



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DEL PRETRATAMIENTO Y SACARIFICACIÓN DE
RESIDUOS FORESTALES PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA
PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A ETANOL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

JORGE JOEL AYALA VILLALOBOS

MÉXICO, D.F., 2013.





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: VICTOR MANUEL LUNA PABELLO**

VOCAL: **Profesor: LUIS FERNANDO OLGUIN CONTRERAS**

SECRETARIO: **Profesor: JORGE ARTURO ABURTO ANELL**

1er. SUPLENTE: **Profesor: JUVENAL FLORES DE LA ROSA**

2° SUPLENTE: **Profesor: ALFONSO DURAN MORENO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO

ASESOR DEL TEMA:

DR. JORGE ARTURO ABURTO ANELL

SUPERVISORA TÉCNICA:

DRA. ILIANA DEL CARMEN BARRERA MARTINEZ

SUSTENTANTE:

JORGE JOEL AYALA VILLALOBOS

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.

1.1. BIOCOMBUSTIBLES.....	4
1.2. BIOETANOL EN MÉXICO Y EN EL MUNDO.....	7
1.3. ETANOL COMO BIOCOMBUSTIBLE.....	15
1.4. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	19
1.5. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL MEDIANTE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	28
1.6. PRETRATAMIENTOS DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	29
1.7. SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	39

CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

2.1. OBJETIVO GENERAL.....	43
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
2.3. HIPÓTESIS.....	43

CAPÍTULO III. MATERIAL Y METODOLOGÍA

3.1. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.....	44
3.2. REACTIVOS Y EQUIPO.....	45
3.3. METODOLOGÍA DESCRIPTIVA.....	47
3.3.1. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	47
3.3.2. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	48
3.3.3. OPTIMIZACIÓN DEL PRETRATAMIENTO ÁCIDO MEDIANTE UN DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	54
3.3.4. PRETRATAMIENTOS DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	57
3.3.5. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	66
3.3.6. IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC.....	67

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.	69
4.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS.	73
4.3. PRETRATAMIENTOS DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.	90
4.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.	95
4.5. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC.	101
4.6. BALANCE GLOBAL DEL PROCESO (A. TOTALES, A. REDUCTORES Y LIGNINA).	103

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.

5.0 CONCLUSIONES.	111
------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS.

BIBLIOGRAFÍA.	113
ANEXO A. CARACTERIZACION MADERA IXTLÁN Y CURVAS PATRÓN.	116
ANEXO B. DISEÑO DE EXPERIMENTOS: ANÁLISIS ESTADISTICO.	122
ANEXO C. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.	127
ANEXO D. SISTEMAS DE REACTORES.	132

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades del etanol.	16
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de algunos oxigenados de alto octanaje.	17
Tabla 3. Comparación de propiedades de algunos combustibles.	19
Tabla 4. Relación entre las características de la biomasa y la digestibilidad enzimática.	26
Tabla 5. Composición de algunos materiales lignocelulósicos.	27
Tabla 6. Diversos métodos de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol.	36

Tabla 7. Constantes de absorptividad para medir lignina soluble en ácido para distintos tipos de biomasa	51
Tabla 8. Valores propuestos de los niveles de las variables independientes para el diseño de experimentos	56
Tabla 9. Dominio experimental para el estudio del efecto de la temperatura, concentración de ácido y tiempo de reacción sobre el pretratamiento ácido.....	57
Tabla 10. Condiciones de operación para el pretratamiento con ácido diluido	60
Tabla 11. Condiciones de operación para el pretratamiento con NaOH	62
Tabla 12. Condiciones de operación para el pretratamiento con Cal	63
Tabla 13. Condiciones de operación para el pretratamiento con H ₂ O ₂	65
Tabla 14. Condiciones de operación de HPLC	68
Tabla 15. Determinación de humedad de la madera ixtlan malla 40.....	69
Tabla 16. Determinación del contenido de cenizas del material lignocelulósico.....	69
Tabla 17. Determinación del % LIA.....	70
Tabla 18. Resultados del % LSA de la madera Ixtlán a longitudes de onda de 240 y 320 nm.....	71
Tabla 19. Caracterización del material lignocelulósico.....	72
Tabla 20. Resultados del diseño de experimentos.....	74
Tabla 21. Coeficientes del modelo experimental para las variables de respuesta.....	75
Tabla 22. Parámetros estadísticos del ajuste de los modelos: % A. Totales, % A. Reductores y % LSA.....	76
Tabla 23. Resultados de los pretratamientos aplicados al material lignocelulósico: % A. Totales, % A. Reductores y % LSA.....	91
Tabla 24. Azúcares totales y reductores después de 1 hora de hidrólisis enzimática a 50°C y 180 rpm, con cocteles enzimáticos E6 y E7.....	96
Tabla 25. Grado de polimerización (DP) después de la aplicación de la hidrólisis enzimática.....	99

Tabla 26. Determinación de azúcares mediante HPLC después de la hidrólisis enzimática.....	102
Tabla 27. Balance global de Lignina Soluble.....	103
Tabla 28. Balance global de Azúcares Totales por la ruta del coctel E6 y E7.....	105
Tabla 29. Balance global de Azúcares Reductores por la ruta del coctel E6 y E7.....	107

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Galería de moléculas de combustibles actuales, o propuestas, usadas en ignición por chispa, diésel o vehículos de construcción.....	5
Figura 2. Principales productores de etanol en el mundo y sus respectivos porcentajes de una producción mundial de 22,268.9 millones de galones.....	8
Figura 3. Número de plantas, capacidad y producción de etanol en los Estados Unidos, desde 1999 hasta el 2011.....	9
Figura 4. Consumo anual de etanol y MTBE como oxigenantes en Estados Unidos.....	10
Figura 5. Producción global de etanol por país/región, del 2007 al 2011.....	14
Figura 6. Proyección de la producción mundial de etanol hasta el 2020 (en mil millones de litros).....	15
Figura 7. Estructura de la lignocelulosa.....	21
Figura 8. Diseño esquemático de las microfibrillas de la celulosa.....	22
Figura 9. Representación esquemática de la celulosa amorfa y cristalina.....	23
Figura 10. Estructura y puentes de hidrógeno en la celulosa.....	24
Figura 11. Estructura general de la lignina.....	25
Figura 12. Etapas de la producción de etanol a partir de material lignocelulósico.....	29
Figura 13. Esquema del efecto del pretratamiento en el material lignocelulósico.....	30
Figura 14. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina en el sistema de celulasas (A) complejo y (B) no complejo.....	40

Figura 15. Representación del modo de acción de las celulasas.....	41
Figura 16. Composición del material lignocelulósico y sus productos potenciales de la hidrólisis.....	42
Figura 17. Residuo lignocelulósico utilizado. Madera Ixtlán costera, tamaño de malla 40.....	48
Figura 18. Reacción de hidrólisis y condensación de carbohidratos (A. Totales).....	52
Figura 19. Reacción de hidrólisis y condensación de carbohidratos (A. Reductores).....	53
Figura 20. Diseño circunscrito de compositos centrales con tres parámetros de entrada.....	54
Figura 21. Representación del dominio experimental como combinación de los dominios particulares de cada factor.....	55
Figura 22. Reactor Parr de alta presión y el sistema de enfriamiento utilizado en la aplicación de pretratamientos.....	59
Figura 23. Monitoreo y control del reactor.....	59
Figura 24. Representación de los segmentos para la programación del reactor.....	61
Figura 25.A. Superficie de respuesta de azúcares totales al valor central del tiempo, variando temperatura y [H ₂ SO ₄]. Valor central de tiempo: 60 min.....	78
Figura 25.B. Superficie de respuesta de azúcares totales al valor central de [H ₂ SO ₄]. Variando tiempo y temperatura. Valor central de [H ₂ SO ₄]: 2% (p/p).....	79
Figura 25.C. Superficie de respuesta de azúcares totales al valor central de temperatura. Variando tiempo y [H ₂ SO ₄]. Valor central de temperatura: 120°C.....	80
Figura 26.A. Superficie de respuesta de azúcares reductores al valor central de [H ₂ SO ₄]. Variando tiempo y temperatura. Valor central de [H ₂ SO ₄]: 2% (p/p).....	82
Figura 26.B. Superficie de respuesta de azúcares reductores al valor central de tiempo. Variando [H ₂ SO ₄] y temperatura. Valor central de tiempo: 60 min.....	83
Figura 26.C. Superficie de respuesta de azúcares reductores al valor central de temperatura. Variando tiempo y [H ₂ SO ₄]. Valor central de temperatura: 120°C.....	84

