hemicelulosa en la primera en hidrolizarse a azúcares, principalmente xilosa. En segundo término se presenta la degradación de la celulosa amorfa y por último la hidrólisis de la celulosa cristalina (que es la menos susceptible a la hidrólisis). La producción de derivados de furfural es directamente proporcional a la concentración del ácido y el tiempo de reacción de la sacarificación. La hidrólisis del material lignocelulósico está limitada a varios factores como la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización y contenido de lignina (Hendricks, A., Zeeman, G., 2009).

1.3.1.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa es llevada a cabo por celulasas de alta especificidad. Los productos de la hidrólisis son generalmente azúcares reductores. Las celulasas utilizadas para la hidrólisis, se pueden obtener tanto de bacterias como de hongos y pueden ser termofílicas o mesofílicas y aerobias o anaerobias. Algunas de las bacterias que producen celulasas y son

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

utilizadas para este fin pueden ser: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, y *Streptomyces*. Mientras que algunos hongos productores de celulasas son: *Sclerotium rolfsii*, *P. chrysosporium* y especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium*.

Las celulasas son hidrolasas que se encuentran en forma de conjunto enzimático que involucra a 3 principales enzimas:

- a) Endoglucanasas (EG endo-1,4-D-glucanohidrolasa EC 3.2.1.4). Actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos de la celulosa (regiones de baja cristalinidad) y la convierte en oligosacáridos. (Figura 8.)

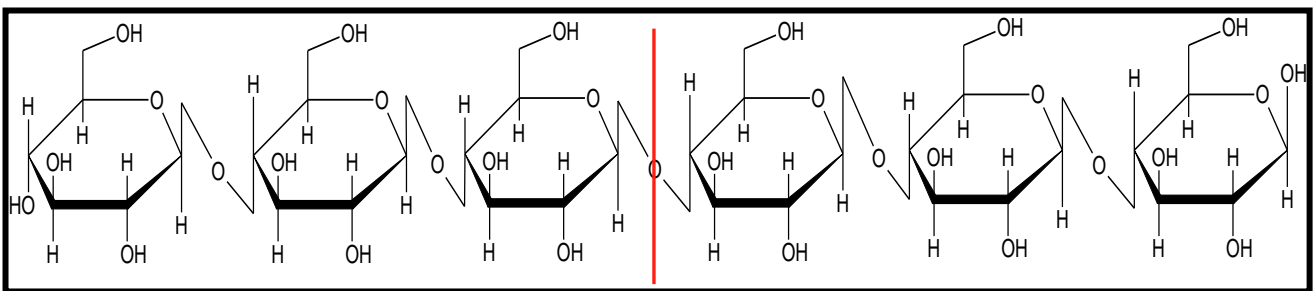


Figura 8. Representación de la ruptura de la celulosa en oligosacáridos

- b) Exoglucanasas o Celobiohidrolasas (CBH, 1,4-b-D-glucan cellobiohidrolas: EC 3.2.1.91.). Corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa. (Figura 9.)

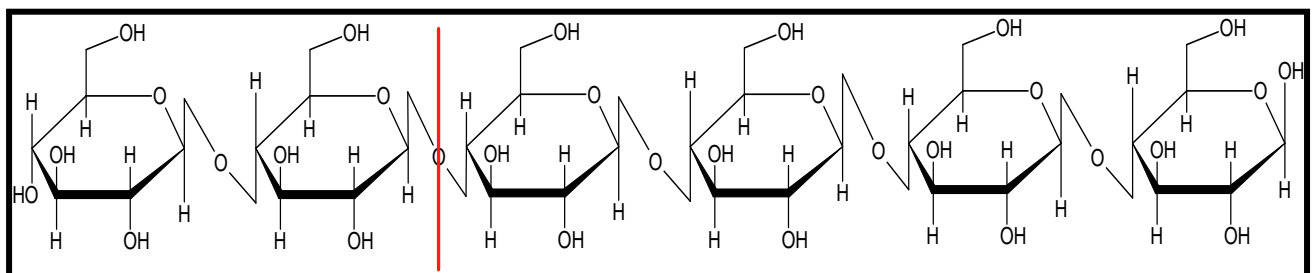


Figura 9. Representación de la ruptura de la celulosa en moléculas de celobiosa

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

- c) β -glucosidasa (EC 3.2.1.21). Hidroliza la celobiosa para producir moléculas de glucosa.

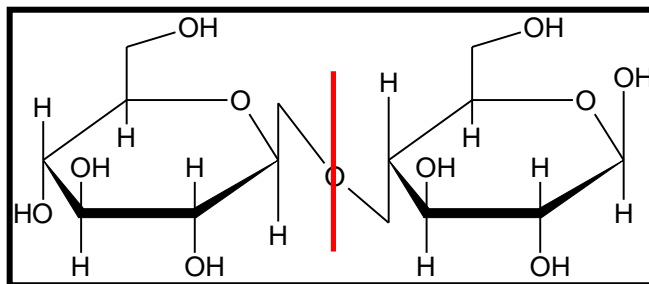


Figura 10. Representación de la ruptura de la celobiosa en moléculas de glucosa

También existen enzimas auxiliares que atacan a la fracción de hemicelulosa como la glucuronidasa, acetilesterasa, xilanasa, β -xilosidasa, galactomanasa y glucomanasa. (Sun, Y., Cheng, J., 2002)

1.4. MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE LA CÁSCARA DE CACAHUATE.

El objetivo de realizar un pretratamiento sobre la cáscara de cacahuete es alterar la estructura y/o remover los compuestos que impiden la hidrólisis de los polisacáridos p. ej. la eliminación de grupos acetilo de la hemicelulosa y romper la unión entre la hemicelulosa y la lignina. Lo anterior con el fin de incrementar el rendimiento de azúcares fermentables provenientes de la celulosa y hemicelulosa de la pared celular mediante hidrólisis. Durante el pretratamiento es usual que la fracción de hemicelulosa, material amorfo, sufra cierto grado de hidrólisis a oligosacáridos y azúcares simples.

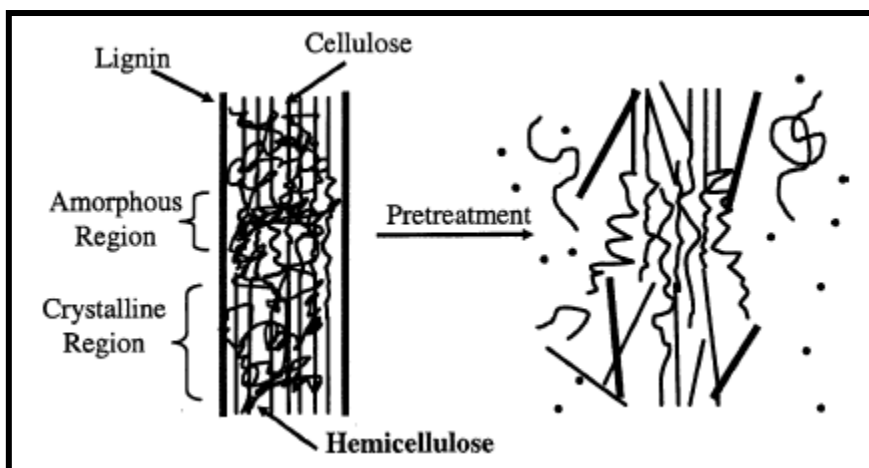


Figura 11. Esquema de los objetivos del pretratamiento sobre biomasa lignocelulósica (Mosier, N et al, 2005).

1.4.1. Pretratamiento mecánico

El objetivo de este tipo de pretratamiento es la ruptura de la estructura cristalina y la reducción de tamaño del material lignocelulósico haciéndolo más accesible a los tratamientos químicos o biológicos posteriores para la remoción de la lignina y la hidrólisis de la hemicelulosa. La reducción del tamaño de partícula conduce a un incremento de la disponibilidad específica de la superficie y una reducción del grado de polimerización (G.P) (Hendriks, A, Zeeman, G., 2009).

Los residuos lignocelulósicos pueden ser pulverizados por una combinación de astillado, trituración y molienda para reducir la cristalinidad de la celulosa. El tamaño de los materiales es generalmente de 10-30 mm después de astillado y 0.2-2 mm después de la molienda o trituración. La molienda de bolas vibratoria, ha resultado ser más eficaces para romper la cristalinidad de celulosa que mejora la digestibilidad de la biomasa (Sun, Y., Cheng, J., 2002).

Debido a que en este pretratamiento no se generan derivados de furfural (los cuales limitan el proceso de fermentación), los rendimientos de etanol pueden ser mayores en comparación a otros pretratamientos; sin embargo, la desventaja que presenta es la gran demanda energética que implica el proceso de molienda por lo que puede considerarse poco viable económicamente.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.4.2. Pretratamiento ácido diluido

En este tipo de tratamiento, se utiliza ácido sulfúrico que se mezcla con la biomasa para hidrolizar la hemicelulosa, xilosa y otros azúcares. Sin embargo los azúcares generados pueden oxidarse en éstas condiciones a furfural e hidroximetilfurfural, que pueden inhibir los procesos subsecuentes al pretratamiento. (Figura 11 y Figura 12.)

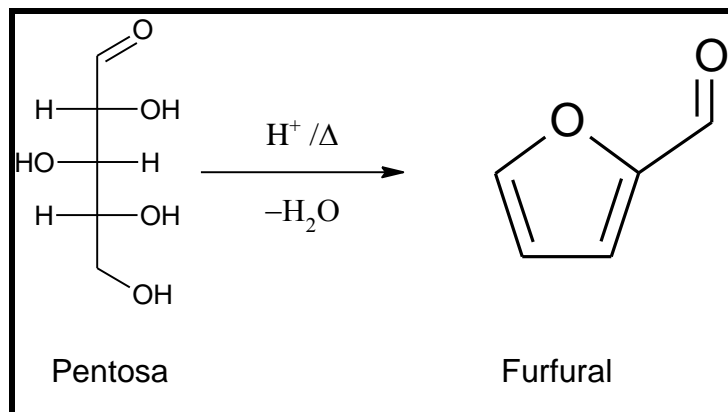


Figura 11. Obtención de furfural a través de la deshidratación de pentosas

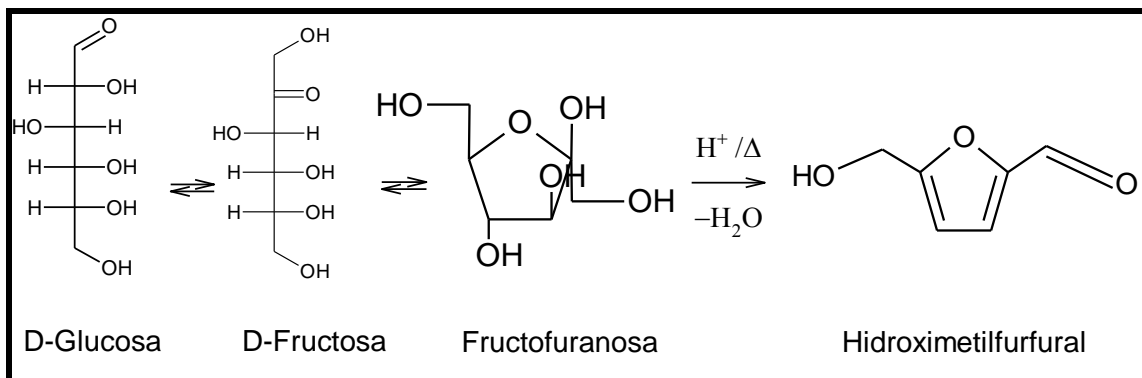


Figura 12. Obtención de HMF a través de la deshidratación de hexosas

Para la hidrólisis ácida de material celulósico, el ácido más usado y en el que más se ha enfocado las pruebas es el sulfúrico diluido, sin embargo, el ácido nítrico, el ácido clorhídrico y el ácido fosfórico, también han sido utilizados para el mismo fin (Mosier, N et al, 2005).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Modo de acción

La principal reacción que se produce durante el pretratamiento ácido es especialmente la hidrólisis de hemicelulosa, mientras que la fracción de xilano al ser relativamente estable al ácido y poco soluble en éste llega a precipitar. Los oligómeros provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa se solubilizan y en estas condiciones pueden producir monosacáridos, furfural, HMF y otros compuestos volátiles. Durante el pretratamiento ácido también se solubiliza la lignina que rápidamente se condensa y precipita en el medio ácido.

El pretratamiento ácido diluido aumenta la superficie y el volumen de poros mediante la eliminación de la fracción de hemicelulosa del material vegetal, pero tiene poco efecto sobre el índice de cristalinidad de la celulosa (Weil, J., Westgate, P. et. Al 1994). Se efectúa la hidrólisis de los enlaces tipo éter, presentes en la lignina y la unión entre la lignina y la hemicelulosa. Según las condiciones de reacción (concentración del ácido, temperatura y tiempo) se podrán hidrolizar los enlaces glucosídicos de la hemicelulosa y la celulosa para formar azúcares fermentables (proceso de sacarificación). También en estas condiciones se degradan algunos aminoácidos de las proteínas presentes por la acción del ácido (Ferrer, 2008).

Descripción del proceso

La biomasa en condiciones ácidas se calienta a temperaturas entre 160-220°C por minutos o segundos. El ácido cataliza la reacción de hidrólisis de la celulosa en monómeros de glucosa, seguido de la oxidación de la glucosa a HMF y otros productos de degradación mediante deshidratación por calor y medio ácido de la reacción. Algunos modelos cinéticos han sido modificados para incluir la hidrólisis de la hemicelulosa a oligosacáridos seguida por su ruptura a azúcares simples, donde éstos se degradan a furfural y otros compuestos. (Mosier, 2005)

La mezcla de ácido con la biomasa puede ser calentada indirectamente a través de las paredes de los vasos o por inyección directa de vapor. El ácido es

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

añadido al líquido filtrado por una cama, rociado sobre el residuo, después de lo cual éste es calentado o agitado con la biomasa en un reactor. El ácido debe ser neutralizado antes de proceder a la fermentación de azúcares. La formación de productos de degradación y liberación de inhibidores de fermentación de biomasa naturales es otra característica del pretratamiento ácido (Mosier, N et al, 2005). Se han estudiado numerosos materiales vegetales no comestibles, tales como maíz (incluyendo hojas, mazorcas y olote), mezclas de madera (10% de arce y 90% abedul) y han sido sometidos a temperaturas entre 125 y 220°C durante 8 segundos. (Mosier, 2005)

1.4.3. Pretratamiento Organosolv

El pretratamiento organosolv permite la remoción efectiva de material recalcitrante de la biomasa lignocelulósica. Las ventajas que presenta este método es que no es necesaria una operación de reducción de tamaño de partícula aún y cuando se parte de material de gran tamaño, se genera un sustrato celulósico fácilmente digestible y se produce lignina de alta pureza y calidad con potencial de usos de alto valor agregado. (Zhu, J., Pan, X., 2010) Durante este proceso se provoca la hidrólisis de la lignina y la ruptura de las uniones que existen con la fracción de hemicelulosa que se solubilizan en la fase acuosa de la reacción, dejando libre a la fracción celulósica en la fase sólida.

En el proceso de organosolv, una mezcla orgánica o un disolvente acuoso-orgánico con catalizadores inorgánicos ácidos (HCl o H₂SO₄) es usada para la ruptura de lignina y de hemicelulosa. Los disolventes orgánicos usados en el proceso incluyen el metanol, el etanol, la acetona, etilenglicol y trietilenglicol. Los ácidos orgánicos como el oxálico, acetil-salicílico y el ácido salicílico también pueden ser usados como catalizadores para éste tipo de pretratamientos. Para procesos por encima de 185°C no es necesaria la adición de catalizadores ácidos para la deslignificación de la materia prima (Sun, Y., Cheng, J., 2002).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Por lo general, se obtiene un alto rendimiento de xilosa con la adición de ácido. Es necesaria la eliminación de disolventes del sistema ya que los disolventes pueden ser inhibitorios para el crecimiento de organismos, la hidrólisis enzimática y la fermentación. También se pueden usar otros disolventes orgánicos, como cetonas, n-propilamina, con el inconveniente de que éste puede inhibir la función enzimática de las celulasas durante la hidrólisis. También se puede emplear etilendiamina para la solubilización de la hemicelulosa y la lignina de los residuos lignocelulósicos (Sun, Y., Cheng, J., 2002).

1.4.4. Pretratamiento Peróxido-Alcalino

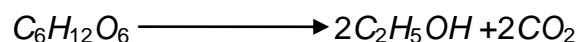
Durante el pretratamiento peróxido-alcalino se promueve la disminución de la cristalinidad de la celulosa, obteniendo zonas más amorfas que son más susceptibles a la hidrólisis posterior de la celulosa. El proceso puede mejorar la hidrólisis por la deslignificación y porque también incrementa el hinchamiento y el volumen del poro de la celulosa y disminuye la cristalinidad de la celulosa. (Weil, J., Westgate, P. et. Al 1994). Mediante el pretratamiento básico-oxidante de los residuos lignocelulósicos, se sumergen en agua de pH ajustado (por ejemplo, a pH 11-12 usando NaOH) con H₂O₂ a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo (por ejemplo 6-24 h.)

El tratamiento álcali se basa fundamentalmente en la hidrólisis de los enlaces éster que se encuentran uniendo la fracción de hemicelulosa con la fracción de la lignina y los grupos acetilos de la xilosa. Se presenta la solubilización de la hemicelulosa y de la lignina; en el caso de la hemicelulosa se da la neutralización los ácidos urónicos presentes y en el de la lignina se da la formación de fenóxidos que son moléculas solubles en agua. Las proteínas contenidas en la materia vegetal pueden solubilizarse o precipitarse por la presencia del medio alcalino.

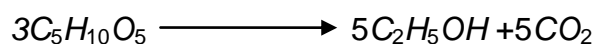
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.5. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica es una biorreacción que permite convertir azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



Saccharomyces cerevisiae es la especie de levadura usada con más frecuencia. Por otro lado, existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como *Zymomonas mobilis*, que puede fermentar azúcares de 5 carbonos (pentosas) como la xilosa, provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa. Las condiciones en las que se realiza la fermentación bacteriana son en un rango de pH 5-7 y a temperaturas entre 30 y 37 °C.



La glucosa es la primera que se fermenta para producir etanol, seguido por la fermentación de xilosa a un ritmo más lento. El rendimiento global futuro depende fuertemente del desarrollo de microorganismos más barato y más eficientes en la fermentación.

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 gramos de etanol y 0.489 gramos de dióxido de carbono por un gramo de glucosa. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% con respecto al teórico. (Vázquez, H., Dacosta, O., 2007)

1.5.1. Factores que influyen en la fermentación alcohólica tradicional

pH: Debido a que la acidez en el citoplasma de las levaduras está en el rango de la neutralidad, el aumento o disminución del pH provoca un bloqueo del metabolismo de los microorganismos y, por lo tanto, una reducción de la capacidad de fermentación. Por lo que el proceso fermentativo debe oscilar en un rango de pH entre 4-6.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Oxígeno disponible: Aunque la fermentación alcohólica es una reacción de tipo anaerobia, las levaduras necesitan sintetizar esteroides y ácidos grasos (factores de supervivencia) que forman parte de la membrana celular relacionados con la flexibilidad y permeabilidad de la membrana. La disminución del oxígeno disponible afectaría de tal manera que disminuiría la población de microorganismos encargados de la fermentación.