Figura 27.A. Superficie de respuesta de LSA al valor central de [H ₂ SO ₄]. Variando tiempo y temperatura. Valor central de [H ₂ SO ₄]: 2% (p/p).....	86
Figura 27.B. Superficie de respuesta de LSA al valor central de tiempo. Variando [H ₂ SO ₄] y temperatura. Valor central de tiempo: 60 min.....	87
Figura 27.C. Superficie de respuesta de LSA al valor central de temperatura. Variando [H ₂ SO ₄] y tiempo. Valor central de temperatura: 120 °C.....	88
Figura 27.D. Superficie de respuesta de LSA al valor superior de temperatura. Variando [H ₂ SO ₄] y tiempo.....	89
Figura 28. Porcentaje de azúcares totales y reductores en la etapa de pretratamiento al material lignocelulósico con respecto a la biomasa sin humedad.....	92
Figura 29. Lignina soluble en la etapa de pretratamiento del material lignocelulósico.....	94
Figura 30. Azúcares totales obtenidos después de la hidrólisis enzimática con (A) coctel E6 y (B) coctel E7.....	97
Figura 31. Azúcares reductores obtenidos después de la hidrólisis enzimática con (A) coctel E6 y (B) coctel E7.....	98
Figura 32. % LSA global del proceso	104
Figura 33. % A. Totales globales del proceso utilizando (A) coctel E6 y (B) coctel E7.....	106
Figura 34. % A. Reductores globales del proceso utilizando (A) coctel E6 y (B) coctel E7	108

RESUMEN.

En el presente trabajo se aplicaron cuatro pretratamientos a muestras de madera Ixtlan con tamaño de malla 40 como material lignocelulósico para la posterior aplicación de hidrólisis enzimática con el propósito de aumentar la generación de azúcares fermentables a etanol.

La madera fue pretratada aplicando cuatro pretratamientos: un pretratamiento ácido con H_2SO_4 diluido y tres pretratamientos alcalinos (con NaOH, CaO y $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$) aplicando un post pretratamiento ácido. Primero, se realizó un diseño de experimentos para determinar las condiciones de operación de temperatura, tiempo de reacción y concentración de H_2SO_4 del pretratamiento ácido para aumentar la generación de azúcares. Posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de las muestras pretratadas y sin pretratar empleando por separado dos cocteles enzimáticos de diferente naturaleza denominados E6 y E7 para su comparación.

Los valores obtenidos a partir del diseño de experimentos fueron 121°C , 27 minutos de reacción y una concentración de H_2SO_4 de 1% (p/p), obteniendo valores por el modelo de 12.5% de azúcares totales, 10% de azúcares reductores y 0.60% de lignina soluble, mientras que las condiciones de operación de los pretratamientos alcalinos se establecieron a modo de experimentación como sigue: básico con NaOH a 121°C , 1 hora de reacción y 1% (p/p), básico con CaO a 121°C , 1 hora y 1% (p/v), y básico con H_2O_2 a 35°C , 26 horas y 9% (v/v).

El pretratamiento con el que se obtuvo mayor grado de deslignificación del material forestal fue el pretratamiento alcalino con NaOH obteniendo 20.95% de lignina, mientras que con el pretratamiento ácido se logró obtener la mayor cantidad de azúcares totales y reductores, $12.183 \pm 0.607\%$ y $10.162 \pm 0.171\%$ respectivamente.

La biomasa pretratada de cada pretratamiento fue sometida a hidrólisis enzimática, obteniendo mejores resultados aplicando el coctel E7 comparado con

el E6. Obteniéndose mayor conversión con la biomasa pretratada con NaOH comparada con el resto, de $13.355 \pm 0.809\%$ para azúcares totales, sin embargo, se obtiene una baja generación de monosacáridos de $2.832 \pm 1.110\%$.

La mejor ruta de los pretratamientos estudiados fue aplicando el pretratamiento ácido, generando globalmente 19.776% de azúcares totales y 10.608% de azúcares reductores. Sin embargo, la mayor cantidad de los azúcares reductores producidos en esta ruta es en la etapa del pretratamiento que está asociada a azúcares provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa. Mientras que las rutas aplicando los pretratamientos con NaOH y H_2O_2 , proporcionan valores similares, 20.852% y 14.936% para azúcares totales, y azúcares reductores de 7.259% y 8.799% respectivamente. Sin embargo, la mayor cantidad de azúcares reductores por estas dos rutas se obtiene en la etapa de hidrólisis enzimática que está asociada con la hidrólisis de la celulosa. De esta manera, si se prefiere una fermentación de azúcares de hemicelulosa se elegiría la ruta con ácido diluido, o en caso contrario, rica en azúcares provenientes de celulosa, se elegiría la ruta con NaOH o H_2O_2 .

INTRODUCCIÓN.

Durante generaciones las sociedades han utilizado materiales biológicos como fuente energía. Sin embargo, la generación de energía a partir de combustibles fósiles ha sido el proceso de obtención más dominante en los últimos siglos. A final del siglo XIX se inició la transición para uso de combustibles fósiles para la generación de calor y energía motriz. No obstante, el uso de combustibles fósiles está siendo cuestionado, fundamentalmente por la producción de dióxido de carbono (CO₂) que se emite a la atmósfera, el cual contribuye a la acumulación de gases de efecto invernadero (GEI), que es uno de los impulsores del cambio climático.

Actualmente, la biomasa responde solamente a un 10% de la matriz energética mundial. Sin embargo, con la perspectiva de un aumento de la demanda de combustible varios países están promoviendo acciones para que las energías renovables vuelvan a tener una mayor participación en sus matrices energéticas.

Las energías renovables han surgido como una alternativa a los combustibles fósiles y se están promoviendo por tratarse de una fuente de energía menos contaminante. La motivación para ese cambio de postura no solamente es la necesidad de reducir el uso de derivados de petróleo (y, consecuentemente, la dependencia de los países exportadores de ese insumo), sino también de reducir las emisiones de los gases de efecto invernadero. Dado que el sector del transporte es el que más contribuye a la contaminación ambiental, es prioritaria la investigación de alternativas para esta área.

Como producto de esta investigación, nuevas alternativas energéticas han surgido tal como lo son los llamados biocombustibles dentro de los cuales destaca el bioetanol. De acuerdo a la materia prima utilizada y a las tecnologías aplicadas, el bioetanol se divide en generaciones: bioetanol de primera, segunda, tercera y cuarta generación.

El bioetanol de primera generación es generado a partir de materiales con alto contenido de almidón y sacarosa, como lo son el maíz y la caña de azúcar, lo cual ha presentado una gran controversia en cuanto al desvío de productos

alimenticios hacia el sector energético. Mientras que el bioetanol de segunda generación se caracteriza por utilizar materiales lignocelulósicos caracterizados por su alto contenido de celulosa. A diferencia de los de primera generación, este tipo de generación emplea: residuos forestales, productos de desecho agroindustrial, pastos, bagazo de caña, etc. Por otro lado, los de tercera y cuarta generación aún se encuentran en una etapa inicial de investigación.

La disponibilidad de la biomasa lignocelulósica, despertó el interés para su uso como materia prima para la producción de alcohol desde el final del siglo XIX, pero solamente en los últimos veinte años la biomasa comenzó a ser considerada como una potencial fuente de energía y esa tecnología ha sido propuesta objetivando atender al mercado de combustibles en un futuro más o menos inmediato.

En la actualidad, la biomasa lignocelulósica y en especial los residuos forestales han dejado de ser productos de desecho-problema, para convertirse en materia prima potencial para diversos procesos tanto de tipo agrícola como industrial, siendo la producción de alcohol carburante uno de los más importantes (Sánchez *et al.*, 2010).

La biomasa lignocelulósica (o lignocelulosa) se caracteriza principalmente por estar compuesta de tres tipos diferentes de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, envueltos en una compleja estructura. La lignocelulosa es el componente más abundante de la biomasa producida por la fotosíntesis, ya que anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas *et al.*, 2006).

Para la producción de bioetanol lignocelulósico, la hemicelulosa y celulosa deben ser hidrolizadas a azúcares simples, para ser fermentados a etanol mediante microorganismos. Sin embargo, la estructura y organización entre los polímeros de la pared celular de la biomasa, desarrollada para proveer fortaleza y resistencia de ataques biológicos, físicos y químicos, dificultan el acceso de las enzimas para este fin. Por lo que es necesaria una etapa de pretratamiento para modificar y hacer susceptible la estructura de la biomasa antes de llevar a cabo la etapa de hidrólisis.

Una de las ventajas que presenta la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica es la inexistencia de desviaciones de alimentos provenientes de la

agricultura hacia el sector energético. Por lo que es de gran importancia evaluar e investigar nuevas tecnologías para su aprovechamiento y desarrollar procesos más eficientes para su conversión a etanol.

El presente trabajo está enfocado al estudio de la etapa de pretratamiento junto con la etapa de hidrólisis enzimática aplicado a un residuo forestal como material lignocelulósico. Así, se utilizó madera Ixtlán proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), a la cual se aplicaron cuatro pretratamientos con el propósito de hacer al material más susceptible al ataque enzimático en la etapa de hidrólisis enzimática (o sacarificación enzimática) para la optimización de azúcares fermentables a etanol. Los pretratamientos estudiados fueron: pretratamiento con ácido diluido (con H_2SO_4), básico con hidróxido de sodio (NaOH), básico oxidante (con H_2O_2), y con cal (CaO). Posteriormente se realizó la hidrólisis enzimática con dos cócteles enzimáticos denominados E6 y E7 para observar el efecto de los pretratamientos en la obtención de azúcares fermentables.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. BIOCOMBUSTIBLES.

En las últimas décadas, el uso de combustibles fósiles ha provocado grandes problemas ambientales, y a su vez han comenzado a mostrar signos de escasez progresiva, ya que la demanda del petróleo está incrementando y los hallazgos de nuevos depósitos están disminuyendo. Lo cual ha permitido el surgimiento de nuevas investigaciones para la obtención de combustibles de diferente naturaleza a la convencional a partir del petróleo.

Los biocombustibles han surgido como resultado de estas investigaciones. Los biocombustibles son renovables, se propone de bajo impacto ambiental (ciclo cerrado del carbono) y son especialmente viables en países que disponen de tierras para su cultivo, que poseen mano de obra rural y en aquellos en los que históricamente la biomasa tiene representación en su matriz energética (Duarte, 2010). Estos biocombustibles pueden ser líquidos, sólidos o gaseosos, y su finalidad es liberar la energía contenida en sus componentes químicos mediante una reacción de combustión. Sin embargo, existen ciertas características que debería tener un combustible deseado: i) ser líquido, ii) altamente combustible pero no explosivo, iii) tenga una alta relación energía/masa, iv) almacenamiento estable por largos plazos, v) transportable por tuberías y vi) económico (Wackett, 2007). Una gama de moléculas que reúnen la mayoría de los criterios antes mencionados se muestran en la figura 1.

De los combustibles mostrados, el hidrógeno, metano y propano se encuentran en estado gaseoso a temperatura ambiente. El hidrógeno sufre particularmente de problemas de almacenamiento lo cual hace difícil su empleo como combustible. El metano es usado principalmente para generación de calor y electricidad, mientras que el propano es usado en vehículos de construcción, pero no para el transporte general. Por otro lado, de los combustibles líquidos (C_2 - C_5) cerca de 20 billones de

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

libras de MTBE¹ han sido usadas anualmente como oxigenante de la gasolina, pero su uso está disminuyendo debido a problemas ambientales que representa su uso, como lo es la contaminación del agua (Suffet, 2007). Actualmente, los combustibles derivados de alcohol, como el etanol y n-butanol, están siendo desarrollados como alternativas de combustibles oxigenados derivados a partir de biomasa, siendo el primero el más usado a nivel mundial (Wackett, 2007).

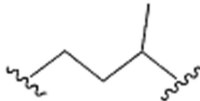
0-1 Carbonos

H_2	CH_4	CH_3OH	CH_3NO_2
Hidrógeno	Metano	Metanol	Nitrometano

2-5 Carbonos

H_3COCH_3	CH_3CH_2OH	$H_3CCH_2CH_3$	$CH_3(CH_2)_2CH_2OH$	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH_3C-OCH_3 \\ \\ CH_3 \end{array}$
Dimetil éter	Etanol	Propano	n-Butanol	Metil tert-butil éter (MTBE)

> 5 Carbonos

$\begin{array}{c} CH_3 \quad CH_3 \\ \quad \\ CH_3CCH_2CCH_3 \\ \\ CH_3 \end{array}$	$CH_3(CH_2)_xCOCH_2R$	
Isooctano	Ésteres de ácidos grasos (Biodiesel)	Isoprenóides

Cíclicos

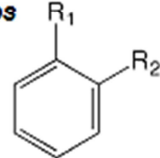
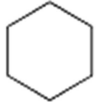
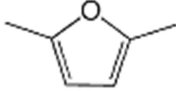
		
Benceno	Cicloalcano	2,5-Dimetilfuran

Figura 1. Galería de moléculas de combustibles actuales, o propuestas, usadas en ignición por chispa, diésel o vehículos de construcción (Wackett, 2007).

¹ MTBE: Metil tert-butil éter.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

De acuerdo al insumo o materia prima y tecnología empleada para producirlos, los biocombustibles se clasifican por generaciones (Maciel, 2009).

Primera generación. Algunos de los insumos son de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites.

Segunda generación. Los insumos son residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. Ejemplos de ellos son el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallo, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles, etcétera.

Tercera generación. Los insumos son vegetales no alimenticios, de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina “cultivos energéticos”. Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verdeazules.

Cuarta generación. Los biocombustibles son producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean anhídrido carbónico (CO₂) o alguna otra fuente de carbono para la obtención de los biocombustibles. A diferencia de las generaciones anteriores, en las que también se pueden emplear bacterias y organismos genéticamente modificados como insumo o para realizar alguna parte de los procesos, en la cuarta generación, la bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de los biocombustibles.

Dentro de esta gama de biocombustibles destaca el bioetanol de segunda generación, que ha sido propuesto como vía para el aprovechamiento de productos agrícolas, y en especial los subproductos que estos generan al someterlos a distintos procesos agroindustriales, cuya disposición final es un gran problema. De estos subproductos o residuos en su mayoría corresponden a biomasa lignocelulósica rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa entre 75-

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

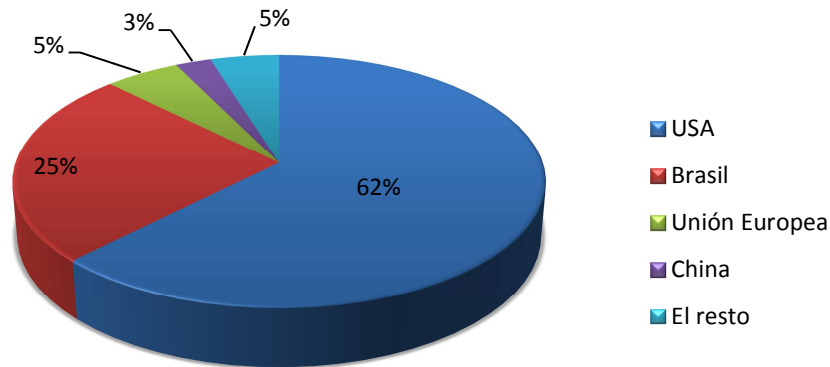
80%. Debido a su difícil degradación es posible mediante procesos químicos, físicos y/o biológicos desdoblarlos a azúcares fermentables para su posterior conversión a etanol (Sánchez *et al.*, 2010).

1.2. BIOETANOL EN MÉXICO Y EN EL MUNDO.

Con el avance del precio del petróleo, la disminución de las reservas, la inestabilidad política en los principales países productores, además de una mayor demanda ambiental, se considera cada vez más las fuentes renovables como alternativa viable para revertir el cuadro actual. De acuerdo a la Agencia Internacional de Energía se calcula que dentro de aproximadamente 20 años cerca de un 30% del total de la energía consumida por la humanidad será proveniente de las fuentes renovables. La producción de etanol obtenido particularmente de la biomasa ha comenzado a crecer en los últimos años como parte de las energías renovables. Dentro de las cuales el bioetanol es el biocombustible más común, representando más del 90% del uso total de biocarburantes (International Energy Agency (IEA), 2007).

El etanol como combustible comenzó a ser producido en el siglo XIX a partir del maíz y hasta 1940 parecía ser un combustible viable para el transporte, pero debido al bajo precio de los combustibles fósiles se frenó su desarrollo. Sin embargo, en la crisis petrolera ocurrida en 1973 cuando el petróleo se encareció enormemente, el bioetanol retomó interés para varios países sobre todo para aquellos países sin reservas petrolíferas o producción suficiente del recurso, dentro de los cuales estaban Brasil y Estados Unidos. Actualmente ambos países desarrollan el papel de principales productores de bioetanol en el mundo, produciendo un poco más del 90% de la producción mundial, Figura 2 (Renewable Fuels Association (RFA)).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES



Fuente: *Renewable Fuels Association (RFA), 2011.*

Figura 2. Principales productores de etanol en el mundo y sus respectivos porcentajes de una producción mundial de 22,268.9 millones de galones (2011).