Temperatura: Las levaduras crecen en rangos de temperatura entre 10 y 32°C, por lo que un aumento o disminución afectaría en la tasa de reproducción.

1.5.2. Factores que influyen la fermentación alcohólica a partir de residuos lignocelulósicos.

Durante el pretratamiento e hidrólisis de los residuos lignocelulósicos, una gran cantidad de compuestos pueden inhibir la fermentación de los azúcares. Los compuestos inhibitorios son generados como el resultado de la hidrólisis de los compuestos extractivos provenientes de la hemicelulosa (ácido acético, fórmico, glucurónico, galacturónico) y derivados fenólicos solubilizados. Por otro lado, se sintetizan compuestos que inhiben la fermentación producidos a partir de la degradación de los azúcares solubles (derivados de furfural) y de lignina (cinamaldehído, p-hidroxibenzaldehído). (Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B., 1996)

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.6. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Evaluar distintos tipos de pretratamientos en la celulosa y hemicelulosa presentes en la cáscara de cacahuete con el fin de aumentar el rendimiento en la sacarificación y fermentación de azúcares simples para la obtención de bioetanol a costos bajos.

Objetivos particulares

Evaluar técnicas experimentales que permitan obtener altos rendimientos en la producción de bioetanol.

Identificar las variables del proceso que optimizan la obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos.

Realizar un análisis económico de la obtención de bioetanol con residuos agroindustriales.

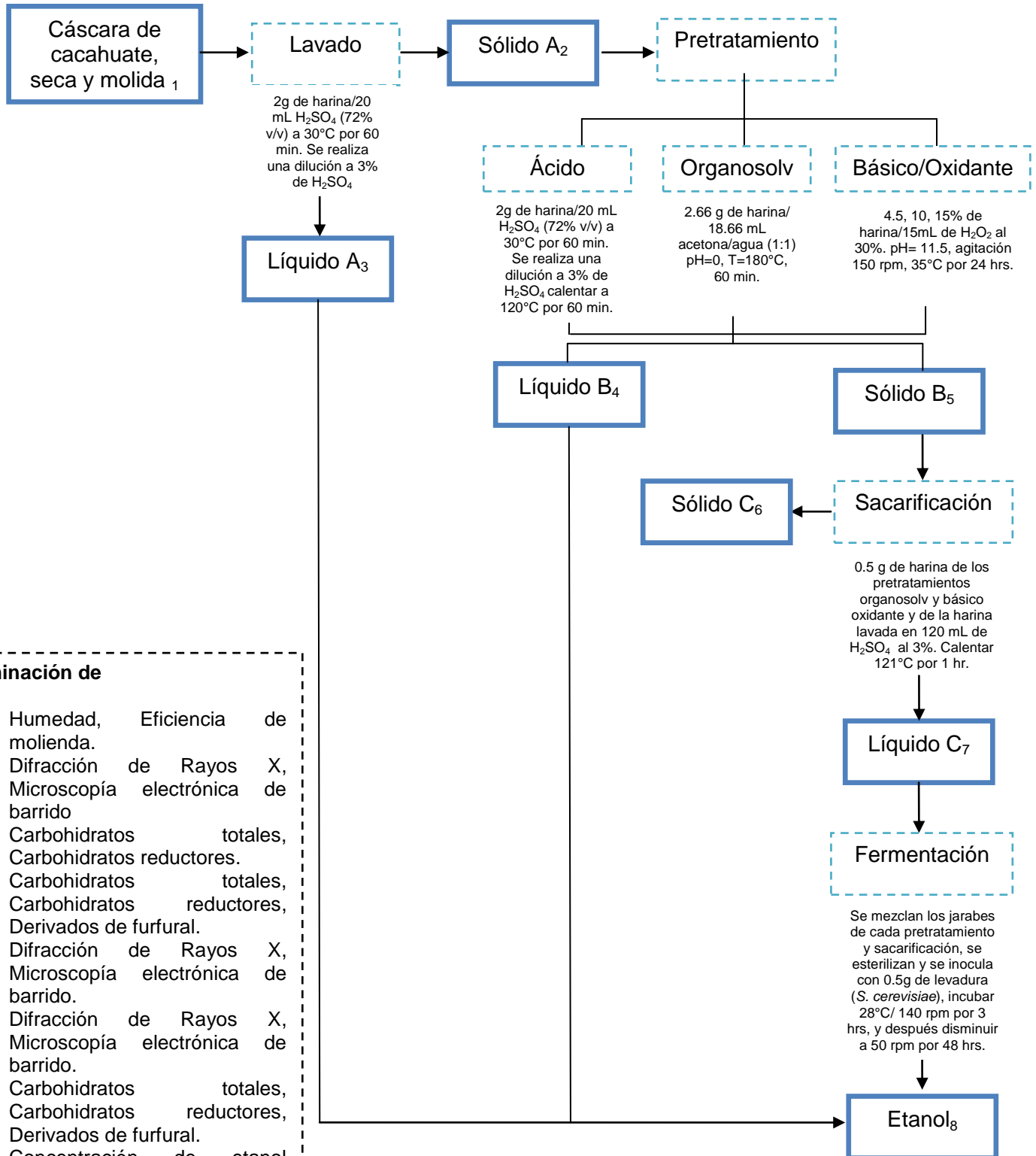
Hipótesis

A través del pretratamiento de la cáscara de cacahuete se podrá aumentar el área superficial de sus componentes polisacáridos de manera que se promueva la hidrólisis a hexosas y pentosas y su fermentación a bioetanol.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1. PROCESO GLOBAL



Determinación de

1. Humedad, Eficiencia de molienda.
2. Difracción de Rayos X, Microscopía electrónica de barrido
3. Carbohidratos totales, Carbohidratos reductores.
4. Carbohidratos totales, Carbohidratos reductores, Derivados de furfural.
5. Difracción de Rayos X, Microscopía electrónica de barrido.
6. Difracción de Rayos X, Microscopía electrónica de barrido.
7. Carbohidratos totales, Carbohidratos reductores, Derivados de furfural.
8. Concentración de etanol (HPLC)

2.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES

a) Determinación de humedad: Termobalanza

Fundamento

Este método se basa en el principio termogravimétrico que consiste en que una fuente de calor evapora de manera continua el agua libre de la muestra y se registra la continua pérdida de peso hasta que la muestra se sitúe a peso constante. Además, la fuente de calor, dispuesta en círculo alrededor de la muestra, permite un calentamiento rápido y uniforme de la misma, proporcionando una buena repetibilidad de los resultados.

Reactivos y Materiales

- *Termobalanza* Modelo: OHAUS
- *Espátula*

Técnica

Se colocó en la Termobalanza 1 g de muestra y se encendió el equipo. La temperatura de la balanza se programó a 100°C hasta que la muestra haya alcanzado peso constante. Al finalizar el proceso se registró la pérdida de peso y el porcentaje de humedad.

b) Molienda de la cáscara de cacahuete

Fundamento

El objetivo de la molienda es la reducción del tamaño de partícula de la materia prima sometida a este proceso y permite obtener muestras más homogéneas. Esta operación incrementa la superficie de contacto del material y disminuye el grado de polimerización (G.P) facilitando el acceso y la interacción con otros compuestos en reacciones subsecuentes. (Hendriks, A, Zeeman, G., 2009).

Reactivos y materiales

- Cáscara de cacahuete seca
- Molino de rotor Marca: WEG

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

- Bolsas de polietileno con capacidad de 1 kg.
- Balanza granataria OHAUS

Técnica

Se introdujo la cáscara de cacahuete en la tolva del molino de bolas, se colocaron bolsas de polietileno con capacidad de 1 kg en la tolva de salida para la recepción de la cáscara de cacahuete molida. Se hizo recircular la muestra hasta obtener un tamaño de partícula pequeño. Se pesó la cantidad de harina de cacahuete obtenida para calcular la eficiencia de molienda.

c) Tamizaje

Fundamento

El análisis granulométrico consiste en colocar un juego de tamices en cascada, es decir, ordenados de arriba abajo por orden decreciente de la luz o abertura de malla. El producto a analizar se añade sobre el primer tamiz, es decir aquel que tenga la mayor abertura de malla y se someten a un movimiento vibratorio. El tamaño de apertura de las diferentes mallas permite hacer una diferenciación entre los diversos tamaños de partícula obtenidos durante el proceso de molienda para poder clasificarlos y eliminar material extraño.

Materiales

- Juego de tamices Malla 20, 30 ,40 ,50 y 100 Marca: Fisher Scientific A.S.T.M.E-11 Specification.
- Bolsas de polietileno de 1 Kg de capacidad
- Balanza Analítica Marca: Denver Instrument. Modelo: P1-114.
- Cernidor Automático Marca: WS-Tyler. Modelo: RX-812.

Técnica

Se colocó una fracción de harina de cacahuete obtenida de la molienda en la superficie del juego de tamices (malla 20), el juego de tamices se montó en el cernidor y se prendió el sistema con la velocidad máxima durante 10 minutos.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Después del tiempo de agitación, se desmontó el equipo para poder separar las fracciones que se quedaron en cada malla. Se mezcló la harina de las mallas 20-40 y 50-80 en bolsas de polietileno con cierre. Finalmente se pesó cada una de las fracciones separadas. El número de malla representa la cantidad de aberturas en el tamiz por pulgada cuadrada.

d) Lavado de la harina de cáscara de cacahuate.

Fundamento

La HCC puede contener azúcares solubles y pueden ser recuperados cuando se somete la muestra a un proceso de lavado y evitar que se oxiden en etapas posteriores.

Reactivos y materiales

- Harina de cacahuate de las mallas 50-80
- Centrífuga (Beckman J2-21 M/E)
- Balanza Analítica Marca: Denver Instrument. Modelo: P1-114. 4
- Tubos de plástico con tapa para centrífuga de 500 mL
- Espátula
- Matríz kitazato 500mL
- Embudo buchner
- Manguera para vacío
- Papel filtro Whatman #1
- Horno (FELISA)
- Piseta
- Probeta de vidrio graduada 250mL
- Agua destilada

Técnica

Se pesó 12.5 g de harina de cacahuate, obtenida de las mallas 50-80 del tamiz y se colocaron en un tubo de plástico para la centrífuga con 125 mL de agua destilada. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 20°C. Después de centrifugar, se filtró al vacío el contenido del

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

tubo con papel Whatman #1. A la parte acuosa se le determinaron azúcares reductores (Método DNS) y azúcares totales (Método Fenol-sulfúrico) además del grado de polimerización (GP). Medir el volumen final de las aguas de lavado. Guardar en un frasco etiquetado en refrigeración. La fracción sólida se seca en un horno a 80°C por 48 horas en la que posteriormente se analizará su morfología mediante Microscopía de Barrido Ambiental (ASEM) y se caracterizarán las zonas amorfas y cristalinas del material con Difracción de Rayos X (XRD).

El grado de polimerización se refiere a las veces que se repite la unidad monomérica en un polímero, es decir, las veces que se repite la glucosa en la celulosa proveniente de la HCC con la siguiente ecuación:

$$G.P. = \frac{\text{Azúcares totales} \left(\frac{g \text{ de azúcar}}{g \text{ de biomasa inicial}} \right)}{\text{Azúcares reductores} \left(\frac{g \text{ de azúcar}}{g \text{ de biomasa inicial}} \right)}$$

e) Determinación de carbohidratos totales: Método fenol-sulfúrico

Fundamento

El contenido total de carbohidratos de medios líquidos, extractos, alimentos líquidos puede ser determinado como azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados. Dando un color naranja muy estable cuando reaccionan con fenol y en presencia de ácido sulfúrico.

Los carbohidratos en presencia de un medio ácido, se hidrolizan y se deshidratan dando lugar a la formación de furfural y 5-hidroximetilfurfural que al reaccionar con el fenol forman los compuestos coloridos que pueden ser leídos en una longitud óptica específica (Figura 13.). En el caso de las pentosas, el color de la reacción debe ser leído a una longitud de onda de 480 nm y para las hexosas 490 nm.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

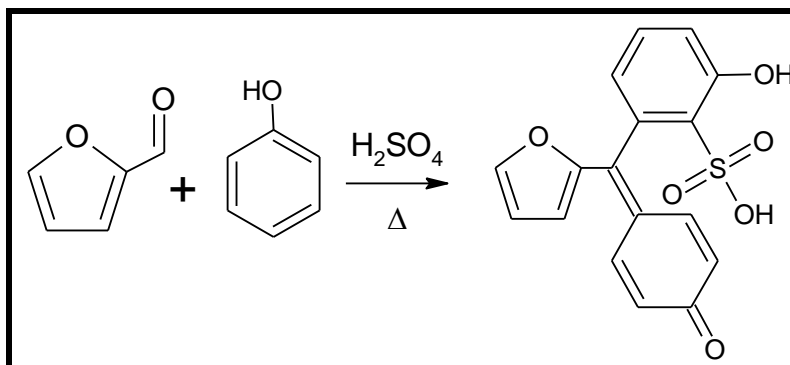


Figura 13. Reacción de hidrólisis y condensación de carbohidratos

Reactivos y Materiales

- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Termo Spectronic. Software: Vision 32
- Tubos de ensaye con tapón de rosca 15*180 mm.
- Vasos de precipitados de 100, 600 y 1000 mL.
- Micropipetas automáticas 10, 100 y 1000 μ L. Pipetas automáticas 5 y 10 mL.
- Vórtex Marca: Fisher.
- Gradilla.
- Celdas de cuarzo
- Espátula
- Glucosa 99.99% Marca: Sigma Aldrich
- H_2SO_4 concentrado Marca J.T. Baker
- Solución de fenol al 5% (Pesar 5g de Fenol y aforar a 100mL).
- Agua destilada.

Técnica

Preparar una curva patrón de glucosa de 10-100 μ g/mL que se leerán en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. En tubos de ensaye etiquetados, colocar 1 mL de la muestra y un tubo con 1 mL de agua destilada que servirá como blanco de 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 y homogenizar con el vórtex. Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente y determinar la

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

intensidad del color naranja obtenido en un colorímetro a 490 nm, frente a un blanco de muestra. Calcular la concentración de azúcares presentes en la muestra a partir de una curva patrón preparada.

f) *Determinación de carbohidratos reductores: Método ácido dinitrosalicílico (DNS)*

Fundamento

El grupo aldehído presente en la glucosa reduce a grupo 3-nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico (compuesto que desarrolla tonalidades amarillas a $\lambda=540$) para producir el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (compuesto que desarrolla tonalidades rojas a $\lambda=540$) y el ácido correspondiente al carbohidrato que actuó como agente reductor. (Figura 14.)

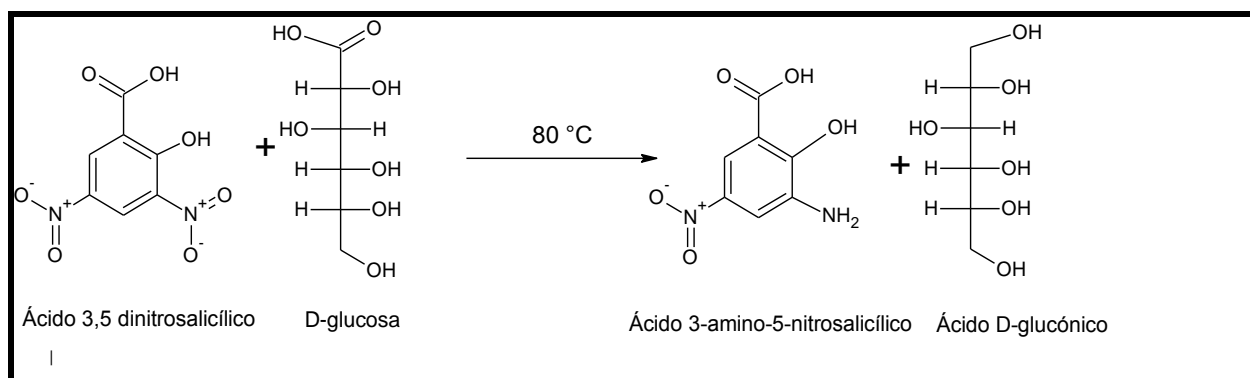


Figura 14. Reacción de hidrólisis y condensación de carbohidratos.

Reactivos y Materiales

- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Thermo Spectronic. Software: Vision 32
- Tubos de ensaye con tapón de rosca 15*180 mm.
- Vasos de precipitados de 100 y 1000 mL.
- Micropipetas automáticas 10, 100 y 1000 μ L. Pipetas automáticas 5 y 10 mL.
- Gradilla.
- Celdas de cuarzo

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

- Vórtex Marca: Fisher.
- Glucosa 99.99% Marca: Sigma Aldrich
- Reactivos DNS *
- Recipiente para baño maría.
- Agua destilada.
- Espátula

* Preparación del reactivo DNS

En un vaso de precipitados de 1000 mL disolver 21.4 gramos de Hidróxido de Sodio en 200 mL de agua destilada. En otro vaso de precipitados, adicionar 140 gramos de tartrato de sodio y potasio a 250 mL de agua destilada y calentar hasta disolución y adicionar 5g de Fenol y 5 g de Bisulfito de Sodio. Finalmente, se mezclan las dos soluciones y ajustar el volumen final a 1000mL con agua destilada.

Técnica

Preparar una curva patrón de glucosa de 100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que se leerán en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. En tubos etiquetados, tomar 1mL de la solución acuosa de la muestra y en otro tubo 1 mL de agua destilada que servirá como blanco de muestra, adicionar a todos los tubos 1mL del reactivo de DNS. Someter a calentamiento por 5 minutos en un baño maría con agua en ebullición, enfriar y diluir con 8 mL de agua destilada y homogeneizar los tubos en el vórtex. Calcular la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra a partir de las lecturas de absorbancia del color producido a 540nm y en referencia a la curva patrón previamente realizada.

g) Determinación de derivados de furfural: HPLC

Fundamento

A través de los pretratamientos de la biomasa, tal como el ácido diluido, se forman compuestos de degradación, tales como HMF y furfural, así como otros componentes de interés, tales como ácidos orgánicos y alcoholes provenientes

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

de los carbohidratos. Estos componentes son analizados por HPLC con un detector de arreglo de diodos UV- VIS, para determinar los parámetros óptimos del proceso de producción. Varios de los compuestos que se miden, son inhibidores potenciales del proceso, por lo que es importante su cuantificación. Las concentraciones de estos subproductos y productos de degradación se utilizan en conjunto con otros ensayos que son utilizados para determinar la composición del flujo total.

Reactivos y Materiales

- Solución Furfural 99%
- Solución Hidroximetilfurfural 99%
- Agua destilada
- HCN
- Vaso de Precipitado 100mL
- Vial 1.5mL
- Matraz de Aforo 10mL
- Espátula
- Micropipetas automáticas 10,100 y 1000 μ L. Pipetas automáticas 5 y 10 mL.
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia. Marca Hewlett Packard Series 1100.