Estados Unidos.

Con el uso de bioetanol en Estados Unidos se logró reducir la cantidad de CO₂ equivalente a emisiones de efecto invernadero en 21.9 millones de toneladas en el 2010 y 25.3 millones en 2011, equivalente a las emisiones de 4 millones de vehículos de acuerdo a la Asociación de Combustibles Renovables (RFA por sus siglas en inglés). Desde sus inicios las plantas de etanol en E.U.A han crecido a 209 plantas operando en 29 estados con una capacidad anual de 14.91 billones de galones (Figura 3).

En los últimos años, las plantas de producción de etanol han estado evolucionando en sofisticadas biorrefinerías capaces de producir una amplia gama de combustibles, alimento y productos químicos y a medida que la industria avanza hacia la próxima generación de biocombustibles, varias instalaciones de tamaño comercial de etanol celulósico se están construyendo (*2013 Ethanol Industry Outlook, RFA*).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

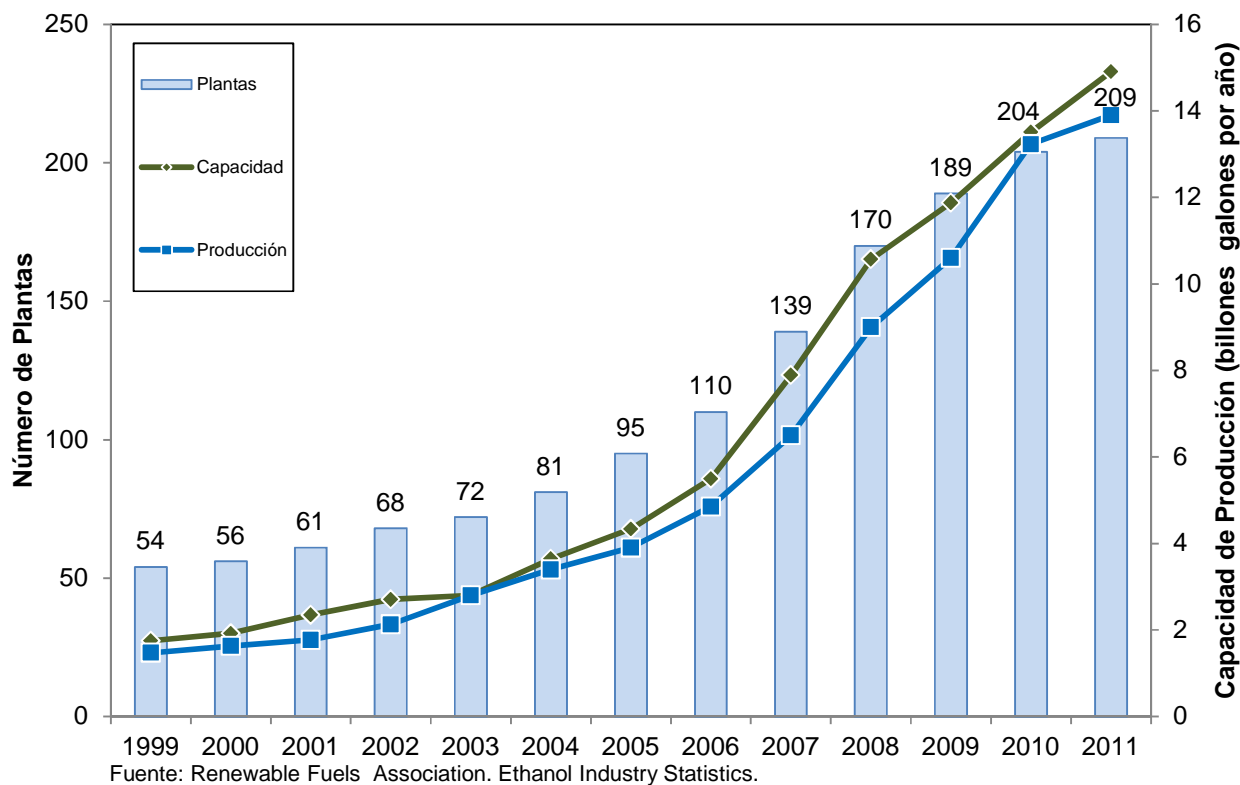
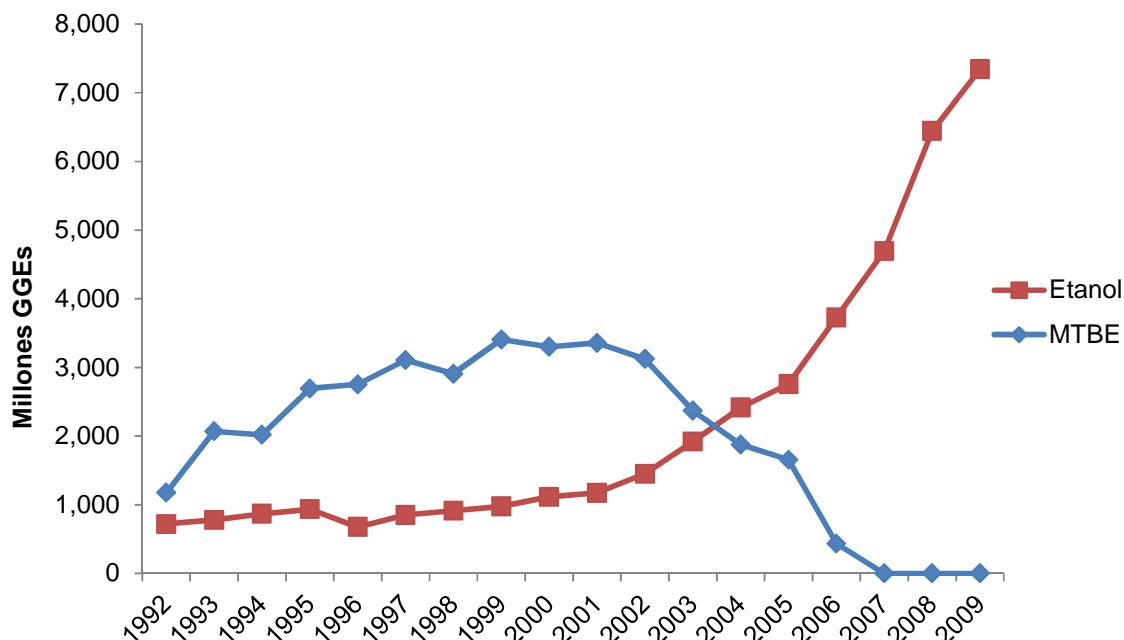


Figura 3. Número de plantas, capacidad y producción de etanol en los Estados Unidos, desde 1999 hasta el 2011.

El etanol como biocombustible es usado en Estados Unidos principalmente como oxigenante, en mezclas con gasolina en varias cantidades, clasificadas en bajo y alto nivel, de acuerdo al porcentaje en volumen de etanol. El uso de etanol como oxigenante en los Estados Unidos ha desplazado en los últimos años el uso de MTBE (Figura 4), ya que es considerado un gran contaminante.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES



Fuente: EIA (Annual Energy Review, 2011)

Nota: Los volúmenes de combustible son expresados en galones de gasolina equivalentes (GGEs), lo que representa un volumen de combustible con el mismo contenido de energía que un galón.

Figura 4. Consumo anual de etanol y MTBE como oxigenantes en Estados Unidos.

Brasil.

Por otro lado en Brasil, después de que el gobierno lanzara el Programa Nacional del Alcohol, conocido en portugués como *Proálcool* cuyos objetivos principales eran:

- 1) Introducir en el mercado brasileño una mezcla combustible de gasolina con alcohol.
- 2) Incentivar el desarrollo de los motores con capacidad de funcionar quemando alcohol hidratado y mezclas de gasolina con alcohol anhidro.

Tras una alianza estratégica en el 2003 entre el gobierno brasileño y compañías extranjeras ensambladoras de automóviles con instalaciones en Brasil,

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

comenzaron a fabricar vehículos con la capacidad de funcionar con cualquier mezcla gasolina-etanol (desde 0% hasta un 100% de etanol), a los cuales se les denominó *Flex-Fuel*. Desde el año 2003 hasta el año 2009 se habían vendido unos 7.75 millones de vehículos, lo que equivale aproximadamente a 45% del parque vehicular automotor de Brasil no mayor a diez años de antigüedad (Maciel, 2009).

Unión Europea.

Actualmente la unión europea es uno de los mercados más grandes de biocombustibles en el mundo ya que se abastece de Brasil y Estados Unidos principalmente, debido a su estancamiento en la producción de bioetanol a consecuencia de la crisis económica de los últimos años y a los altos precios de las materias primas. La directiva 2003/30/CE publicada en el diario oficial de la Unión Europea estableció como objetivos el consumo de biocombustibles en un 2% para 2005 y del 5,75% en 2010 como medida para reducir las emisiones nocivas de gases a la atmósfera y la dependencia de combustibles fósiles. Aunque bien tales objetivos no fueron alcanzados, se logró aumentar el consumo de bioetanol. Sin embargo, la Unión Europea espera alcanzar con *la directiva 20-20-20* un aumento en el consumo de energías renovables, la cual consiste en reducir un 20% el consumo de energía primaria de la Unión Europea; reducir otro 20% las emisiones de gases de efecto invernadero; y elevar la contribución de las energías renovables al 20% del consumo (Unión Europea).

México.

El uso de biocombustibles en México es casi inexistente. El etanol es usado principalmente en bebidas y en menor proporción como disolvente y material de curación. Su producción está basada principalmente en la fermentación de azúcares provenientes de melazas, de ingenios azucareros, de azúcares obtenidos del agave y de granos en general. Sin embargo, el uso de etanol

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

producido por estas materias primas, utilizado para la producción de bebidas alcohólicas, no puede canalizarse hacia la generación de etanol carburante debido a la limitada cantidad que se produce.

Considerando los excedentes de sacarosa a partir de la industria azucarera, únicamente se podría obtener el equivalente al 0.8% del volumen de gasolina (0.8 millones de litros por día). Por lo cual, esta alternativa no solventaría la demanda equivalente de oxigenante para la gasolina, ya que la característica oxigenante del MTBE, puede ser sustituida agregando 3% en volumen de etanol a la gasolina (I. Shifter, 2001)

En 2008, PEMEX inició un nuevo proyecto denominado Programa de Producción Sustentable de Insumos para bioenergéticos y de Desarrollo Científico y Tecnológico. Dicho programa consiste en la introducción de etanol como componente oxigenante a la gasolina, en un 6% del volumen de gasolina de las tres zonas metropolitanas, Guadalajara, Jalisco, en una primera etapa, seguida de Monterrey y el Valle de México, incluido el D.F., en una segunda etapa.

El reto de este proyecto es substituir el actual oxigenante de las gasolinas (MTBE), por etanol, con base en la demanda establecida por SENER-PEMEX de estas zonas metropolitanas.

El Programa de Producción Sustentable de Insumos para bioenergéticos y de Desarrollo Científico y Tecnológico considera satisfacer en una primera etapa la producción de la biomasa para producir alrededor de 176 millones de litros de etanol por año para mezclarlo con la gasolina de la zona metropolitana de Guadalajara y en una segunda etapa alrededor de 630 millones de litros por año para abastecer las zonas de Monterrey, Nuevo León; y la Ciudad de México (SAGARPA, 2009).

México es un país con vastos recursos naturales para la producción de bioenergéticos resultado de su gran biodiversidad agrícola y de sus condiciones

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

climáticas y geográficas idóneas para este propósito. Nuestro país tiene un gran potencial para convertirse en un importante productor de bioenergía en el mundo. Esta gran diversidad de recursos naturales agropecuarios y pesqueros de la que dispone México para la producción y obtención de la biomasa tiene la posibilidad de asegurar el abasto para cubrir lo establecido por la Secretaría de Energía en el Programa de Introducción a los Bioenergéticos.

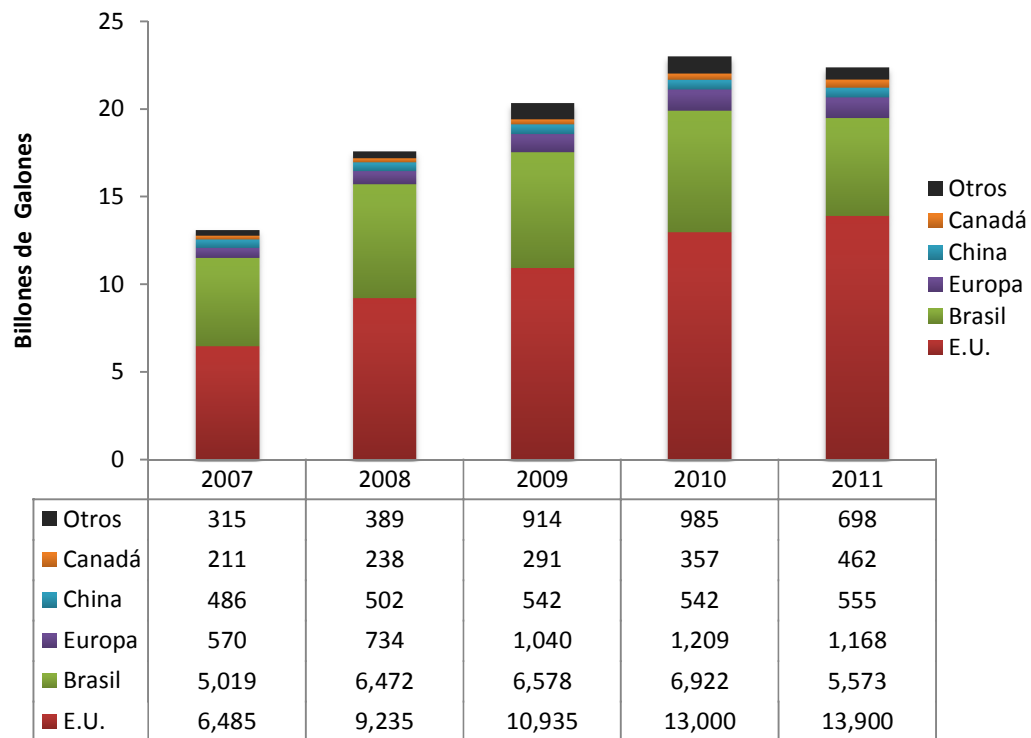
Tendencia mundial de la producción de bioetanol.

En los últimos años la producción mundial de etanol ha aumentado de manera creciente, aunque cabe señalar que en el 2011 se observó un ligero estancamiento comparado al año 2010 de acuerdo a datos recabados por la RFA. Como el principal productor de etanol, Estados Unidos alcanzó una producción de casi 14,000 millones de galones en el 2011 usando principalmente maíz como materia prima, seguido de Brasil con una producción de 5,573 millones de galones empleando caña de azúcar para este fin. Por otro lado, la región de Europa y países como China y Canadá también han crecido como productores de etanol, aunque a niveles más lentos (Figura 5).

En el año 2010, Estados Unidos se convirtió por primera vez en un exportador neto de etanol, mientras que las exportaciones de Brasil se redujeron significativamente debido a los elevados precios de la caña de azúcar.

Impulsada por los mandatos políticos y los objetivos de las energías renovables alrededor del mundo, la producción global de etanol es proyectada para continuar un rápido crecimiento sobre el periodo de proyección estimado y alcanzar unos 155 mil millones de litros en el 2020, Figura 6 (OECD-FAO Agricultural Outlook 2011).

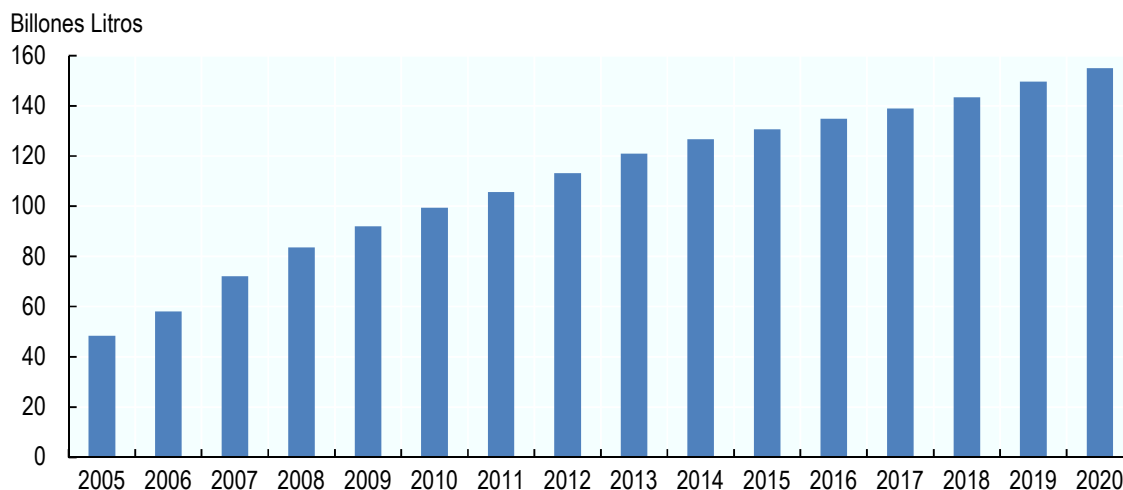
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES



Fuente: F.O. Licht, citado en Renewable Fuels Association, Ethanol Industry Outlook 2008-2012 reports.