Técnica

Preparar una curva de calibración de hidroximetilfurfural (HMF) y de furfural al 0.1% v/v. Filtrar 1.0 mL cada una de las muestras en un filtro de membrana de 0.2 μ m y vaciarlo en un vial con tapa de capacidad de 1.5 mL. Colocar en el equipo HPLC los viales con 1.0 mL de la curva de calibración y de las muestras a analizar. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para la obtención de la curva de calibración y la cuantificación de la concentración de furfural e hidroximetilfurfural son las siguientes:

HPLC Hewlett Packard Serie 1100	
Tipo de Columna	SUPELCOSIL LC-18-DB 15cm x 4.6mm x 3µm
Temperatura de columna	30° C
Flujo	1 mL/min
Inyección	20µL
Proporción de disolventes	70% H ₂ O Y 30% ACN
Presión	182 Bar

Tabla 5. Condiciones de trabajo para el HPLC

h) Determinación de sólidos solubles totales: Refractómetro

Fundamento:

Los refractómetros son instrumentos ópticos con los que se permite medir rápidamente la concentración de una disolución acuosa, utilizando el principio del ángulo crítico de la refracción y así, determinar el índice de refracción del líquido o material deseado.

Reactivos y Materiales

- Refractómetro Marca: ATAGO, Mod: PAL-1
- Agua destilada
- Pipeta Pasteur

Técnica

Se debe iniciar con la limpieza de la superficie del vidrio esmerilado, seguida de la calibración del refractómetro, colocando una gota de agua destilada en la superficie esmerilada y ajustando a cero con el botón que indica ZERO. Para Determinar los sólidos solubles en la muestra, se debe colocar una o dos gotas a temperatura ambiente en el prisma con una pipeta Pasteur. Hay que cerciorarse de que no haya presencia de burbujas o espuma que pueden alterar la medición del refractómetro. Una vez colocada la muestra leer la muestra presionando el botón READ del refractómetro. Entre cada lectura de

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

las muestras se debe limpiar el vidrio esmerilado del aparato y secar con un paño limpio.

j) Pretratamiento 1. Mecánico

Reactivos y Materiales

- Harina de cáscara de cacahuete previamente molida, lavada y tamizada
- Reactivo DNS
- H₂SO₄ concentrado Marca J.T. Baker.
- Solución de fenol al 5%
- Agua destilada
- Gradilla
- Tubos de ensaye 15*180mm
- Micropipetas automáticas 10,100 y 1000 µL. Pipetas automáticas 5 y 10 mL.
- Celdas de plástico
- Celdas de cuarzo
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Termo Spectronic. Software: Vision 32
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) Marca: HP Modelo.1100. Software: HP ChemStation.

Técnica

Para realizar el pretratamiento mecánico, se utilizará la harina de cáscara de cacahuete que fue molida y lavada. A la fracción sólida será caracterizada mediante ASEM y Rayos X. A la fracción líquida se determinaron azúcares reductores (Método DNS) y azúcares totales (Método fenol-sulfúrico) y se cuantificó el grado de polimerización (G.P) generado, además de derivados de furfural mediante HPLC.

j) Pretratamiento 2. Organosolv

Reactivos y Materiales

- Harina de cáscara de cacahuete (HCC)
- Acetona 99.9% Marca: J.T. Baker.
- H₂SO₄ 0.9% w/w
- Reactivo DNS
- Solución de fenol 5%
- H₂SO₄ concentrado Marca J.T. Baker.
- Agua destilada
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Thermo Spectronic. Software: Vision

32

- Reactor Parr 4870 (Pressure Reactor) de 100mL
- Rotavapor Termociclador Buchi Modelo B-480
- Embudo Buchner
- Gradilla
- Tubos de ensaye 15*180mm
- Horno de convección Marca: FELISA
- Balanza analítica Marca: Denver Instrument. Modelo: P1-114.
- Micropipetas automáticas 10,100 y 1000 µL. Pipetas automáticas 5 y 10 mL.

- Probeta de vidrio graduada 20mL
- Matríz bola de 250 mL
- Matríz Erlenmeyer de 250mL
- Papel pH
- Papel filtro Whatman #1
- Celdas de plástico
- Celdas de cuarzo
- Vórtex Marca: Fischer.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Termo Spectronic. Software: Vision 32
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) Marca: HP Modelo.1100. Software: HP ChemStation.

Técnica

En un reactor Parr de 100 mL de capacidad, se colocaron 2.7 g de HCC y 18.7 mL de la mezcla agua/acetona 50:50 w/w y se ajustó a pH=0 con ácido sulfúrico a 0.9% w/w. Cerrar el reactor Parr con la tapa y se conectaron las entradas de agua al panel. Las condiciones a las que se trabajó fueron a 18 atm. y 200 rpm seguida de un calentamiento de forma escalada; llegar a 100°C mantener la temperatura durante 0.2 horas después se aumentó hasta 180°C en donde se mantuvo durante 1.0 hora. Transcurrido el tiempo de reacción se enfrió hasta 25°C durante 0.2 horas. Cuando el reactor se encontró a temperatura ambiente, el contenido se vació a un matrás y se filtró al vacío con papel filtro Whatman # 1. La fracción sólida se colocó en el horno a 80°C durante 24 horas.

La fracción líquida se colocó en un matrás bola y se colocó en un rotavapor con el fin de eliminar la parte de acetona contenida en la muestra. Las condiciones de la evaporación se ajustaron a una presión entre 150-330 mbar a 100 rpm y una temperatura que oscilaba entre 40 y 60°C. Una vez finalizada la evaporación, se ajusta el volumen a 60 mL; a ésta fracción líquida se neutralizó con la solución de NaOH 5M y se le realizó la determinación tanto de azúcares reductores como de azúcares totales, posteriormente cuantificó los derivados de furfural producidos en la reacción mediante técnicas de HPLC.

Finalmente, a la fracción sólida una vez seca, se pesó para la determinación de grado de polimerización y finalmente será caracterizada mediante ASEM y Rayos X.

k) Pretratamiento 3. Básico-oxidante

Reactivos y Materiales

- Harina de cáscara de cacahuete
 - NaOH concentrado
 - Solución de H₂O₂ al 30%
 - Reactivo DNS
 - Solución de fenol al 5%
 - H₂SO₄ concentrado Marca J.T. Baker.
 - Solución de NaOH 5M
 - Agua destilada
 - Matraces 125 mL con tapa de rosca
 - Matríz aforado 100 mL
 - Matríz kitazato de 250 mL
 - Embudo Buchner
 - Horno de convección Marca: FELISA
 - Balanza analítica Marca: Denver Instrument. Modelo: P1-114.
 - Micropipetas automáticas 10,100 y 1000 µL. Pipetas automáticas 5 y 10 mL.
 - Papel pH
 - Papel filtro Whatman #1
 - Incubadora con agitación Marca: Haake SW-B25
 - Celdas de plástico
 - Celdas de cuarzo
 - Vórtex Marca: Fischer.
 - Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Thermo Spectronic. Software: Vision
- 32
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) Marca: HP Modelo.1100. Software: HP ChemStation.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Técnica

Se prepararon en matraces Erlenmeyer muestras de HCC a 3 distintas concentraciones 4.5, 10 y 15% w/v en agua destilada que contiene 7.5% v/v de peróxido de hidrógeno y se ajustó el pH a 11.5 con NaOH. Cada muestra se colocó en agitación en una incubadora a 35°C durante 22 horas. Transcurrido el tiempo, se sacaron las muestras de la incubadora y se filtraron al vacío con papel filtro Whatman # 1, realizando 2 lavados de 20 mL cada uno.

Para cada jarabe obtenido se le midió el volumen final del jarabe y se le determinaron tanto azúcares reductores como azúcares totales a pH neutro y se calculó el grado de polimerización (G.P) generado. También a esta fracción se le determinó derivados de furfural que pudieron ser producidos en el pretratamiento.

A la parte sólida se sometió a un proceso de secado en un horno 80°C durante 24 horas, se pesó la cantidad sólida final para conocer la cantidad de material perdido en relación a la muestra inicial y finalmente se caracterizó mediante ASEM y rayos X.

1) Pretratamiento 4. Ácido diluido

Reactivos y Materiales

- Harina de cáscara de cacahuete
- Reactivo DNS
- Solución de fenol al 5%
- H₂SO₄ concentrado Marca J.T. Baker.
- Solución de H₂SO₄ 3%
- Solución de NaOH 5M
- Agua destilada
- Matraces 125 mL con tapa de rosca
- Matríz aforado 100 mL
- Matríz kitazato de 250 mL
- Embudo Buchner

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

- Horno de convección Marca: FELISA
- Balanza analítica Marca: Denver Instrument. Modelo: P1-114.
- Micropipetas automáticas 10,100 y 1000 μ L. Pipetas automáticas 5 y 10 mL.
- Papel pH
- Papel filtro Whatman #1
- Gradilla
- Tubos de ensaye 15*180mm
- Incubadora con agitación Marca: Haake SW-B25
- Autoclave Marca: Yamato. Modelo: SE510.
- Celdas de plástico
- Celdas de cuarzo
- Vórtex Marca: Fischer.
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Termo Spectronic. Software: Vision 32
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) Marca: HP Modelo.1100. Software: HP ChemStation.

Técnica

En un matrás Erlenmeyer de 125 mL con tapón de rosca, se colocó 0.5 gramos de harina de cáscara de cacahuete con 5mL de ácido sulfúrico 72% v/v (se realizará por duplicado). Se colocaron los matraces en una incubadora con agitación a 30°C durante una hora. Transcurrido el tiempo se diluyeron las muestras a 3% de H₂SO₄ con 115 mL de agua destilada y se procedió a colocarlos en la autoclave durante una hora a 120°C.

Al finalizar el tiempo de reacción se filtraron al vacío con papel filtro Whatman # 1 los jarabes obtenidos procurando remover la parte sólida con la mínima cantidad de agua destilada para evitar la mínima dilución de la concentración de azúcares obtenidos, se neutralizó la mezcla de reacción con la solución de NaOH 5M y finalmente se midió el volumen final. A la parte acuosa del filtrado

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

se le cuantificó la concentración de azúcares reductores y azúcares totales obtenidos del pretratamiento y obtener el grado de polimerización (G.P) generado, así como derivados de furfural que se pudieron producir durante el mismo.

La parte sólida se sometió a un proceso de secado en horno a 80°C durante 24 horas. Una vez seco el producto se pesó para determinar el porcentaje de material perdido en el proceso y se le caracterizó mediante ASEM y rayos X.

m) Sacarificación/Hidrólisis

Reactivos y Materiales

- Sólidos obtenidos de los pretratamientos mecánico (lavado), organosolv y básico-oxidante.
- Reactivo DNS
- Solución de fenol al 5%
- H₂SO₄ concentrado Marca J.T. Baker
- Solución de H₂SO₄ 3%
- Solución de NaOH 5M
- Agua destilada
- Matraces 125 mL con tapa de rosca
- Matríz aforado 100 mL
- Matríz kitazato de 250 mL
- Embudo Buchner
- Horno de convección Marca: FELISA
- Balanza analítica Marca: Denver Instrument. Modelo: P1-114.
- Micropipetas automáticas 10,100 y 1000 µL. Pipetas automáticas 5 y 10 mL.
- Papel pH
- Gradilla
- Tubos de ensaye 15*180mm
- Incubadora con agitación Marca: Haake SW-B25

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

- Autoclave Marca: Yamato. Modelo: SE510.
- Celdas de plástico
- Celdas de cuarzo
- Vórtex Marca: Fischer.
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Termo Spectronic. Software: Vision

32

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) Marca: HP Modelo.1100. Software: HP ChemStation.

Técnica

Se pesaron 0.5 gramos de harina de cáscara de cacahuete resultantes de cada pretratamiento (mecánico, organosolv y alcalino peróxido) en un matríz Erlenmeyer de 125 mL con tapa de rosca y se le añadió 120 mL de una solución de H₂SO₄ al 3% y se procedió a colocarlos en la autoclave durante una hora a 120°C. Una vez finalizado el tiempo de reacción, se sacaron los matraces de la incubadora y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se neutralizaron los jarabes obtenidos con la solución de NaOH 5M. Cada jarabe se filtró al vacío con papel Whatman #1, la fracción sólida obtenida se sometió a un proceso de secado en horno a 80°C durante 24 horas y se pesó para cuantificar el porcentaje de material sacarificado en relación al material inicial. Finalmente los sólidos se caracterizaron mediante ASEM y rayos X.

La fracción acuosa obtenida se le realizó la determinación de azúcares reductores y totales con el fin de determinar el grado de polimerización (G.P) generado. También se determinó la concentración de derivados de furfural producidos durante la reacción mediante HPLC.

n) Fermentación y cuantificación de etanol

Reactivos y Materiales

- Balanza analítica Marca: Denver Instrument. Modelo: P1-114.
- Espectrofotómetro UV-VIS Marca: Thermo Spectronic. Software: Vision 32.
- ChemStation.
- Autoclave Marca: Yamato. Modelo: SE510.
- Centrífuga Marca: Eppendorf A-35. Modelo: 5810R.
- Agitadora Mecánica. Marca: Brunswicks.
- Cromatógrafo de gases Marca: HP. Modelo: 6890. Software: HP
- Vórtex Marca: Fischer.
- Vasos de precipitados 250 mL
- Matraces Erlenmeyer con tapón de rosca 250 mL
- Micropipetas automáticas 10,100 y 1000 μ L. Pipetas automáticas 5 y 10 mL.
- Probeta graduada 50 mL
- Espátula.
- Piseta.
- Tubos de ensaye 15*180mm
- Filtros de membrana 0.2 μ m
- Papel filtro Whatman No. 40
- Jeringa de vidrio con aguja.
- Viales de 1 mL
- Tubos de centrifuga Falcon 50 mL
- Celdas de cuarzo.
- D-(+)-Glucosa. Marca: Sigma-Aldrich.
- Carbón activado Marca: Sigma
- Ácido sulfúrico concentrado Marca: J.T. Baker
- Solución de fenol 5%
- Reactivo DNS
- Ácido Sulfúrico concentrado Marca: J.T.Baker.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

- Levadura liofilizada (*S. cerevisiae*). Marca: Oviedo.
- Agua destilada
- Extracto de levadura Ultrapuro. Marca: USB.

Técnica

Se mezclaron los jarabes de cada etapa del proceso que correspondían al mismo pretratamiento, procurando, lograr la mayor concentración de azúcares para la fermentación alcohólica llegando a un volumen final de 100 mL y se colocaron en matraces Erlenmeyer con tapón de rosca. Cada jarabe se sometió a un tratamiento de adsorción de compuestos coloridos adicionándole una pequeña porción de carbón activado. Se preparó el medio de cultivo para la levadura con 40 mL de jarabe final, 0.4 gramos de extracto de levadura y 0.4 gramos de glucosa con el fin de que la levadura se adapte al medio y favorecer la producción de metabolitos primarios (etanol) y evitar el uso del sustrato para la formación exclusiva de la biomasa. Se preparó un blanco de fermentación con 100 mL de agua destilada, 2 gramos de glucosa y 1 gramo de extracto de levadura. Consecutivamente se esterilizaron jarabes a 121°C durante 15 minutos en la autoclave. Finalizada la esterilización cada jarabe se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se inoculó con 0.5 g de levadura comercial de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones estériles y se incubaron a 28°C durante 3 horas a 140 rpm, seguido de la disminución de la velocidad a 60 rpm durante 48 horas.

	JARABES A FERMENTAR			
	Muestra lavada	Básico/oxidante 15%	Ácido	Organosolv
Lavado	100 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Pretratamiento		20 mL	90 mL	20 mL
Sacarificación		70 mL		70 mL

Tabla 6. Mezclas de los jarabes en cada pretratamiento que serán fermentados

Transcurrido el tiempo de fermentación, cada jarabe se traspasó a un tubo Falcon de 50 mL y se realizó una centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos para separar el jarabe de la biomasa. La biomasa resultante se sometió a un proceso de secado en horno para determinar su peso seco.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Inmediatamente, para evitar la evaporación del etanol producido, a la fase acuosa se le determinó la concentración de etanol mediante cromatografía de gases filtrando 1 mL de fracción acuosa en un filtro de membrana de 0.2 μ m y se colocó en un vial de 1 mL. Para conocer la concentración de etanol obtenida, previamente se elaboró una curva de calibración de concentración de etanol de 0.02-0.2% v/v. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases para la obtención de la curva de calibración y la cuantificación de la concentración de etanol fueron las siguientes:

Cromatógrafo de gases HP. Modelo: 6890	
Tipo de Columna	AT-WAX 30 mm x 0.53 mm
Capilar	120 μ m
Temperatura	120°C
Temperatura del Horno	50° C
Flujo	40 μ L
Volumen de inyección	10 μ L

Tabla 7. Condiciones del cromatógrafo de gases para la cuantificación de etanol.

Una vez conociendo la concentración de etanol, se calcularon los rendimientos $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$.

Finalmente se determinó la concentración de azúcares reductores (método DNS) y azúcares totales (Método Fenol-sulfúrico) a los jarabes obtenidos de a fermentación para conocer la concentración de carbohidratos que no pudieron ser fermentados por la levadura comercial. También se calculó el grado de polimerización generado (G.P).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. OBTENCIÓN DE LA HARINA DE CACAHUATE

Se partió de cacahuate de la marca Golden® comprado en el mercado de la Merced, el cual se peló para obtener la cáscara.

La cáscara de cacahuate se molió en un molino de rotor marca WEG® para reducir el tamaño de partícula en donde se obtuvo el 94.6% de eficiencia de molienda. Se procedió a tamizarlo en un Portable Sieve Shaker® Modelo RX-24 durante un periodo de 10 minutos.

La harina de cáscara de cacahuate (HCC) obtenida de la molienda se tamizó y la harina retenida en las mallas # 50 a #80 representó el 22.6% del total de la harina y que es la que se ocupará en las pruebas posteriores.

Con la finalidad de conocer la estructura del material vegetal antes de ser sometido a algún tipo de pretratamiento y observar su efecto, se realizó un análisis mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ASEM). En la Figura 15, se aprecia que la estructura se encuentra íntegra, con una superficie heterogénea y con ausencia de poros.