Figura 5. Producción global de etanol por país/región, del 2007 al 2011.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES



Fuente: *OECD-FAO Agricultural Outlook 2011*

Figura 6. Proyección de la producción mundial de etanol hasta el 2020 (en mil millones de litros).

1.3. ETANOL COMO BIOCOMBUSTIBLE.

El etanol es un líquido claro e incoloro con fórmula $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$. También conocido como alcohol etílico y con las siglas EtOH, las moléculas en este combustible contienen un grupo hidroxilo (-OH) unido a un átomo de carbono.

El etanol puede ser usado como sustituto o puede ser mezclado como oxigenante de la gasolina. Debido a que cumple con las características necesarias para poder ser utilizado como combustible ya que a presión y a temperatura ambiente es líquido, incoloro, inflamable, etc., de tal manera que es fácil transportarlo y almacenarlo.

Algunas de las propiedades más importantes del etanol se enlistan en la tabla 1.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Tabla 1. Propiedades del etanol.

Densidad y fase	0.789 g/cm ³ , líquido
Solubilidad en agua	Totalmente miscible
Punto de fusión	-114.3 °C (158.8 K)
Punto de ebullición	78.4 °C (351.6 K)
Acidez (pKa)	15.9
Viscosidad a 20 °C	1.2 cp
Momento dipolar (gas)	1.69 D

Otra de las propiedades del etanol como combustible que cabe destacar, es que tiene un número de octano (*Research Octane Number, RON*) más alto que la gasolina, el cual es una característica distintiva de calidad. Se define como la capacidad antidetonante de las gasolinas para evitar las detonaciones y explosiones en los motores de combustión interna. De tal manera que se libere o se produzca la máxima cantidad de energía útil reflejada por una combustión más completa (PEMEX Refinación). Debido a sus propiedades, el etanol funciona bien en motores de combustión interna. De hecho, Henry Ford y otros fabricantes iniciales de automóviles pensaban que el etanol sería el combustible primario del mundo antes de que la gasolina se hiciera fácilmente disponible.

De acuerdo al contenido energético, un galón de etanol puro (E100) contiene 34% menos energía que un galón de gasolina. Por lo que se ha hecho más común usar mezclas con gasolina en distintas cantidades para su uso en vehículos (mezclas de alto y bajo nivel). Las mezclas de bajo nivel, hasta E10 (10% de etanol, 90% gasolina), se clasifican como “sustancialmente similares” a la gasolina de acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés), lo que significa que pueden ser usadas en cualquier vehículo con motor para gasolina. Por otro lado, las mezclas de alto nivel de etanol, como la mezcla E85 (85% de etanol y 15% de gasolina) puede ser usada en *Flexible Fuel Vehicles*, los cuales están diseñados para tolerar los altos contenidos de etanol. Esta mezcla no puede ser usada por vehículos con motor para gasolina.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Recientemente un número creciente de vehículos se están fabricando con motores que puedan funcionar con cualquier relación gasolina/bioetanol desde 0% hasta 85% de etanol. Los sensores de estos *flexible fuel vehicles (FFV)* pueden detectar automáticamente el tipo de combustible y adaptar el funcionamiento del motor. Esto es ajustando la relación aire/combustible y la regulación de encendido para compensar los diferentes niveles de octano del combustible en los cilindros del motor. La principal razón delimitar el contenido de etanol a 85% es para mejorar las condiciones de volatilidad para el arranque en frío, particularmente en climas fríos (Rutz & Janssen, 2008).

El etanol es también usado cada vez más como un aditivo oxigenante para la gasolina estándar, ya que presenta propiedades adecuadas para sustituir a oxigenantes contaminantes como el MTBE, el cual es un componente tóxico responsable de la contaminación del agua subterránea y del suelo. Las propiedades fisicoquímicas de algunos oxigenantes de alto octanaje se muestran en la tabla 2, en comparación con el etanol.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de algunos oxigenados de alto octanaje.

Propiedades	Metanol	Etanol	MTBE
Densidad (kg/m ³)	794	792	742
Calor de combustión (kJ/g)	19.9	26.75	35.12
Calor de Evaporación (kJ/g)	1.1	839	326
Punto de flash (°C)	6.5	12	28
RON	107	108	116
Presión de vapor (kPa)	32	16	54

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Otra característica del etanol es su baja presión de vapor. Cuando es almacenado como combustible puro (o incluso como mezcla E85), tiene una presión de vapor más baja que la gasolina, por lo cual tiene menos emisiones por evaporación. En climas más fríos, la baja presión de vapor del etanol puro puede causar problemas de arranque en frío. Por lo que en climas fríos el etanol es mezclado con gasolina (E85). En contraste, mezclas con niveles más bajos de etanol en gasolina, tienden a aumentar la presión de vapor de la gasolina base por lo cual se añade etanol. Esto muestra las diferentes propiedades de las mezclas de etanol y gasolina. Dependiendo de la situación y el combustible deseado, el etanol por lo tanto es mezclado con gasolina en cualquier relación. Las mezclas comunes de etanol son E5, E10, E20, E25, E70, E85, E95 y E100.

En la tabla 3 se muestra la comparación de algunas propiedades del etanol con otros combustibles.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Tabla 3. Comparación de propiedades de algunos combustibles.

Propiedad	Gasolina	Gas natural comprimido	Etanol	Gas natural licuado	Propano (GLP)	Metanol
Estructura química	C4 a C12	CH ₄ (83-99%) C ₂ H ₆ (1-13%)	CH ₃ CH ₂ OH	CH ₄	C ₃ H ₈	CH ₃ OH
Materia prima	Petróleo	Reservas subterráneas	Granos, residuos agroindustriales (celulosa)	Reservas subterráneas	Un subproducto de la refinación de petróleo o de procesamiento de gas natural	Gas natural, carbón, o biomasa leñosa
Equivalencia a un galón de gasolina	100%	5.66 libras o 126.67 ft ³ de GNC tiene 100% de la energía de un galón de gasolina.	1 galón de E85 tiene 73% a 83% de la energía de un galón de gasolina. 1 galón de E10 tiene 96.7% de la energía de un galón de gasolina.	1 galón de GNL tiene 64% de la energía de un galón de gasolina.	1 galón de propano tiene 73% de la energía de un galón de gasolina.	1 galón de metanol tiene 49% de la energía de un galón de gasolina.
Contenido energético	124,340 Btu/gal	22,453 Btu/lb	84,530 Btu/gal para E100	84,820 Btu/gal	91,410 Btu/gal	65,200 Btu/gal
Estado físico	Líquido	Gas comprimido	Líquido	Líquido Criogénico	Líquido presurizado	Líquido
PON*	84-93	120+	110	120+	105	112
Punto Flash	-45 °F	-300 °F	55 °F	-306 °F	-100 a -150 °F	52 °F

Fuente: U.S. Department of Energy, Energy Efficiency & Renewable Energy.

*PON: Pump Octane Number. PON is the average of the research octane number and motor octane number.

This number represents the ability of a fuel to resist knocking when ignited in the cylinder of an internal combustion engine

1.4. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.

La producción tradicional de bioetanol utilizada por los principales países productores, se lleva a cabo a partir de sacarosa derivada de la caña de azúcar y de almidón derivado del maíz, los cuales están limitados en el mundo. Debido al uso de estas fuentes de producción de etanol, se ha levantado gran expectación en cuanto al desvío de productos alimenticios hacia el sector energético y el alza en los precios de los alimentos.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

La disponibilidad de la biomasa lignocelulósica, despertó el interés para su uso como materia prima para la producción de alcohol a finales del siglo XIX, pero solamente en los últimos veinte años la biomasa comenzó a ser considerada como una potencial fuente de energía, llevándose a cabo estudios y proyectos para desarrollar nuevas tecnologías para la producción de etanol de segunda generación.

La biomasa celulósica es, así, una fuente de energía derivada de los productos y de los subproductos del bosque y de la industria de la madera, de los residuos de cultivos agrícolas, de los desechos domésticos, de los cultivos energéticos y de los residuos sólidos urbanos. Por tanto, es evidente la importancia de la biomasa lignocelulósica como una posible materia prima en la producción de etanol. Las ventajas de estos substratos son su gran disponibilidad, bajo costo (frecuentemente gratuitos), cuestiones ambientales y, más recientemente, el hecho de no competir con la producción de alimentos, ya que este tipo de generación evita el empleo de cultivos destinados a la alimentación sin poner en riesgo la seguridad alimentaria de los países.

Tan solo la actividad fotosintética de la biosfera produce alrededor de $1,2 \times 10^{11}$ toneladas anuales de biomasa vegetal, de las cuales más del 80% es lignocelulosa siendo el biopolímero más abundante en la naturaleza. De esta biomasa, el 89% no se utiliza y del resto que entra en el procesamiento de fibras, combustibles y alimento, se pierde un 70% (Cunningham & López, 1994).

CARACTERÍSTICAS DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.

El material lignocelulósico (o lignocelulosa) está constituido por los tejidos de los vegetales cuyas células presentan una pared celular constituida por un entramado de microfibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosas y sobre las que se deposita la lignina (Figura 7 y 8).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

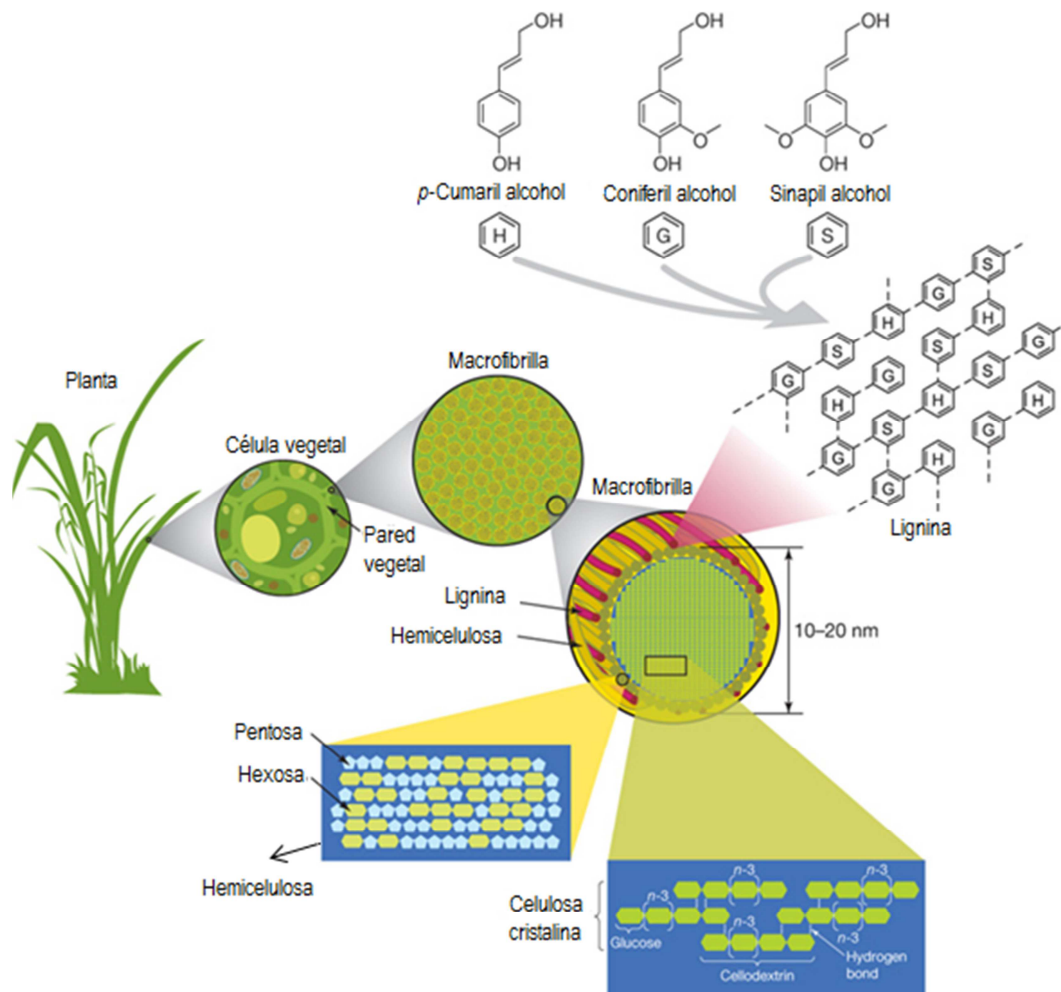
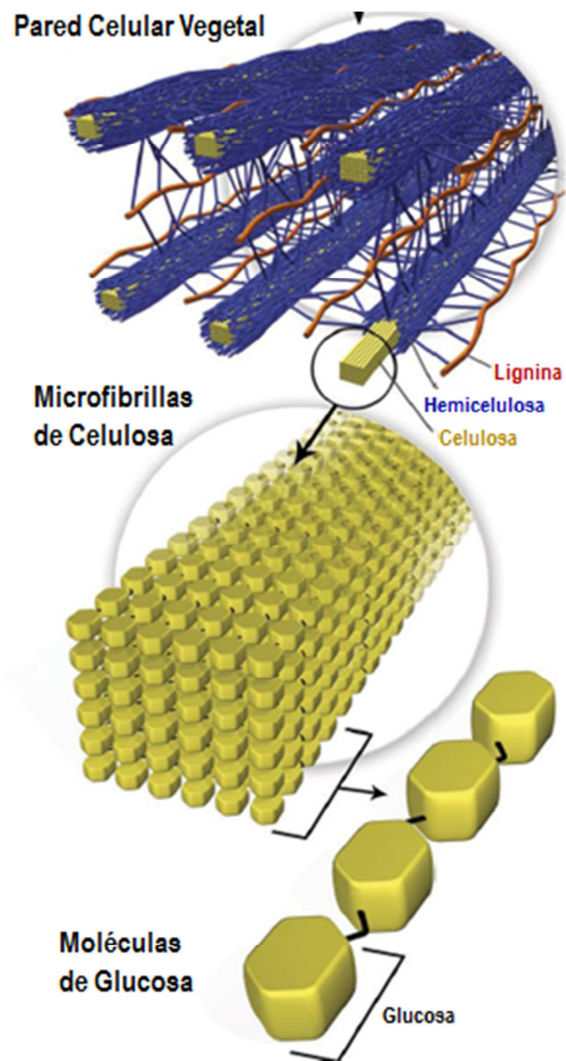


Figura 7. Estructura de la lignocelulosa (Rubin, 2008).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES



Fuente: US DOE, 2009

Figura 8. Diseño esquemático de las microfibrillas de la celulosa.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

La celulosa es un polímero de unidades de D-glucosa unidas entre sí por enlaces β -1,4 glucosídicos construyendo largas cadenas lineales, formando moléculas de celobiosa (microfibrillas). Estas cadenas largas a su vez están unidas entre sí por puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas menos ordenadas susceptibles al ataque químico y bioquímico, Figura 9 (Béguin & Aubert, 1994). Este polímero constituye el 50% o más, del total de átomos de carbono de las plantas, por lo que la biomasa celulósica puede ser una fuente útil de azúcares fermentables a bioetanol. La celulosa tiene una estructura lineal y fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, lo que hace que sea insoluble en agua (Figura 10).