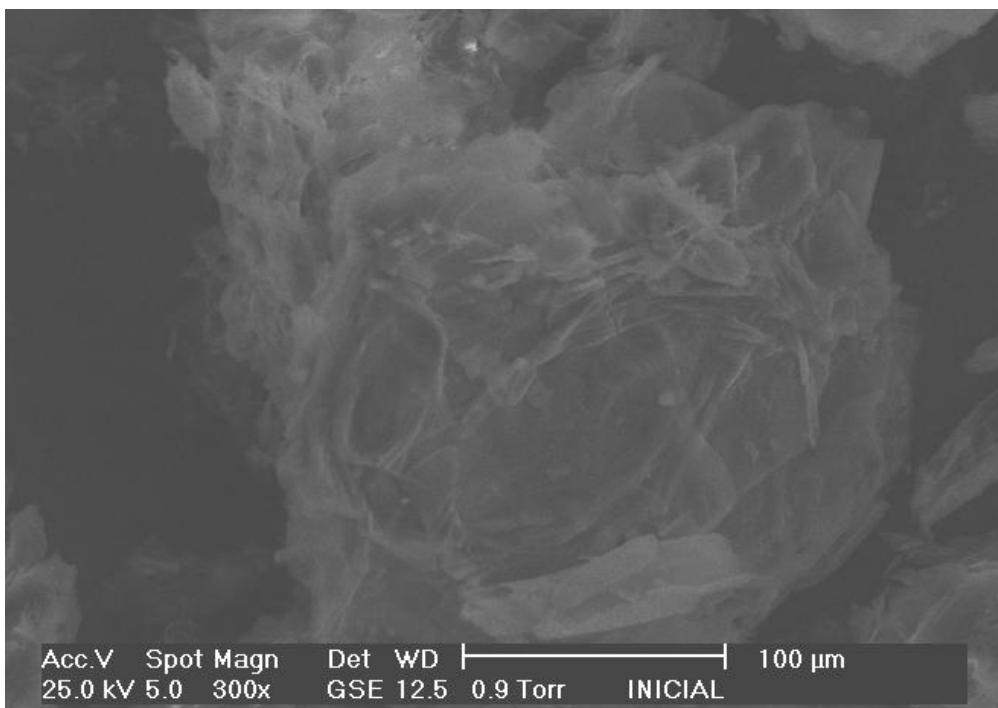


Figura 15. Microscopía electrónica de barrido ambiental de la muestra inicial de la HCC

3.2. LAVADO DE LA HARINA DE CACAHUATE

La harina de cáscara de cacahuete (HCC) se lavó con el objetivo de recuperar los azúcares presentes en la muestra, poder usarla como referencia (blanco) y de esta manera se podrá observar los efectos en cada uno de los pretratamientos realizados. Se cuantificaron azúcares reductores y totales en el jarabe obtenido con un rendimiento de $0.0046 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ y $0.1047 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ respectivamente. Se encontró que el grado de polimerización (GP) de la muestra es 2.26, es decir, la glucosa (β - D glucosa) que es la unidad monomérica de la celulosa se repite 2.26 veces en la celulosa proveniente de la harina de cáscara de cacahuete. También se cuantificaron los sólidos retenidos en la muestra (91.52%) con el fin de conocer la cantidad de muestra solubilizada en el jarabe (8.48%).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del mismo modo, se obtuvo la fotografía de la estructura del material después del lavado mediante ASEM. La figura 16 representa la microscopía de la muestra, en donde se observan las fibras de la HCC con la superficie heterogénea, sin porosidades e íntegra. Se logra observar que las fibras son huecas. No presenta un cambio con respecto a la muestra inicial.

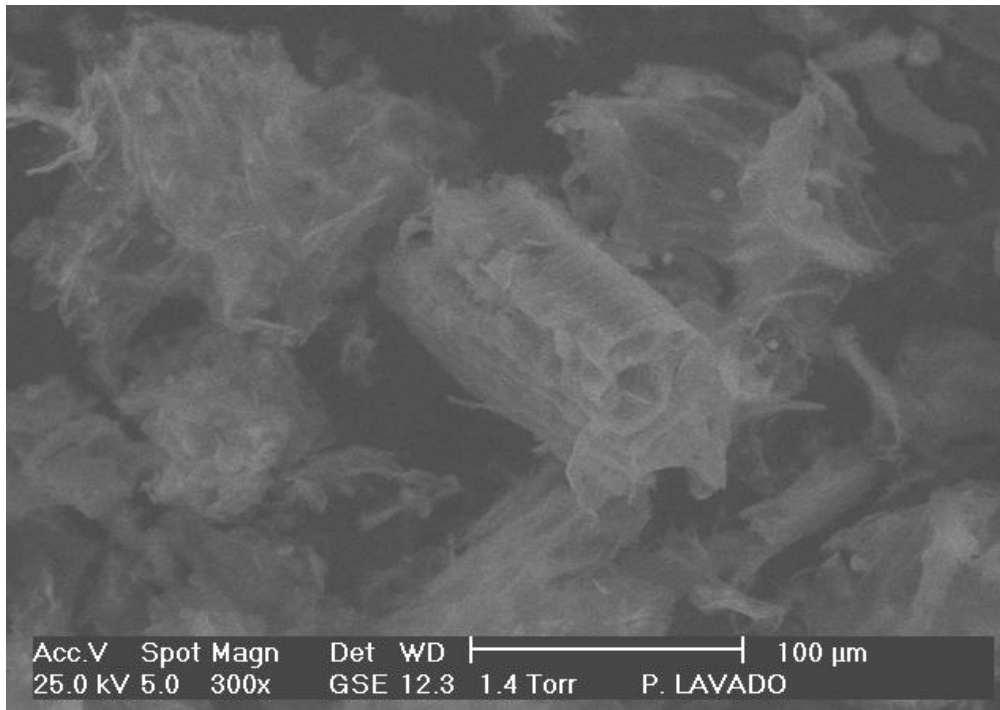


Figura 16. Microscopía electrónica de barrido ambiental de la muestra lavada de HCC

3.3. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO EN LA HARINA DE CÁSCARA DE CACAHUATE

3.3.1. Obtención de azúcares reductores y totales en los jarabes provenientes del pretratamiento

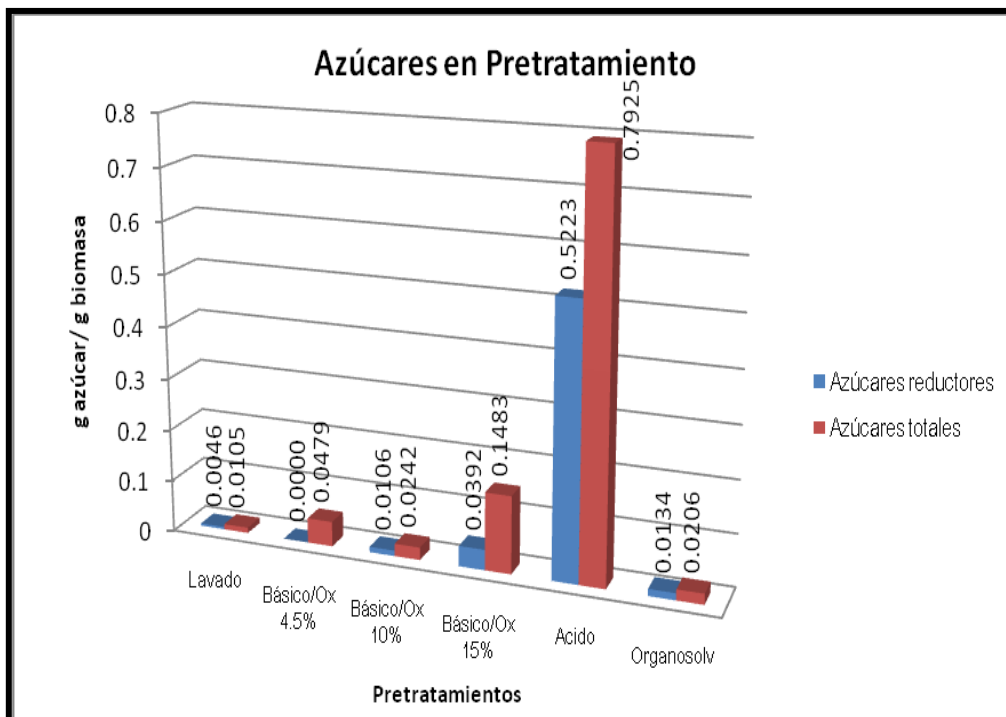


Figura 17. Relación de azúcares reductores y totales resultantes de pretratamiento

En la figura 17 se encuentra el rendimiento de azúcares generados en cada pretratamiento expresados en el rendimiento $g_{\text{azúcar}}/g_{\text{biomasa}}$. Puede observarse que el que tuvo mayor cantidad de azúcares reductores (AR) fue el jarabe proveniente del pretratamiento ácido con $0.52 g_{\text{azúcar}}/g_{\text{biomasa}}$, esto se debió a que se realizó el pretratamiento y la sacarificación al mismo tiempo por lo que se logró hidrolizar mayor cantidad de celulosa y hemicelulosa generando una mayor cantidad de azúcares fermentables. Los jarabes provenientes del pretratamiento ácido se obtuvo un jarabe con $pH=0$ y $4.5^{\circ}Bx$.

Cabe mencionar que el objetivo del pretratamiento de la material vegetal es aumentar el área superficial para incrementar la eficiencia de la hidrólisis y no el generar azúcares reductores por lo que ésta cuantificación de azúcares

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fermentables sólo nos da la idea de la cantidad presente en los jarabes para su posterior sacarificación y fermentación.

Los jarabes provenientes del pretratamiento básico-oxidante reportaron un pH= 6 y 0.9° Bx, 1.1°Bx, 1.1°Bx para las concentraciones de 4.5, 10 y 15% de material celulósico respectivamente. La disminución de pH de 11.5 del jarabe inicial a pH de 6 del jarabe obtenido después del pretratamiento, se debió posiblemente a la hidrólisis del grupo acetilo de las hemicelulosas y a la formación de ácido acético como producto secundario de la reacción, además de la solubilización de aminoácidos provenientes de las proteínas contenidas en la materia vegetal por acción del medio alcalino (Gray, 2007). Para el tratamiento con 4.5% de concentración de sólidos, no se pudo calcular el grado de polimerización ya que no se encontraron azúcares reductores en el jarabe de pretratamiento y se solubilizó el 24.45% de la muestra inicial. El tratamiento con 10% de sólidos se encontró que el grado de polimerización es de 2.29 y se solubilizó el 15.34%.

En el pretratamiento organosolv se obtuvieron jarabes con pH= 11, en donde se observa un incremento ya que el inicial estaba a pH=0, esto puede deberse a que los acetatos provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa hayan actuado como buffer hasta incrementar el pH, se obtuvo una concentración de sólidos solubles de 3.2°Bx. Se obtuvo el 65% sólidos solubles lo que representa que fue el pretratamiento que logró una mayor cantidad de sólidos solubles que cualquier otro a partir de la muestra inicial debido a que se realiza una remoción efectiva del material recalcitrante, como la lignina, (Zhu, J., Pan, X., 2010) y la hemicelulosa que se solubilizan en el medio de reacción (Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009).

Como se había mencionado anteriormente, es de importancia cuantificar los derivados de furfural que se obtienen como resultado de la degradación de azúcares solubles en los pretratamientos (principalmente en el pretratamiento ácido) ya que pueden inhibir la actividad de la levadura lo que provocaría la disminución del rendimiento de la producción de bioetanol (Mosier, 2005). En la determinación mediante HPLC se cuantificó la concentración de furfural e

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

hidroximetilfurfural (HMF). En el caso de los pretratamientos se obtuvieron señales en el cromatograma pero ninguna característica a las señales de furfural ni HMF por lo que se consideró que no se formaron éstos compuestos de degradación o bien que fueron oxidados a otros compuestos más simples. En investigaciones previas se ha reportado que a las mismas condiciones del pretratamiento ácido, se genera 0.10 g/L de furfural y 0.17 g/L de HMF además de otros productos inhibitorios como el ácido acético (1.9 g/L), ácido fórmico (0.24 g/L) además de compuestos fenólicos (0.12 g/L) (Castro, M., Alriksson, B., *et al* (2007)). También para el tratamiento organosolv se encontró que, para *Pinus radiata* en las mismas condiciones, la formación de compuestos inhibitorios 0.05 g/L de furfural y 0.02 g/L de HMF (Araque, E., Parra, *et. al.* (2008))

El grado de polimerización (G.P) de un material nos indica el número de residuos de unidades monoméricas en la cadena lignocelulósica y se determina con la siguiente ecuación:

$$G.P. = \frac{\text{Azúcares totales} \left(\frac{g \text{ de azúcar}}{g \text{ de biomasa inicial}} \right)}{\text{Azúcares reductores} \left(\frac{g \text{ de azúcar}}{g \text{ de biomasa inicial}} \right)}$$

De acuerdo a lo anterior, cuando se tiene un G.P igual a 1 nos indicará que la eficiencia del pretratamiento es del 100% ya que la totalidad de los azúcares presentes en el jarabe provienen de la hidrólisis completa de la celulosa, si se obtiene un G.P mayor a 1 se hará referencia a la generación oligosacáridos provenientes de una hidrólisis incompleta del polímero lignocelulósico.

En el pretratamiento no se espera un aumento o disminución de este parámetro pues la generación de azúcares reductores no es uno de los objetivos, pero se podrá observar si es que a través de ellos se logró hidrolizar algo y nos dará una referencia cuando se realice la sacarificación del material vegetal.

En la Figura 18 se muestra los valores del G.P para cada pretratamiento en donde se puede observar una disminución en los jarabes provenientes de los

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

pretratamientos ácido y organosolv en base a la muestra de referencia (lavada), en el caso del ácido, en donde se realizó la una sacarificación simultánea, se obtuvo un valor muy cercano a 1 por lo que se espera que en los pasos posteriores se obtenga un mayor rendimiento etanólico. Es de sobresaltar que en el tratamiento organosolv se logró hidrolizar parte del material vegetal llegando a un G.P muy cercano al obtenido en los jarabes del pretratamiento ácido. Para el caso de los tratamientos alcalino-peróxido con 4.5% de concentración de sólidos no se logró obtener algún valor debido a que no se generaron azúcares reductores, para el caso del 10% se puede observar que no hubo gran diferencia en comparación con la de referencia y en el caso del tratamiento con 15% se obtuvo un valor mayor a éste que puede atribuirse a la generación de oligosacáridos debido a una hidrólisis incompleta.

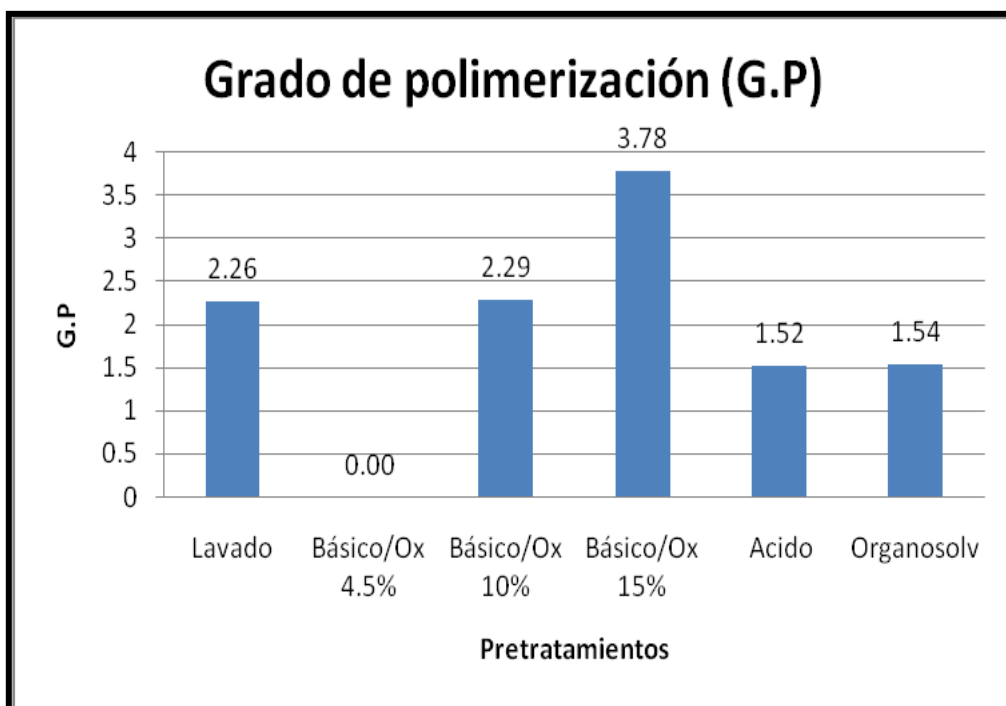


Figura 18. Grado de polimerización de la celulosa después de los pretratamientos

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.2. Efecto de los pretratamientos en la estructura de la harina de cáscara de cacahuete

Con el fin de observar el efecto de los pretratamientos en la estructura de la HCC, se realizó un análisis de las muestras en Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ASEM). A continuación se exponen las micrografías de las especies analizadas.

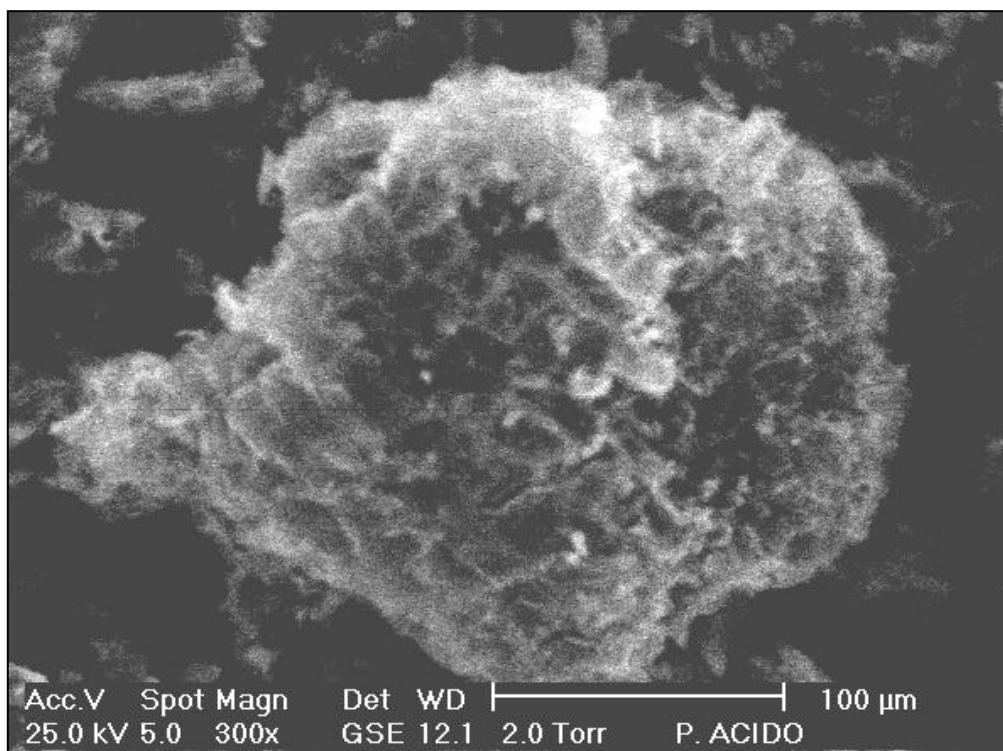


Figura 19. Microscopía electrónica de barrido ambiental del sólido resultante del pretratamiento ácido.

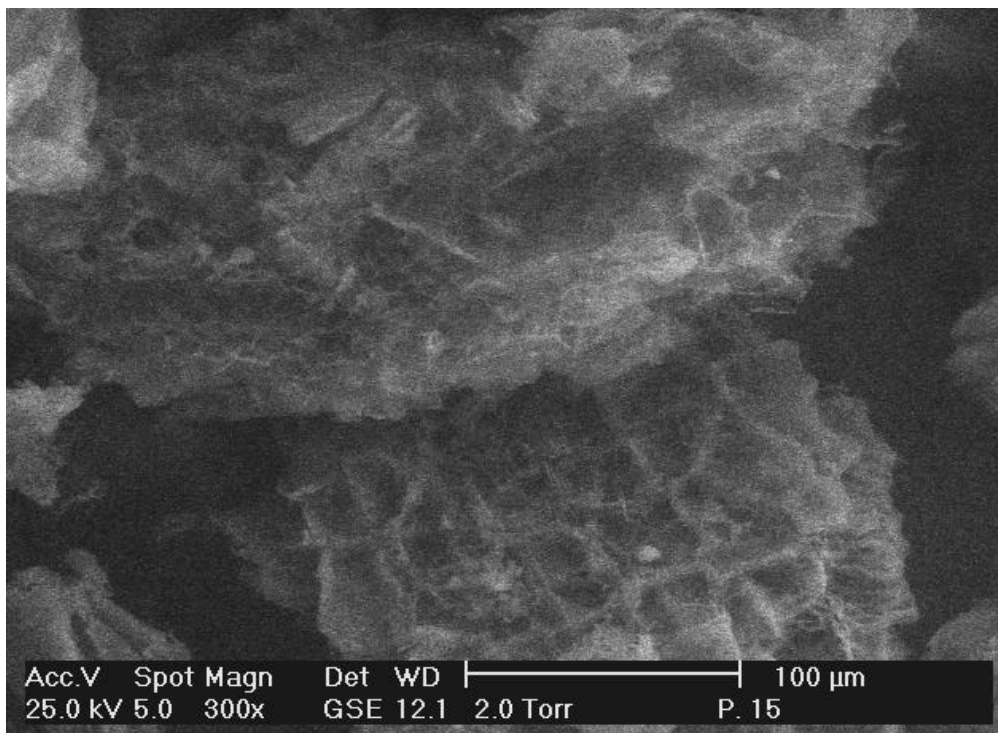


Figura 20. Microscopía electrónica de barrido ambiental del sólido resultante del pretratamiento básico/oxidante de 15% de concentración de sólidos

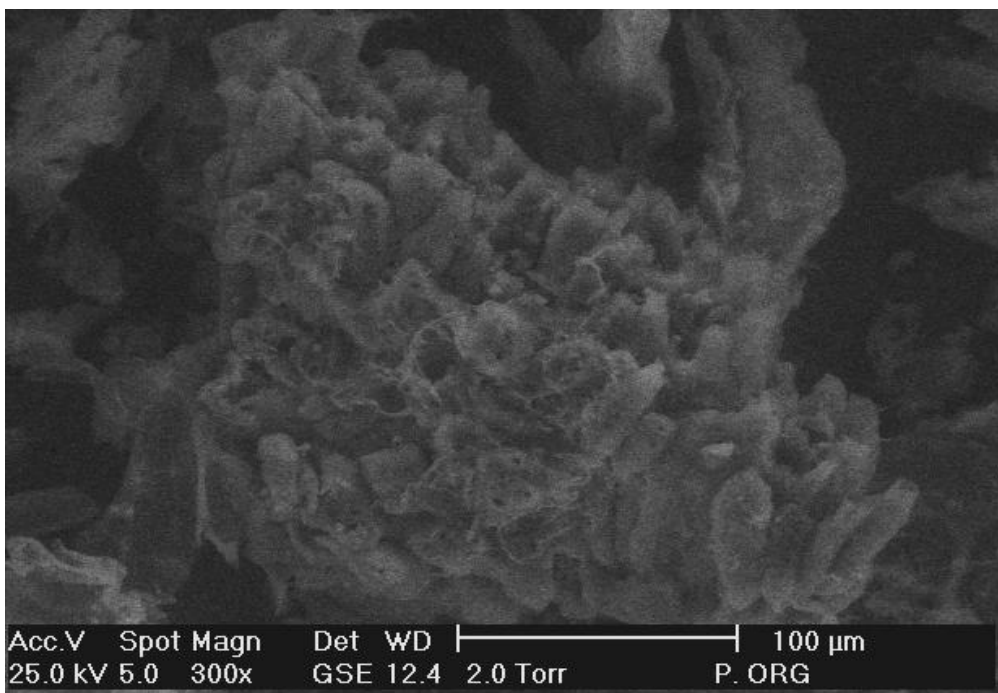


Figura 21. Microscopía electrónica de barrido ambiental del sólido resultante del pretratamiento organosolv

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en las fotografías anteriores existe una degradación de la superficie de las fibras de la HCC para cada pretratamiento en relación a la muestra inicial antes mostrada. En la Figura 19, que corresponde al pretratamiento ácido (recordemos que en esta etapa se realizó la sacarificación del material lignocelulósico), existe una mayor degradación de éstas fibras en comparación con los otros sólidos pretratados debido a que se logró hidrolizar en mayor grado la celulosa, se observa la superficie del material vegetal extremadamente poroso y con una estructura amorfa. En el caso del efecto del pretratamiento básico/oxidante al 15% se observa degradación de las fibras de celulosa pero en menor grado; existe la presencia de porosidades en la superficie haciéndola rugosa y muy heterogénea (Figura 20). Por último, los sólidos resultantes del pretratamiento organosolv muestran la presencia de fibras deterioradas y zonas heterogéneas en su superficie mostrando zonas con hendiduras muy marcadas. (Figura 21)

3.3.3. Efecto de los pretratamientos en la cristalinidad de la celulosa de la harina de cáscara de cacahuate

La fibra celulósica es un polímero policristalino que se compone de una parte cristalina y otra parte amorfa. La hemicelulosa y la lignina son sustancias amorfas, mientras que la celulosa es la región cristalina. (Ramos, Assaf 2005). Con el objetivo de observar el comportamiento de estas 2 regiones en la HCC frente a los pretratamientos, se realizó un análisis de difracción de Rayos X (Difractómetro de Rayos X, D8-Discover).

Con este análisis, es posible conocer la tendencia y el efecto de cada proceso en la estructura morfológica de la muestra de estudio, ya que lo que se prefiere es tener mayoritariamente regiones amorfas debido a que son más susceptibles a la sacarificación.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

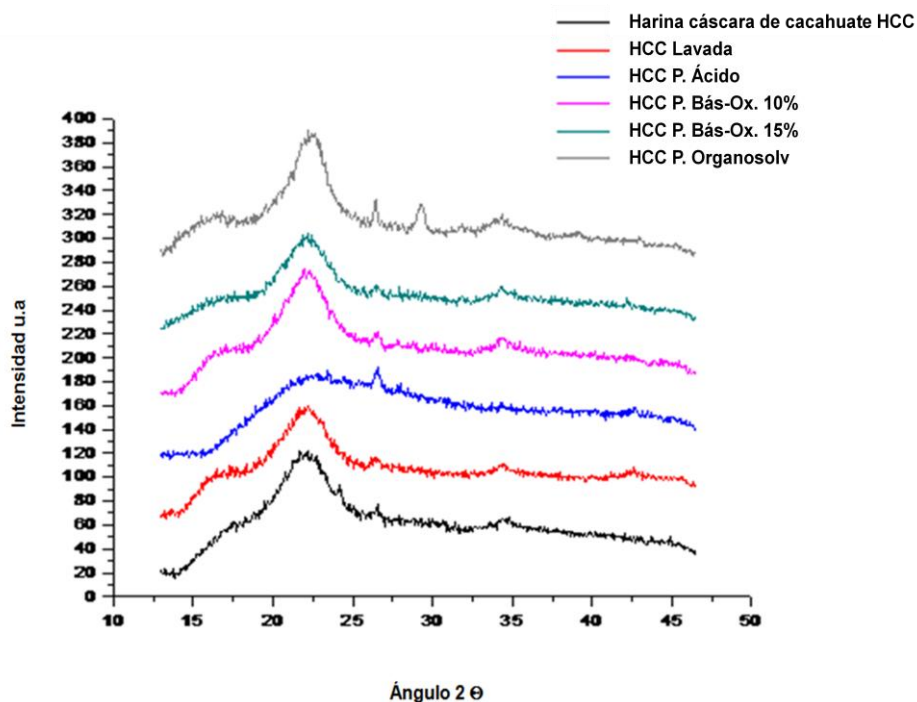


Figura 22. Diagrama de dispersión de Rayos X de los sólidos de HCC resultante de los pretratamientos

La región amorfa de la celulosa se atribuye a la intensidad entre 14 y 19° (ángulo 2θ) mientras que la región cristalina de la celulosa se atribuye a la intensidad entre 22 y 33° (Ramos, Assaf 2005).

En la figura 22 se observa el diagrama de dispersión de rayos X. Para realizar el análisis de cristalinidad se tomará como referencia a la muestra molida de HCC. En la muestra lavada (curva roja) se observa que disminuyó la región cristalina y aumentó la región amorfa debido a la eliminación de hemicelulosa, lignina y celulosa menos ordenada. En el pretratamiento ácido (curva azul) fue en donde se afectó más la cristalinidad de la muestra ya que como observa la disminución de las señales de las regiones amorfas y cristalinas a consecuencia de las condiciones ácidas del pretratamiento y de la subsecuente sacarificación. Para el caso de los pretratamientos básico/oxidante, cuando se realizó de sólidos 10% de concentración (curva rosa), se observa que aumento la parte amorfa y disminuyó un poco la parte cristalina, esto se explica con el hecho de que en las condiciones del pretratamiento se removió cierta parte cristalina de la fibra celulósica dejando su estructura más amorfa. En cuanto al pretratamiento básico/oxidante al 15%

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(curva verde) sólo se aprecia la disminución de la zona cristalina. Finalmente para el tratamiento organosolv se presentó un aumento la región cristalina, del mismo modo se detectó un aumento de la señal de la región amorfa, lo que se refiere a una eliminación de lignina y hemicelulosa que corresponden a las zonas amorfas del material vegetal, se puede prever una disminución del grado de hidrólisis en operaciones subsecuentes.

En la Figura 23 que se muestra a continuación, se hace referencia al Índice de cristalinidad (I_c) de los sólidos pretratados mediante Difracción de Rayos X en donde todos los pretratamientos tuvieron una ligera disminución de la región cristalina debido al tratamiento químico o físico a los que fueron sometidos, excepto en el pretratamiento Básico-Oxidante al 10%. El pretratamiento Básico-Oxidante al 15% y la muestra lavado obtuvieron el mismo I_c . El pretratamiento ácido, en comparación a la HCC molida, fue el que presentó mayor daño en la cristalinidad de la celulosa lo que nos da una idea de que quedó mayoritariamente regiones amorfas y que serán más susceptibles a la sacarificación y por lo tanto se obtendrán mayores concentraciones de azúcares fermentables. En general, no se observó un gran efecto en el I_c a consecuencia de los pretratamientos. El índice de cristalinidad (I_c) se calcula con la siguiente ecuación (Ramos *et al.*, 2005):

$$I_c = \left[1 - \frac{I_{am}}{I_{crist}} \right] \times 100$$

I_{am} = Intensidad del pico amorfo a 2θ en 18°

I_{crist} = Intensidad del pico cristalino a 2θ en 22°

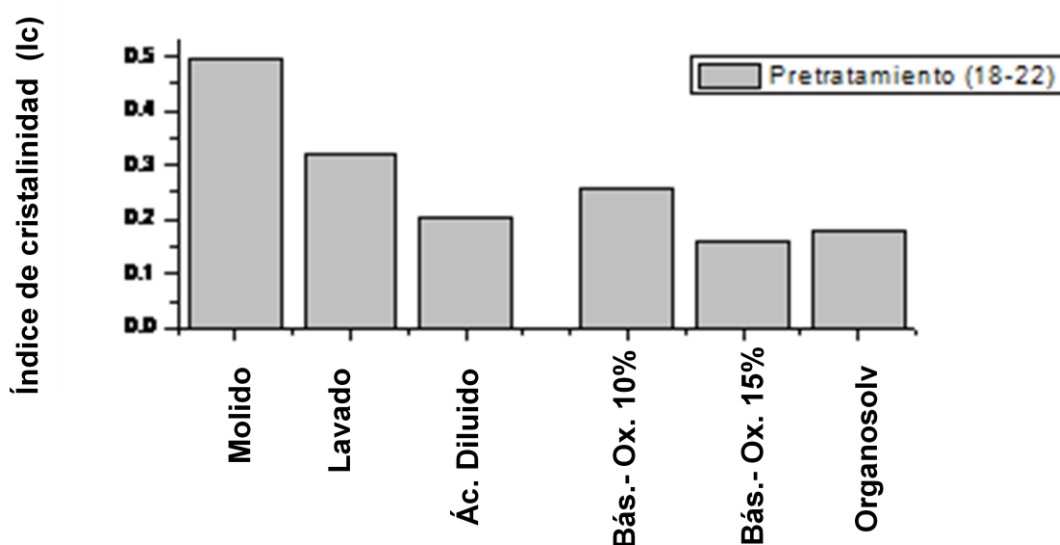
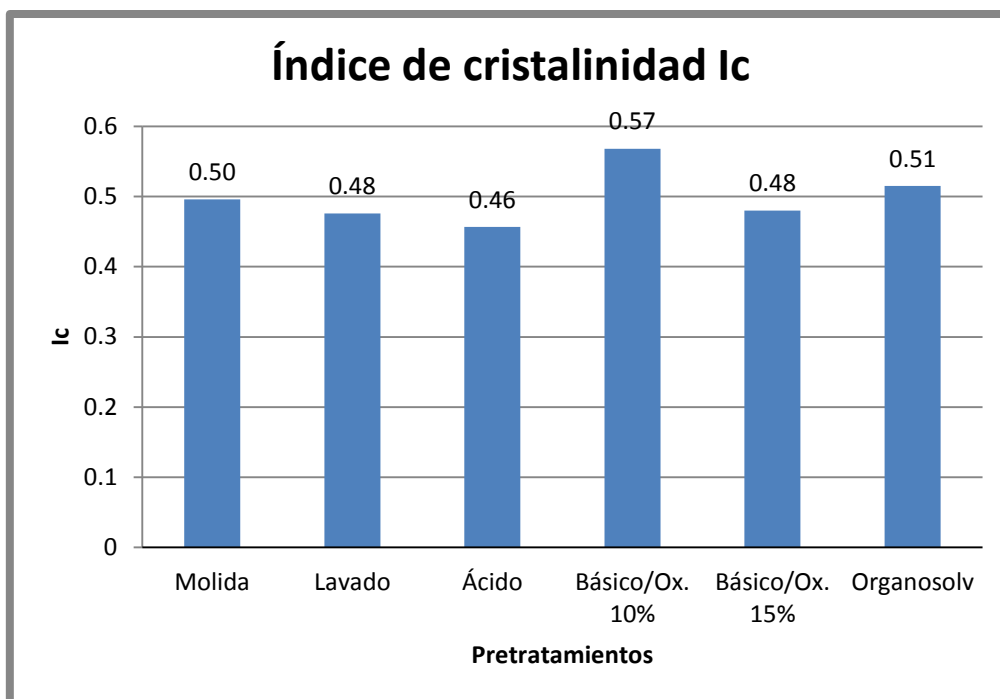


Figura 23. Gráfico del índice de cristalinidad (I_c) en los sólidos resultantes de los pretratamientos

3.4. HIDRÓLISIS (SACARIFICACIÓN)

Después de obtener los jarabes de cada pretratamiento, se realizó la sacarificación de los sólidos resultantes con las condiciones descritas en la sección de metodología. Se cuantificaron los azúcares reductores (AR) y totales (AT) en los jarabes obtenidos por los métodos antes mencionados. A

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

continuación se muestran los rendimientos de AR (Figura 24) y AT (Figura 25) expresados en $\text{g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$.

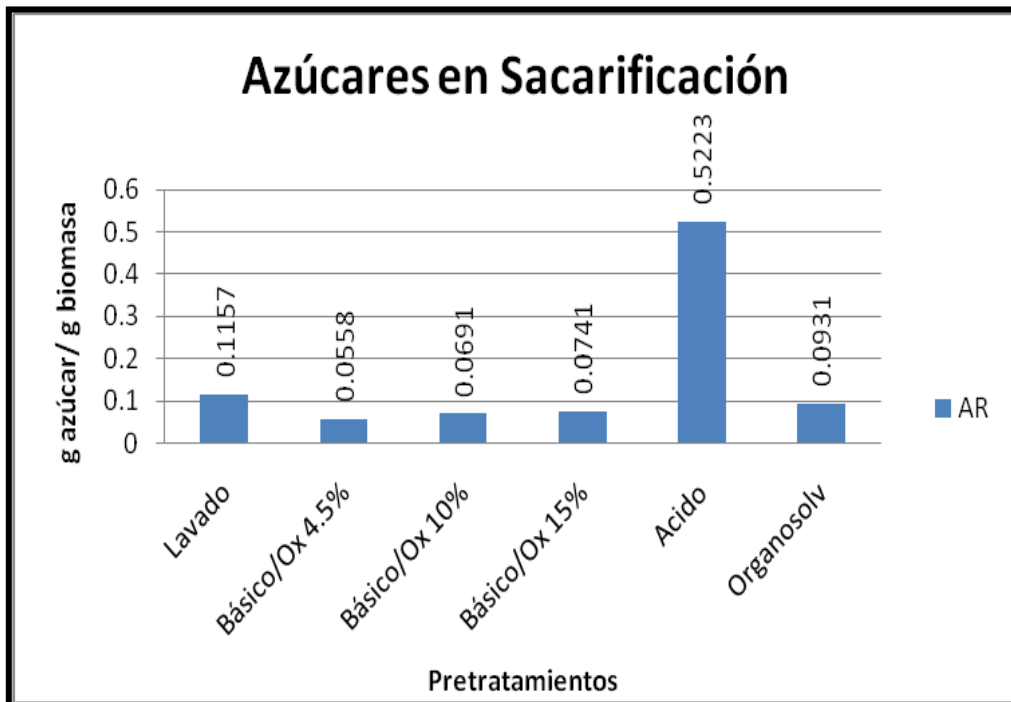


Figura 24. Rendimiento de azúcares reductores provenientes de la sacarificación de HCC pretratados

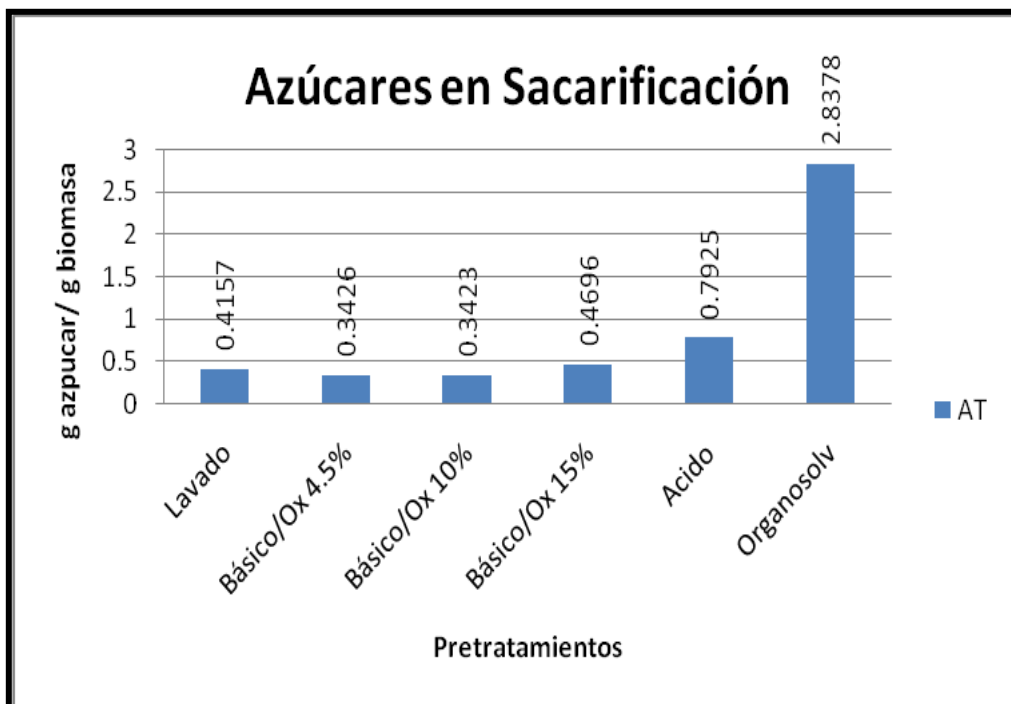


Figura 25. Rendimiento de azúcares totales provenientes de la sacarificación de HCC pretratados

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el jarabe proveniente de la sacarificación de los sólidos mediante pretratamiento ácido, se puede observar que en este tratamiento se obtuvo la mayor concentración de azúcares reductores con $0.52 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ con respecto a los otros pretratamientos. En cuanto a los azúcares totales, se obtuvo una mayor concentración de AT en el jarabe proveniente de la sacarificación del pretratamiento organosolv con $2.84 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$. Aquí, los azúcares obtenidos mediante este proceso son mayoritariamente azúcares no reductores provenientes de una hidrólisis deficiente. En los jarabes sacarificados de los pretratamientos básico/oxidante se observa un ligero incremento en la concentración de azúcares reductores generados a medida de que aumentaba la concentración de los sólidos en el pretratamiento al pasar de 0.056, 0.07 y $0.075 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ de AR para las concentraciones de 4.5, 10 y 15% respectivamente. En tanto que los AT que se obtuvieron son 0.34, 0.34 y $0.46 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ para las concentraciones de sólidos ya mencionadas.

Del mismo modo que en los pretratamientos se caracterizaron los jarabes de sacarificación en relación al grado de polimerización de los azúcares presentes. Para el jarabe obtenido del material lavado se obtuvo un grado de polimerización (GP) de 3.6, que es mayor al GP del lavado (2.3) debido a que ahora se encuentran oligómeros ligeramente más largos. Los sólidos retenidos fueron el 60% de la biomasa inicial por lo tanto se logró solubilizar el 40%. El jarabe resultante obtuvo una concentración de sólidos solubles de 3.1°Bx .

En la sacarificación de los jarabes del pretratamiento organosolv se obtuvo un aumento importante en el GP de 30.5, esto es debido a que como se mencionó anteriormente se generó una gran cantidad oligómeros provenientes de la ruptura de la HCC. Se logró solubilizar el 36% de los sólidos iniciales y se obtuvo un jarabe de 6.6°Bx .

Finalmente, en el jarabe de sacarificación del pretratamiento básico/oxidante se obtuvieron GP de 6.1, 4.9 y 6.3 para las concentraciones de 4.5, 10 y 15% respectivamente. También se observa un incremento del GP con respecto a los obtenidos en los pretratamientos con 3.6, 4.1 y 6.4%.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los jarabes de sacarificación, no se encontraron derivados de furfural por consecuencia del medio ácido al que fue sometida la materia vegetal, esta evaluación es de suma importancia porque es la etapa previa a la fermentación y puede ocasionar la disminución de la capacidad de las levaduras para producir etanol.

De igual manera se realizó la determinación del grado de polimerización para los jarabes sacarificados. En la figura 26 se muestran los valores obtenidos para cada pretratamiento observando un aumento del G.P en cada uno después de la hidrólisis ácida a las que fueron sometidas lo que nos dice que se realizó una hidrólisis incompleta obteniendo pocos monómeros y un mayor número de oligómeros. Cabe destacar el aumento en el tratamiento organosolv ya que detener un valor de 1.54 en el pretratamiento se obtuvo un valor alrededor de 30, pasando de ser el pretratamiento más eficiente a ser el de menor eficiencia.

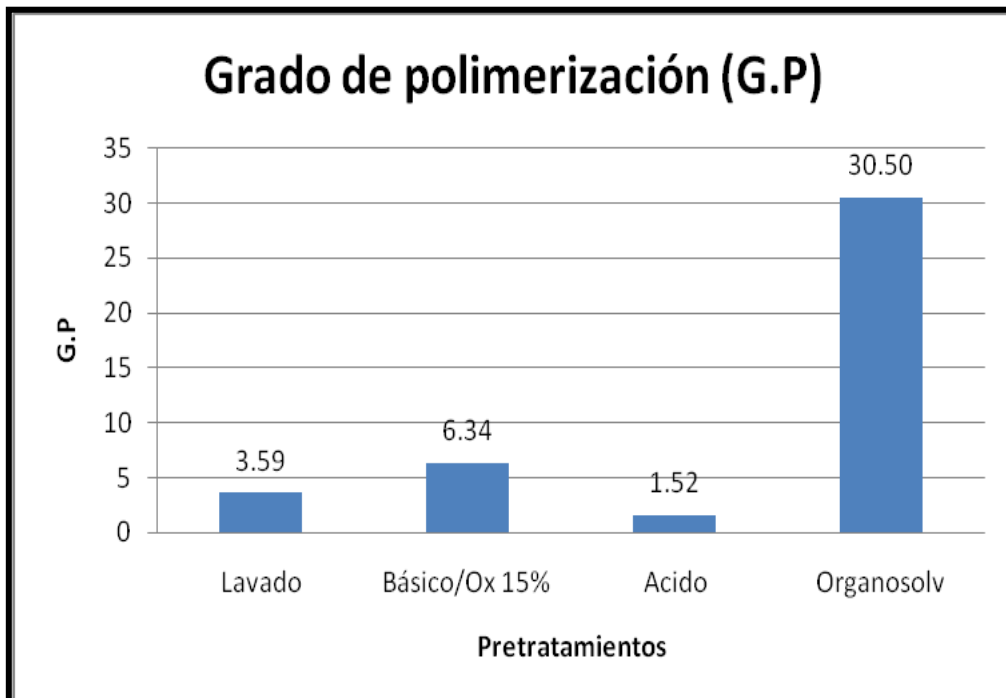


Figura 26. Grado de polimerización de los sólidos pretratados después de la sacarificación

3.4.1. Efecto de la sacarificación en la estructura de la harina de cáscara de cacahuete

Se realizó un análisis microscópico para conocer el efecto que tienen las condiciones de sacarificación sobre el material lignocelulósico y poder observar la degradación de la celulosa en cada uno de los casos. A continuación se muestran las microscopías de las muestras sacarificadas

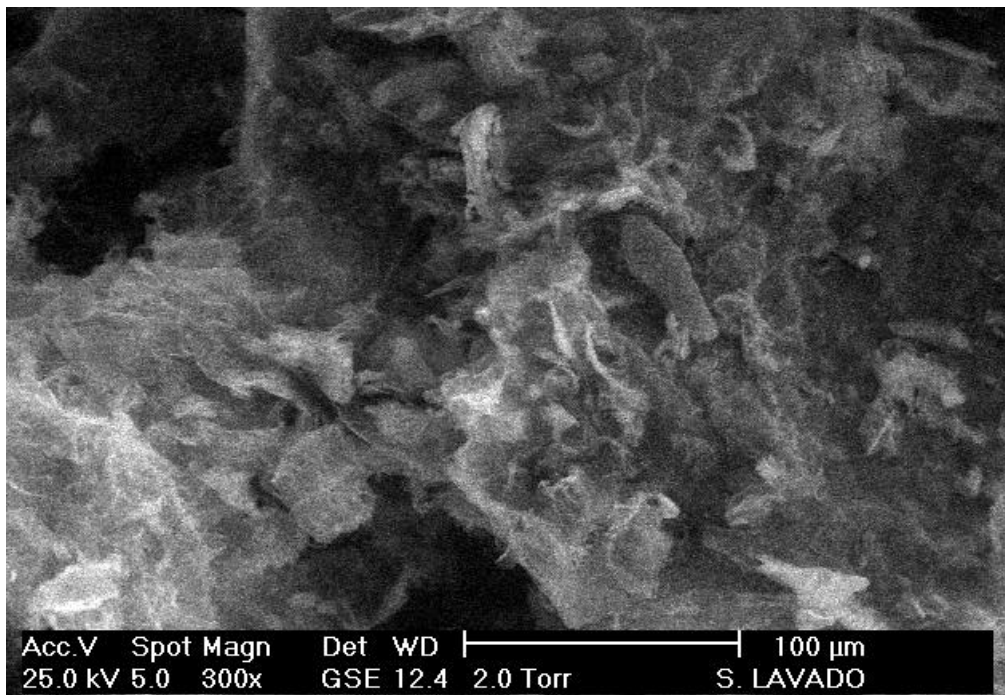


Figura 27. Microscopía electrónica de barrido ambiental para la muestra lavada sometida a sacarificación

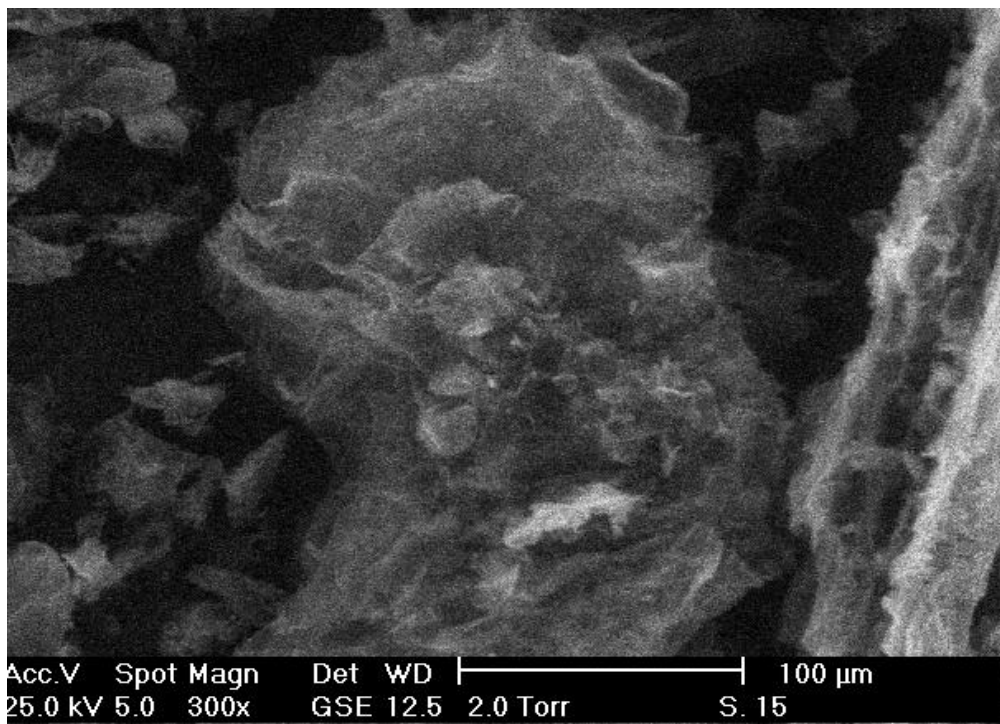


Figura 28. Microscopía electrónica de barrido ambiental para la muestra proveniente del pretratamiento básico/oxidante al 15% sometida a sacarificación

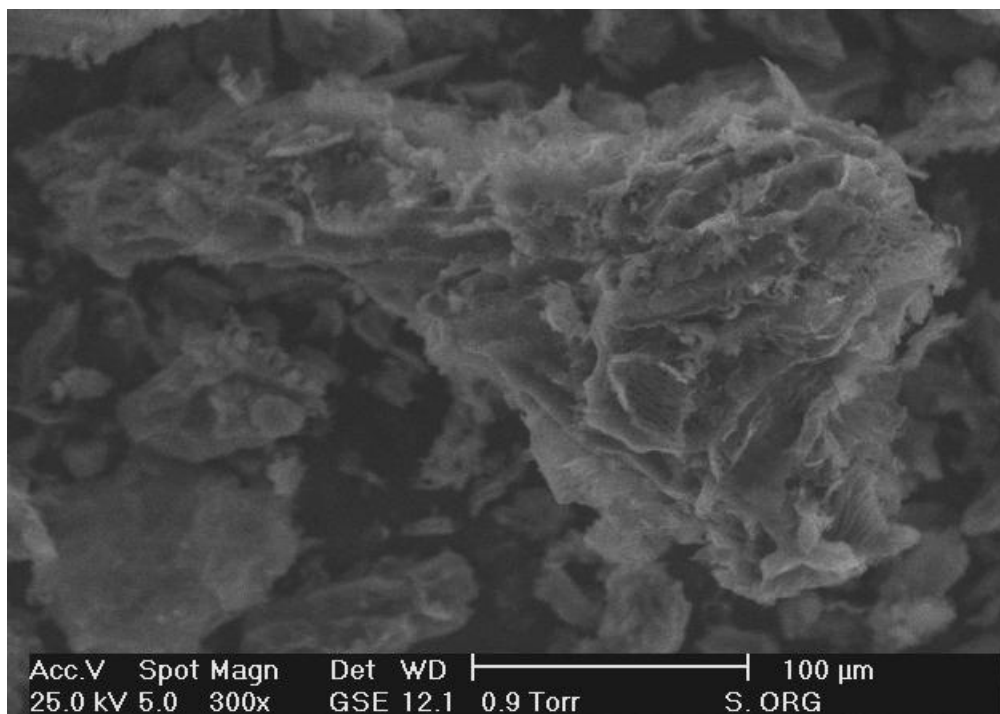


Figura 29. Microscopía electrónica de barrido ambiental para la muestra proveniente del pretratamiento organosolv sometida a sacarificación

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las fotografías anteriores se puede observar el deterioro de las fibras celulósicas del material tratado en relación al material sin tratamiento (Figura 15), en cada uno de los casos se realizó hidrólisis de éstas ocasionando el aumento de la porosidad en la superficie. En la sacarificación de los materiales vegetales, el pretratamiento organosolv fue el que presentó mayor efecto en la estructura originando una mayor heterogeneidad y una apariencia rugosa en la fibra (Figura 29), este hecho se puede asociar a que se obtuvieron mayores concentraciones de azúcares totales en el jarabe de reacción debido al incremento de la despolimerización de la celulosa en la HCC.

3.4.2. Efecto de la sacarificación en la cristalinidad de la celulosa de cáscara de harina de cacahuete

En el proceso de sacarificación, también se realizó el estudio de la difracción de rayos X del material de cada pretratamiento, para conocer el efecto de éste en la HCC.

En la Figura 30 se muestran las curvas de intensidad de las regiones amorfas y cristalinas de las muestras celulósicas en estudio. Se observa que el pretratamiento básico/oxidante al 10% de concentración de sólidos (curva azul) fue la que presentó mayor efecto en la zona cristalina y desapareció totalmente la región amorfa de la celulosa en relación a las obtenidas en los pretratamientos (Figura 22), este hecho pudiera explicar el aumento en la concentración de azúcares fermentables en la sacarificación, aunque no fue el que obtuvo mayor concentración de éstos en los pretratamientos. En los demás pretratamientos se sigue apreciando las regiones amorfas y las regiones cristalinas de la molécula.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

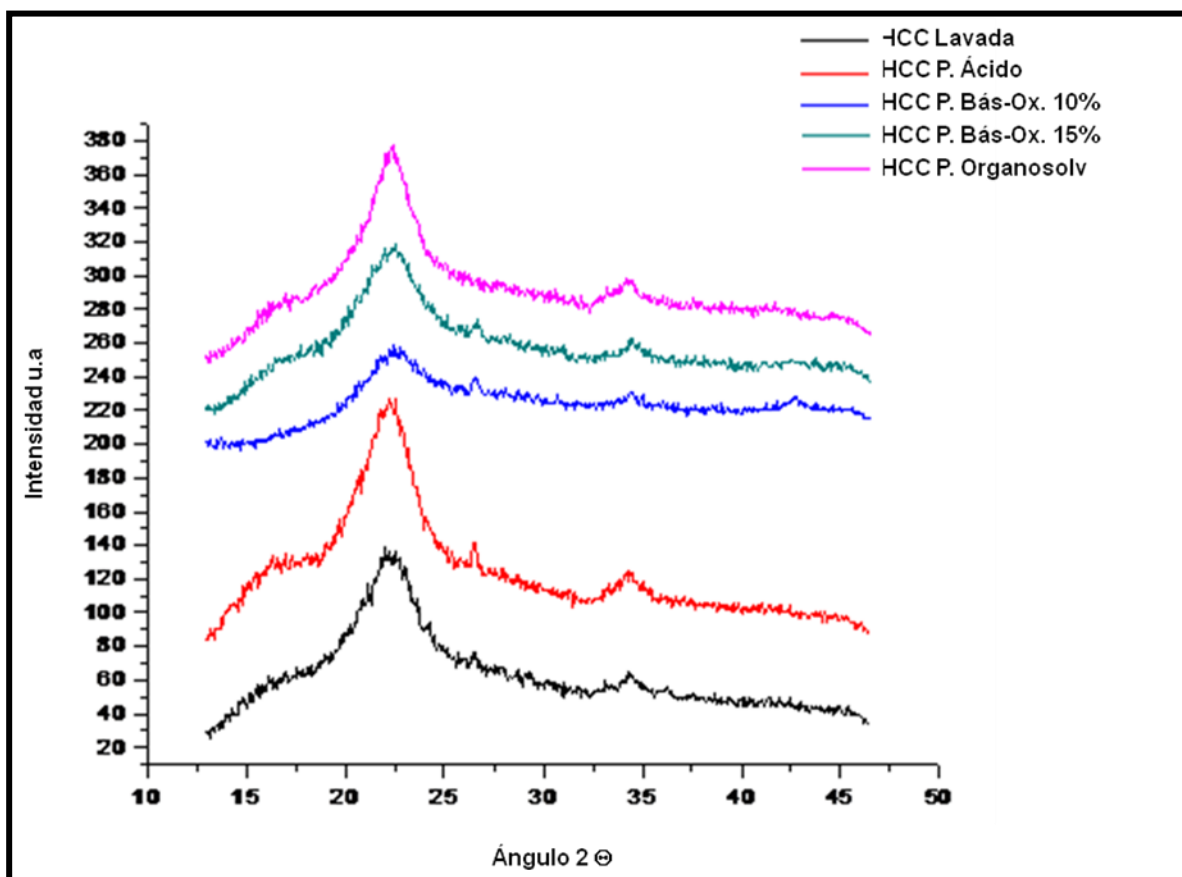


Figura 30. Diagrama de dispersión de Rayos X provenientes de la sacarificación de los sólidos pretratados de la HCC

Del mismo modo se obtuvieron los índices de cristalinidad (I_c) para los sólidos resultantes de la sacarificación de cada pretratamiento con el fin de observar la tendencia del incremento o disminución de la cristalinidad del material lignocelulósico de estudio.

En la Figura 31 se muestran los I_c de cada pretratamiento, en donde se tiene que en todos los pretratamientos aumentó la parte cristalina de la celulosa (en relación al I_c de pretratamiento, Figura 23) durante el proceso de sacarificación, esto puede aludirse a que en esta etapa se eliminó la parte amorfa de la molécula transformándola en azúcares más simples, esta tendencia de la región amorfa también se puede observar en la Figura 30 que como ya se había mencionado, desapareció completamente.

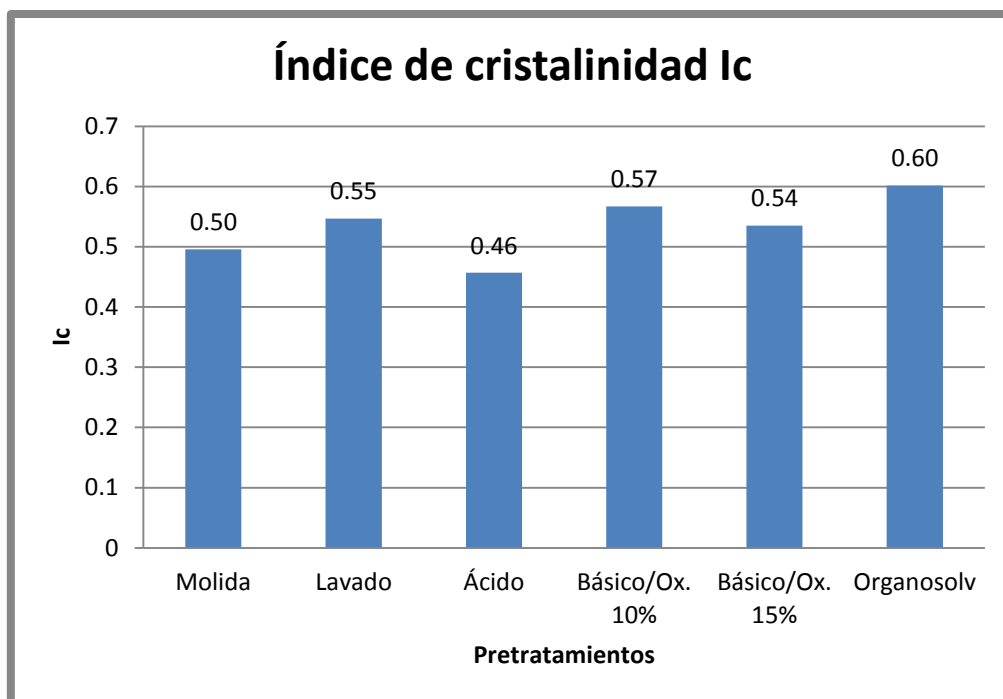


Figura 31. Índice de cristalinidad (I_c) en los sólidos resultantes de la sacarificación de los sólidos resultantes de cada pretratamiento

3.5. FERMENTACIÓN

Para la etapa de fermentación se prepararon jarabes de 100 mL a partir de las mezclas de los jarabes obtenidos en el lavado, el pretratamiento y la sacarificación para cada pretratamiento con el fin de obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables y así el mayor rendimiento de etanol. Las mezclas preparadas fueron las siguientes:

- I. Jarabes provenientes de la muestra lavada
100 mL de jarabe de la muestra lavado, en donde se tienen 0.75 g/L de azúcares reductores y 1.7 g/L de azúcares totales.
- II. Jarabes provenientes del pretratamiento básico/oxidante al 15%
 - 10 mL de jarabe de la muestra lavada
 - 20 mL de jarabe proveniente del pretratamiento
 - 70 mL de jarabe proveniente de la sacarificación

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. Jarabes provenientes del pretratamiento ácido

- 10 mL de jarabe de la muestra lavada
- 90 mL de jarabe proveniente del pretratamiento/sacarificación

IV. Jarabes provenientes del pretratamiento organosolv

- 10 mL de jarabe de la muestra lavada
- 20 mL de jarabe proveniente del pretratamiento
- 70 mL de jarabe proveniente de la sacarificación

En cada jarabe de fermentación se realizó una neutralización para dar a la levadura un ambiente óptimo. Se realizó la cuantificación de azúcares reductores y totales con el fin de conocer la concentración de la que se parte el proceso fermentativo. Las gráficas siguientes (Figura 32 y Figura 33), muestran los rendimientos de los azúcares presentes expresados en $\text{g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ en donde se muestra que en el jarabe de ácido diluido fue el más que concentrado y el de organosolv, el menos concentrado.

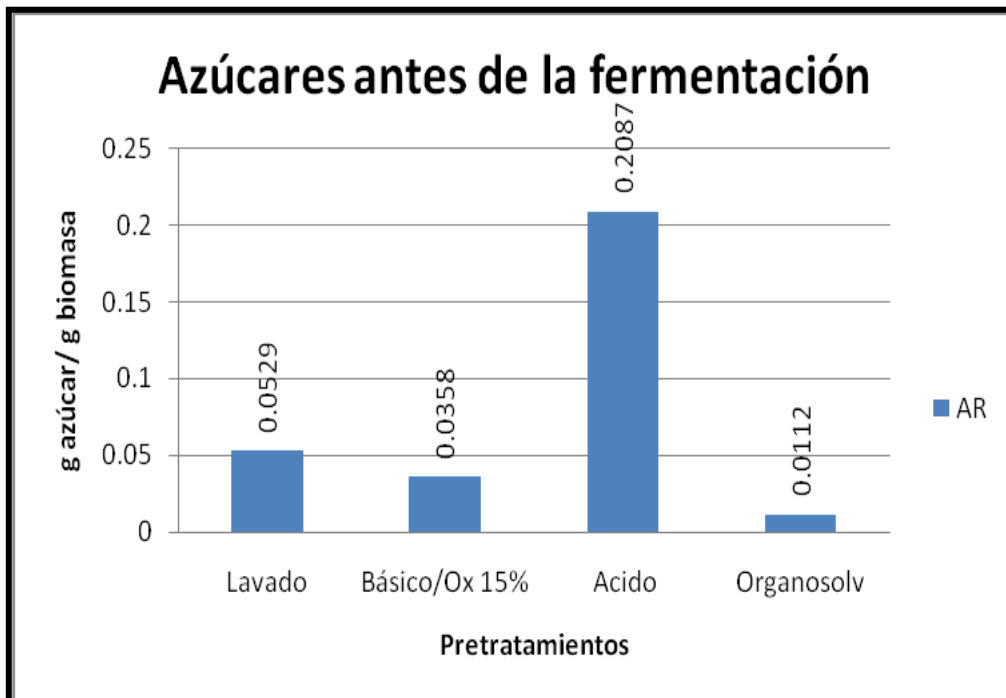


Figura 32. Rendimiento de azúcares reductores en los jarabes de cada pretratamiento antes de la fermentación

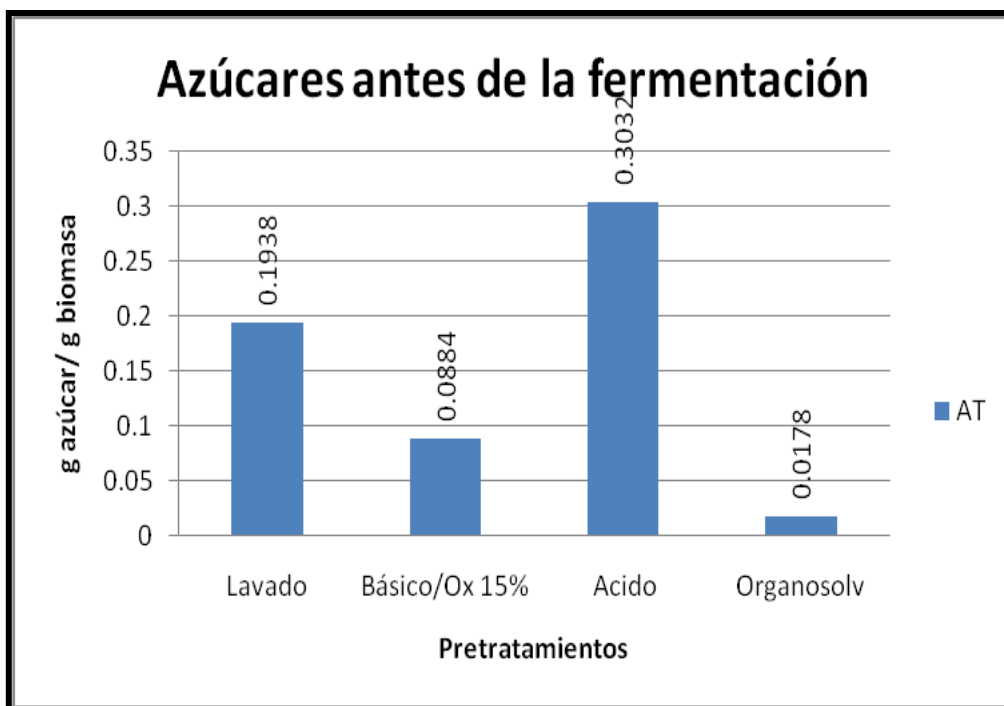


Figura 33. Rendimiento de azúcares totales en los jarabes de cada pretratamiento antes de la fermentación

Después de la fermentación se procedió a cuantificar azúcares reductores y totales con el fin de conocer la concentración final debido al consumo de la levadura (Figura 34 y Figura 35). Observamos que la levadura comercial utilizada no llegó a consumir todos los azúcares y que se atribuyó a que el tiempo de fermentación no fue el suficiente para consumir la glucosa presente, o bien, que se contaba con la presencia de azúcares reductores presentes que la levadura no es capaz de fermentar como las pentosas provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa. El jarabe del pretratamiento ácido fue el que obtuvo mayor concentración de azúcares no consumidos, alrededor del 70% de AR y 53% de AT. Según Castro, M., Alriksson, B., et al (2007) el pretratamiento ácido de la cáscara de cacahuate forma productos que inhiben la fermentación hasta en un 60% aproximadamente, dato superior a la inhibición en el bagazo de caña, cáscara de arroz y los tallos de yuca. El jarabe del material lavado reportó ser el que se consumieron el mayor número de azúcares con aproximadamente el 20% de AR y 22% de AT no consumidos por la levadura. Para el tratamiento básico oxidante se obtuvo aproximadamente 69% de AR y 63% de AT no consumidos, por lo que fue el pretratamiento en el que menor consumió la levadura. Y en el pretratamiento organosolv se obtuvieron

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aproximadamente el 47% de AR y el 46% de azúcares no consumidos (Figura 36 y 37).

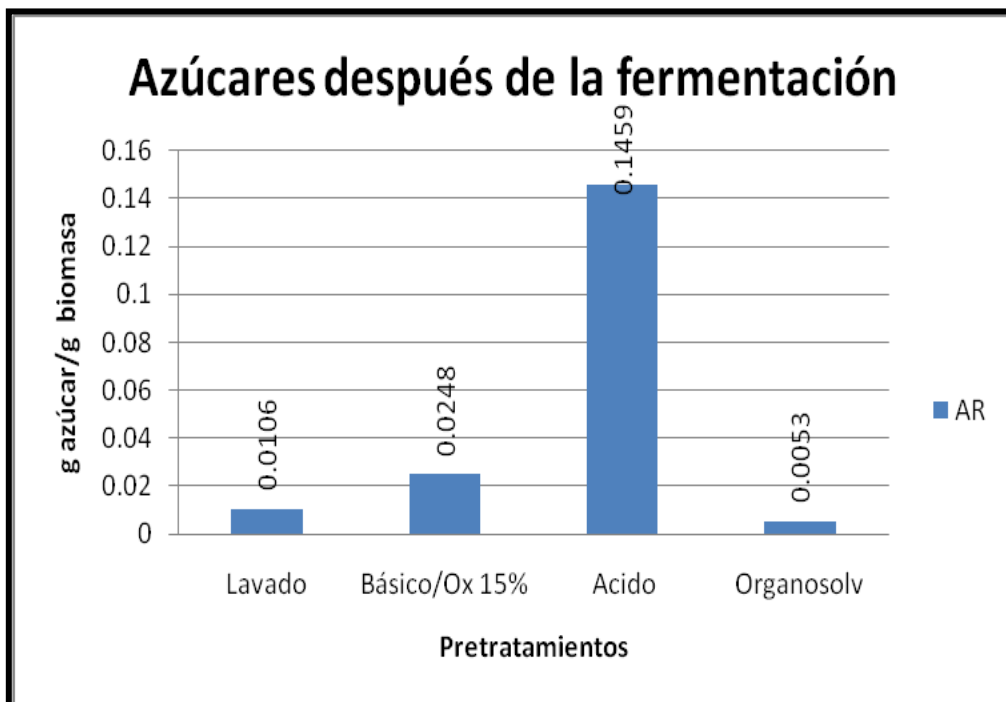


Figura 34. Rendimiento de azúcares reductores en los jarabes de cada pretratamiento después de la fermentación

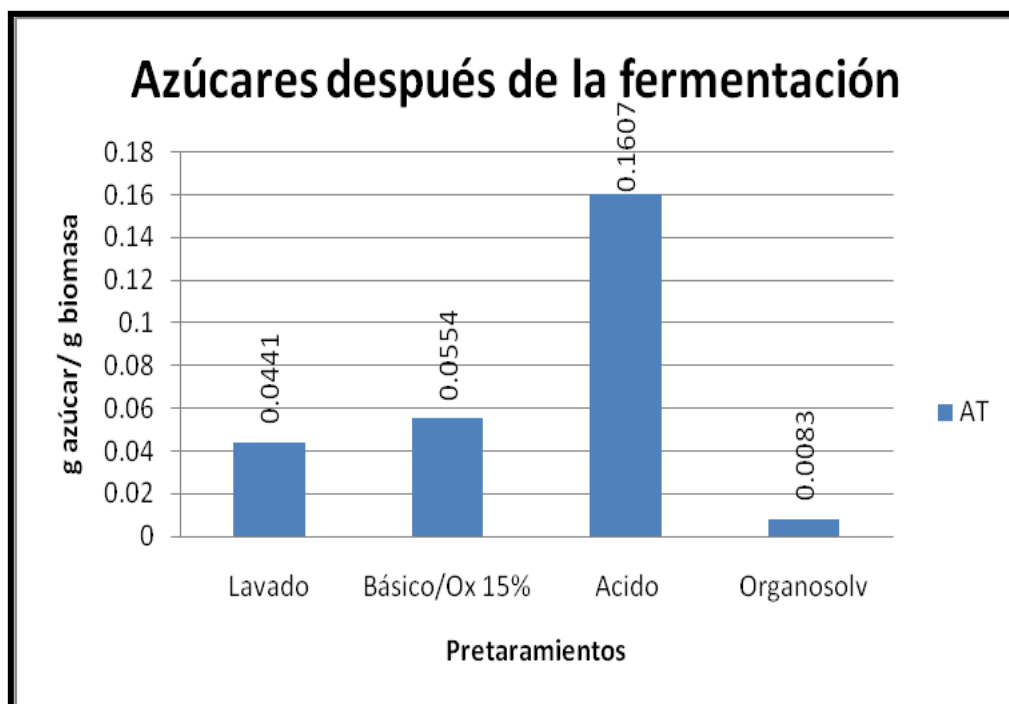


Figura 35. Rendimiento de azúcares reductores en los jarabes de cada pretratamiento después de la fermentación

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

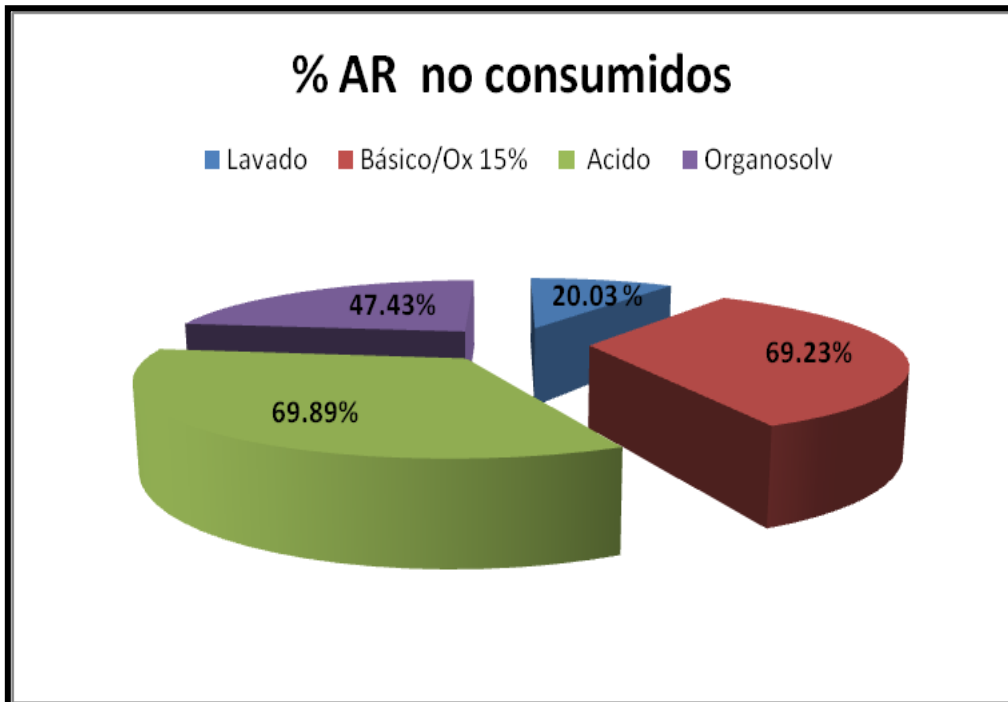


Figura 36. Cantidad de azúcares reductores no consumidos en el proceso de fermentación

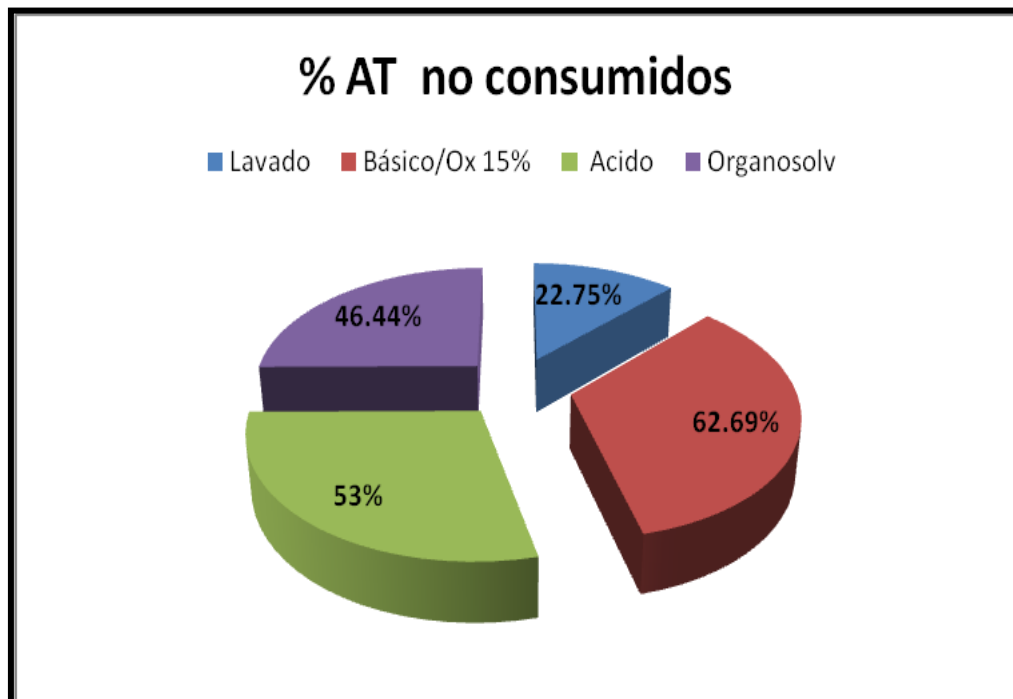


Figura 37. Cantidad de azúcares totales no consumidos en el proceso de fermentación

3.6. OBTENCIÓN DE ETANOL

A partir de los jarabes fermentados de cada pretratamiento, se tomó una muestra y después se filtró en un vial para determinar la concentración de etanol producido en cada uno de ellos mediante cromatografía de gases.

Se obtuvo el rendimiento $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ para cada uno de los pretratamientos (Figura 38) en donde se muestra que en el pretratamiento ácido se obtuvo el mayor rendimiento con aproximadamente $0.012 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ a pesar que la levadura comercial que se utilizó en la fermentación dejó sin consumir casi $0.15 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ (Figura 34). En el pretratamiento básico/oxidante al 15% de concentración de sólidos se obtuvo el rendimiento más bajo en la producción de etanol con alrededor de $0.0008 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ esto pudo deberse a que la mayoría de los azúcares reductores presentes en el jarabe no eran fermentables por la levadura.

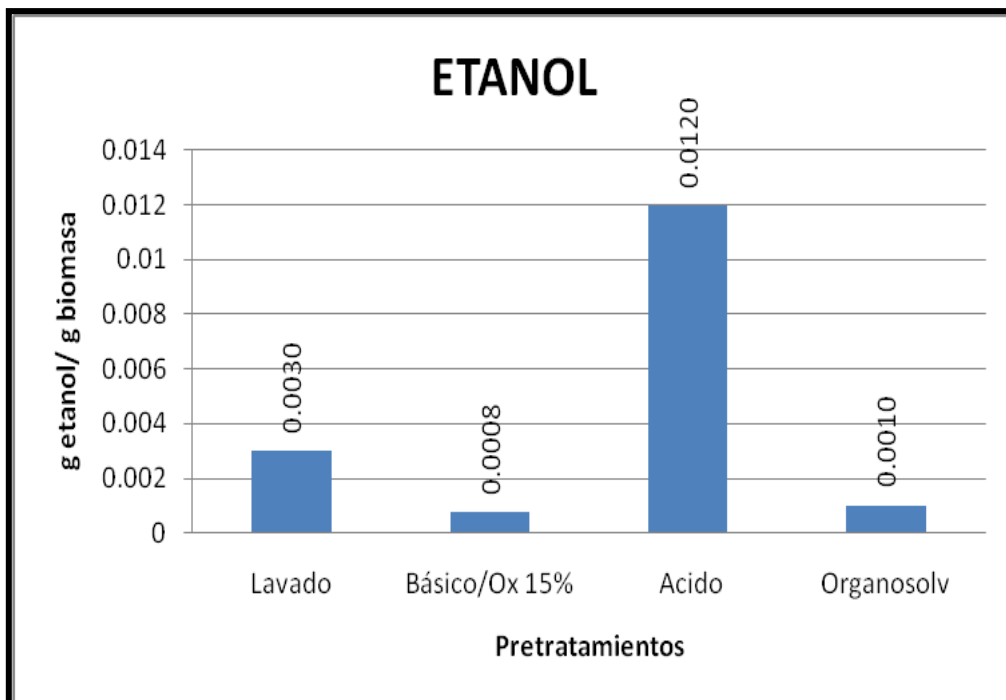


Figura 38. Rendimiento de etanol producido de cada pretratamiento en relación a la biomasa

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 39 se muestra el rendimiento de etanol producido en relación a los gramos de azúcares fermentados en cada uno de los pretratamientos. La muestra lavada obtuvo mayor cantidad de etanol generado en comparación a los demás tratamientos alrededor de $0.3 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{azúcar}}$ mientras que el básico/oxidante que fue el que menor cantidad de etanol produjo fue de $0.025 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{azúcar}}$ aproximadamente.

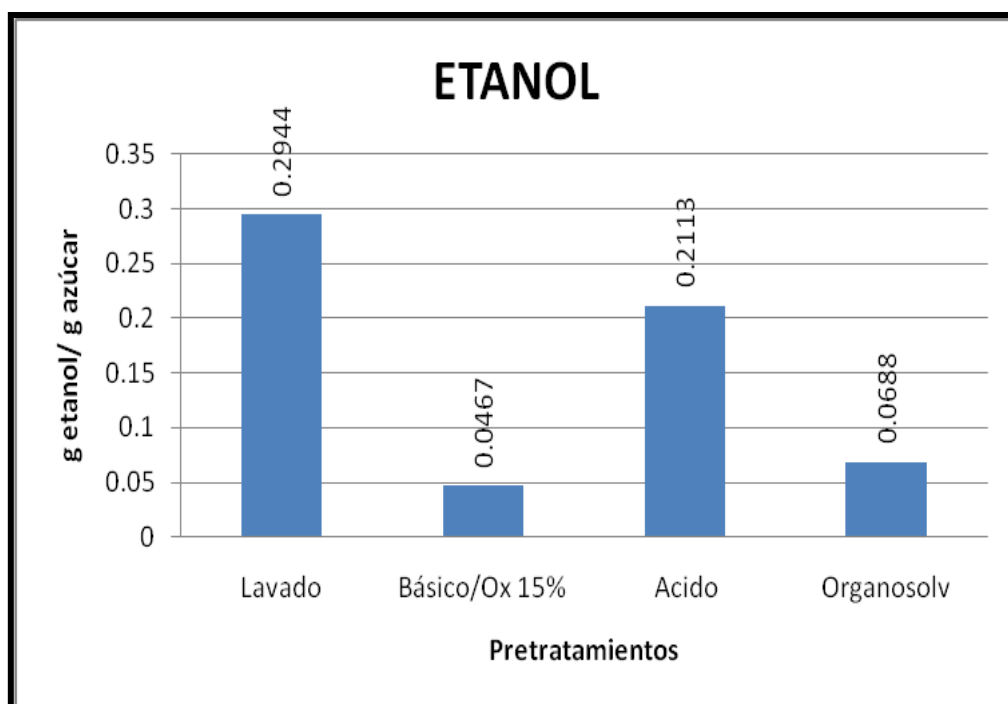


Figura 39. Rendimiento de etanol producido de cada pretratamiento en relación a los azúcares consumidos

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de $0.511 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$ (Vázquez, Dacosta 2007), y tomando como referencia, se muestran los rendimientos de etanol para cada pretratamiento realizado en donde el máximo obtenido es alrededor del 60% en la muestra lavada y el mínimo 5% aproximadamente en el tratamiento básico/oxidante (Figura 40).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

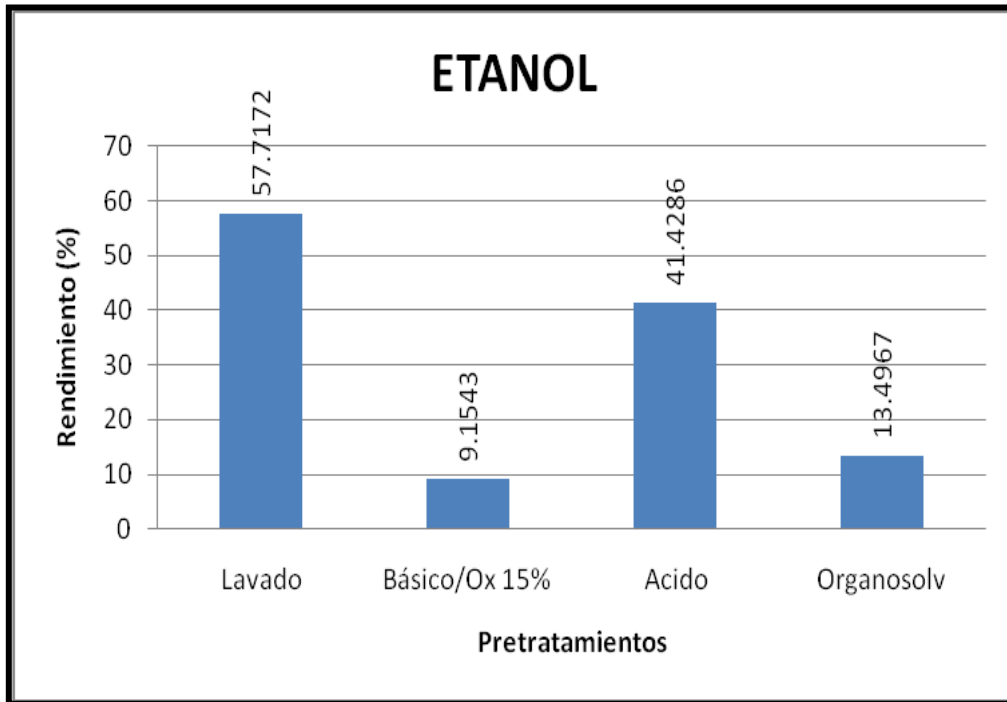


Figura 40. Rendimiento de etanol producido de cada pretratamiento en relación al rendimiento teórico estequiométrico

Sin embargo, el rendimiento experimental varía entre 90 y 95% e industrialmente el rendimiento se sitúa alrededor de los 87 y 93% (Vázquez, Dacosta 2007). Conociendo esto, se obtiene un rendimiento en la muestra lavada de 69%.

CONCLUSIONES

- El pretratamiento ácido generó la mayor cantidad de azúcares reductores ($0.52 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$), a consecuencia de la sacarificación simultánea que ocurre en estas condiciones. Le sigue el pretratamiento básico-oxidante al 15% con $0.0392 \text{ g}_{\text{azúcar}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$.
- Se observó una degradación de la materia vegetal en cada uno de los pretratamientos, en los que destacó el pretratamiento ácido. Así mismo el índice de cristalinidad disminuye para todos los pretratamientos, excepto para el pretratamiento Básico oxidante al 10%. La disminución del I_c indica que el material presenta una disminución preferente de la cristalinidad obteniéndose una proporción mayor de la región amorfa más susceptible a la sacarificación. En esta última etapa el índice de cristalinidad aumentó ligeramente, este hecho se alude a la degradación/eliminación de material amorfo del material vegetal.
- La HCC después de la sacarificación presentó mayor cantidad de azúcares reductores en los pretratamientos ácido y el de referencia (lavado).
- Se observó una disminución en el grado de polimerización (G.P) en los pretratamientos de la siguiente forma: Básico/alcalino 15% > Básico/alcalino 10% > Lavado > Organosolv > Ácido diluido, en donde estos dos últimos mostraron habilidad para transformar en polímero en oligómeros y monosacáridos. Después de la sacarificación se presentó un incremento en el G.P debido al efecto hidrólisis de la celulosa obteniendo oligómeros más grandes.
- En la fermentación, la muestra lavada mostró una disminución importante del contenido de azúcares reductores y totales al presentar 20 y 22% de azúcares no consumidos, respectivamente. En tanto que

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

los jarabes obtenidos en el tratamiento ácido y básico-oxidante al 15% presentaron un menor consumo de azúcares, 47 y 37% respectivamente. Esto puede atribuirse a que se pudieron generar azúcares reductores no fermentables por la levadura como consecuencia de la hidrólisis de hemicelulosa o que se encontraba presente algún factor que impidiera que el proceso fermentativo no se llevara a cabo, como los derivados de furfural, aunque no se hayan podido detectar por medio de HPLC

- La obtención de etanol a partir de la fermentación de los jarabes fue mayor en el jarabe obtenido del lavado de la HCC con un 57%. En el pretratamiento básico-oxidante al 15% se obtuvo el menor rendimiento de etanol con 9.15%.
- Aunque no se encontraron derivados de furfural mediante técnicas de HPLC en los procesos de pretratamiento y sacarificación, se observa una disminución de la eficiencia de la levadura en la fermentación al utilizar pocos azúcares fermentables y en consecuencia obtener un rendimiento menor de etanol.
- La mayor obtención de etanol se obtuvo entonces a partir del lavado de la harina molida de la cáscara de cacahuate, conlleva a una generación menor de residuos químicos, de tiempo y de energía, encontrándose un tratamiento más amigable con la naturaleza, menos costoso y que nos reditúa mejores beneficios en la producción del biocombustible.

RECOMENDACIONES

- Debido a que se obtuvo mayor rendimiento en la muestra de HCC sin tratamiento, se deben variar las condiciones de sacarificación y fermentación para aumentar la eficiencia del proceso.
- Se debe considerar una curva de detección de derivados de furfural menor a la realizada para detectar si efectivamente se generan estas moléculas que pudieron haber inhibido los pretratamientos químicos realizados, tomando en cuenta el límite de detección del equipo.
- La fermentación de azúcares reductores puede realizarse con una bacteria recombinante que tenga la capacidad de fermentar tanto hexosas como pentosas para poder aumentar los rendimientos de etanol convirtiendo los azúcares provenientes de la hemicelulosa que se considera parte importante de la materia vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

Aburto, J., Martínez, T., Murrieta, F. (2008) Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Tecnología, Ciencia, Educación* 23: 23-30.

Araque, E., Parra, C., Freer, J., *et. al.* (2008) Evaluation of organosolv pretreatment for the conversions of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* 43: 214-219.

Arguello, R., Gatani, M. Berretta, H. (2005) *Componentes constructivos elaborados con cáscara de cacahuete (maní) y cemento. Primeros estudios sobre las incompatibilidades físico -químicas en el fraguado del material.* Seminario Iberoamericano de Tecnología de Materiales Subprograma VIII CYTED: 3-51.

Arguello, R., Gatani, M., Berretta, H. (2005) Componentes constructivos con cáscara de cacahuete (maní) y cemento. Primeros estudios sobre las incompatibilidades físico-químicas en el fraguado del material. Seminario Iberoamericano de Tecnología de Materiales, Subprograma VIII: 1-10.

Balat, M., Balat, H. (2008) Progress in bioetanol process. *Progress in energy and Combustion Science* 34: 551-569.

Ballerini, D., Desmarquest, J., Pourquié, J. (1994) Ethanol production from lignocellulosics: Large scale experimentation and economics. *Bioresource technology* 50:17-23

Brethauer, S., Wyman, C. (2010) Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology* 101: 4862-4874.

BIBLIOGRAFÍA

Castro, A., Rodríguez, L., Díaz, J. (2007) Conversión hidrotérmica subcrítica de residuos orgánicos y biomasa. Mecanismos de reacción. Ingeniería e Investigación 27: 41-50.

Castro, M., Alriksson, B., et al (2007) Dilute Sulfuric Acid Pretreatment of Agricultural and Agro-Industrial Residues for Ethanol Production. Applied Biochemistry and Biotechnology vol. 136-140 pp. 339-352.

Chen, M., Zhao, J., Xia., Liming (2009) Comparison of four different chemical pretreatment of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. Biomass and Bioenergy 33: 1381-1385.

Demirbas, A. (2007) *Progress and recent trend in biofuels*. Progress in energy and combustion science 33: 1-18.

Evans, R., Czernik, S., Chornet, E., et. al. Engineering scale up renewable hydrogen Production by catalytic steam reforming of peanut shells pyrolysis products. DOE Hydrogen Program: 1-16.

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics): Producción agrícola, en línea, internet, 18 de septiembre del 2009, disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

Ferrer, A. (2008) Potencial de procesos de amonificación de folla en reactores para la producción de alimentos para animales y energía. Facultad Experimental de ciencias, Universidad del Zulia. Venezuela: 222-236.

Godoy, E. (2010) Etanol: un proyecto titubeante. Petróleo y Energía 42: 70-71.

Gray, K., Zhao, L., Emptage, M. (2006) Bioethanol, Current Opinion in Chemical Biology 10: 141-146

Hamelinck, C., Hooijdonk, G., Faaij, A. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. Biomass and Bioenergy 28: 384-410.

BIBLIOGRAFÍA

Hendriks, A., Zeeman, G. (2009) Pretreatments to enhance digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100: 10-18

Hidalgo, J (2003) Tratado de enología, Tomo 1 editorial Mundi Prensa Libros, primera edición, Madrid: 477-500.

Islas, J., Manzini, F., Maserá, O. (2007) A prospective study of bioenergy use in Mexico. *Energy* 32: 2306-2320.

Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A., *et al* Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat Straw a biorefinery concept. *Bioresource Technology* 100: 2562-2568.

Lee, J. (1997) Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* 56: 1-24.

Maserá, O., Rodríguez, N., *et al* (2006) Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México, Secretaría de Energía: 175-287.

Mesa, L., González, E., *et al.* (2010) *Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 2³ experimental design.* *Applied Energy* 87: 109-114.

Mosier, N *et al* (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96: 663-683.

Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B. (1996) *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production.* *Enzyme and Microbial Technology* 18: 312-331.

P. Alvira, E. Tomás-Pejó, *et al* (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 100 pp. 4851-4861.

BIBLIOGRAFÍA

Paquot, M., Thonart, P. (1986) Alternativas para la utilización de sustratos ligno-celulósicos: Hidrólisis ácida o enzimática de la celulosa. *Interferón y Biotecnología* 3: 87-102.

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.

Saha, B., Cotta, M. (2007) Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hull to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 528-532.

Sánchez, O., Cardona, C. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology* 99: 5270-5295.

SIAP: Anuario Estadístico de la Producción Agrícola, en línea, internet, 26 de septiembre del 2009, disponible en: http://www.siap.gob.mx/aagricola_siap/ientidad/index.jsp

Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83: 1-11.

Taherzadeh, M., Karimi, K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular sciences* 9: 1621-1651.

Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010) *Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment hydrolysis and fermentation*. *Bioresource Technology* 101: 4744-4753.

Terramoto, Y., Lee, S., Endo, T. (2009) Cost reduction and feedstock diversity for sulfuric acid-free ethanol cooking of lignocellulosic biomass as a pretreatment to enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 100: 4783-4789.

BIBLIOGRAFÍA

Vázquez, H., Dacosta, O (2007) Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología VIII.4*: 249-259.

Weil, J., Westgat, P., et, al (1994) Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. *Enzyme Microb. Technol* 16: 1002-1004.

Wyman, C. (1994) *Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities*. Bioresource technology 50: 3-16.

Yeboah, Y et al (2003) Biomass Pyrolysis Unit for the Production of Hidrogen from Peanut shell. Hydrogen, Fuel Cells and Infraestructure Technologies Program Review Meeting, Berkeley CA: 1-15.

Zhao, X., Cheng, K., Liu, D. (2009) *Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis*. *Appl. Microbiology Biotechnology* 82: 815-827.