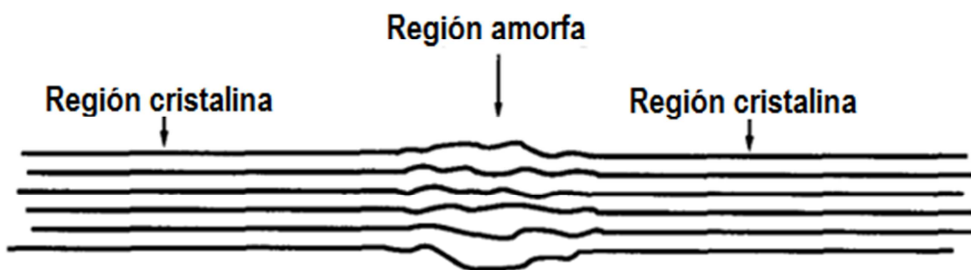


Figura 9. Representación esquemática de la celulosa amorfa y cristalina (Béguin & Aubert, 1994)

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

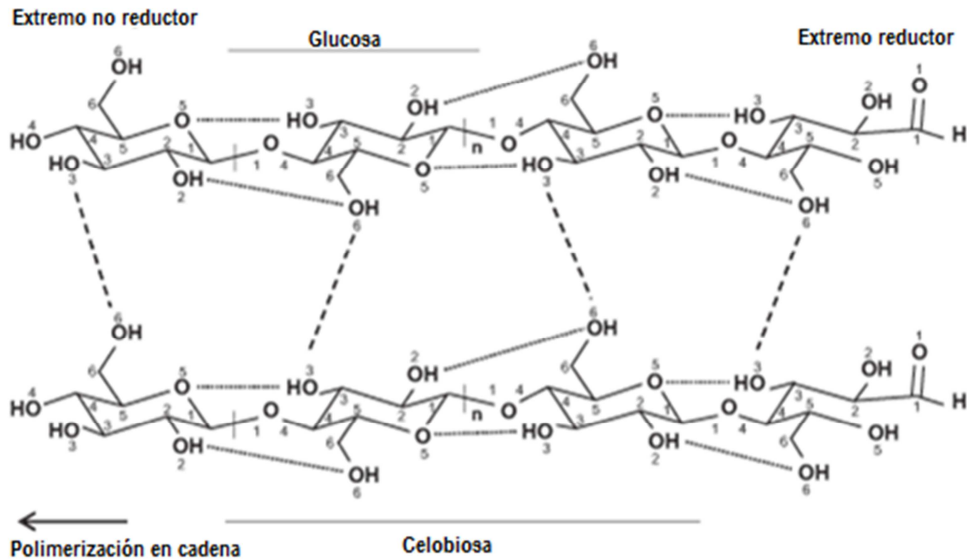


Figura 10. Estructura y puentes de hidrógeno en la celulosa (Guzmán, 2012, citado en Reginaldo, 2007).

La hemicelulosa es un heteropolímero complejo formado principalmente por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y algunos ácidos glucurónicos. Los azúcares de este polímero están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Pérez *et al.*, 2002). Por su parte, la lignina es una macromolécula polifenólica compuesta por tres componentes fenólicos principales el *p*-cumaril alcohol, el coniferil alcohol y el sinapil alcohol. La única diferencia entre los precursores ya mencionados es el número de grupos metoxilo (-OCH₃) presentes en el anillo aromático. La lignina tiene un rol importante en el fortalecimiento de la pared celular mediante el entrecruzamiento de polisacáridos, proporcionando soporte estructural a la totalidad del cuerpo de la planta, proporcionando resistencia del ataque biológico, resistencia mecánica y además de mejorar su regulación hídrica.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

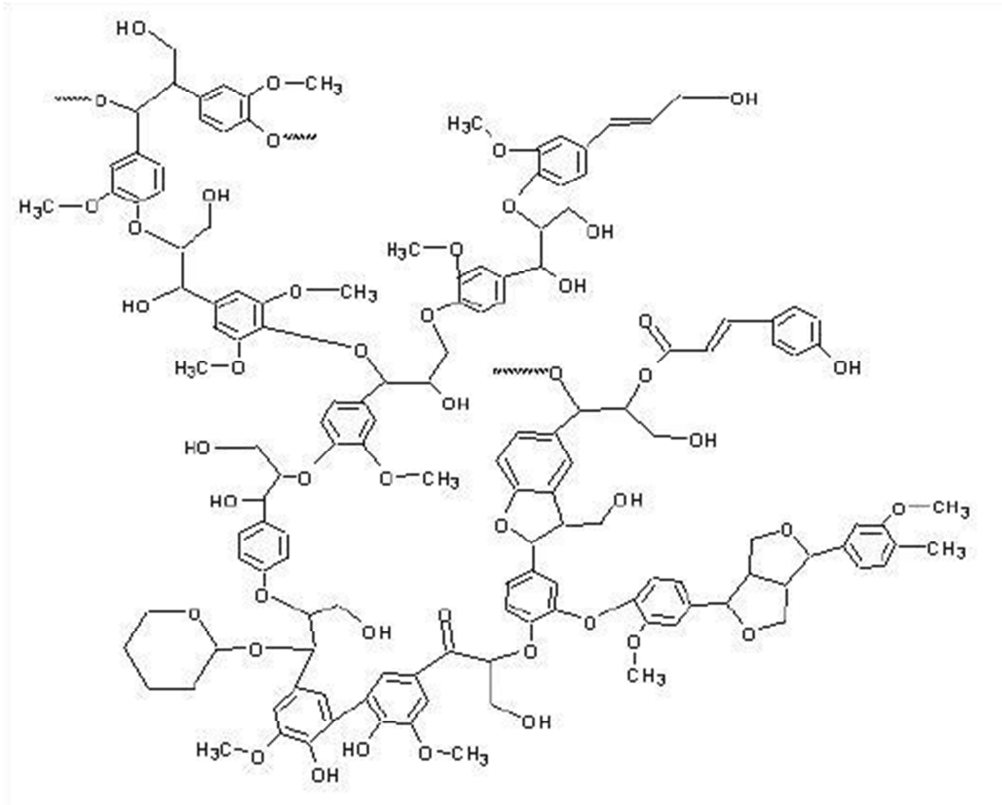


Figura 11. Estructura general de la lignina (Cortínez, 2010)

La relación entre las características estructurales y de composición de la biomasa con la velocidad de hidrólisis enzimática, han sido objeto de amplia investigación. Tales características como la cristalinidad de la celulosa, el área de superficie específica de la celulosa, el grado de polimerización, la protección de la celulosa por lignina y hemicelulosa, son comúnmente considerados como factores de velocidad de impacto. La correlación entre estas características de la biomasa y la digestibilidad enzimática se muestran en la Tabla 4 (Zheng, 2009).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Tabla 4. Relación entre las características de la biomasa y la digestibilidad enzimática (Zheng, 2009)

Característica de la biomasa	Efecto en la digestibilidad
Grado de polimerización	Negativo
Área superficial específica	Positivo
Protección de la celulosa por lignina	Negativo
Revestimiento de hemicelulosa	Negativo

La pared celular de los vegetales está formada por un 70-85% de polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa), y por un 10-30% de lignina (Cunningham & López, 1994), aunque la composición de estos constituyentes varía de una especie a otra y además sus propiedades fisicoquímicas dependen de las condiciones climáticas y del terreno donde se hayan generado. En la tabla 5 se muestra la composición de algunos materiales lignocelulósicos como maderas duras, maderas blandas y residuos agroindustriales. Se presenta la composición de polisacáridos (Glucano, Xilano, Manano, Arabano y Galactano) de cada especie, compuestos de monómeros de glucosa, xilosa, manosa, arabinosa y galactosa respectivamente. Así como la suma de estos azúcares correspondientes a los azúcares totales.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Tabla 5. Composición de algunos materiales lignocelulósicos.

MATERIAL	Glucano	Xilano	Manano	Arabano	Galactano	% Azúcares Totales	Celulosa	*Hemicelulosa	Lignina	Cenizas
Maderas duras:										
Eucalipto (globulus)	43.4	21.5	0.7	1.8	2.5	69.9	42.4	36.6	17.9	1.8
Eucalipto (globulus)	----	----	----	----	----	----	51.3	25.2	21.9	----
Roble (Quercusfalcata)	40.4	21.7	2.4	1.6	2.1	68.2	40.4	35.9	24.1	----
Alamo	54.6	15.2	2.2	0.4	0.8	73.2	50.8	28.7	15.5	0.2
Maderas blandas:										
Pino	44.8	7.2	7.6	0.6	1.3	61.5	42	23.5	27.8	0.4
pino (Radiata)	37	5.1	9.6	1.4	2.6	55.7	----	----	27.5	----
Abeto (silvestris)	44.8	7.2	7.6	0.6	----	60.2	44	26	29	0.4
Abeto (Picea abies)	44.3	7.6	10.3	0.5	----	62.7	43	27	29	0.4
Abeto (Picea glauca)	46.5	6.8	11.6	1.6	1.2	67.7	44.8	----	27.1	0.3
Residuos agroindustriales										
Bagazo de caña	43	23	0	2.7	----	68.7	----	----	24	----
Bagazo de caña	----	----	----	----	----	----	38	34	11	----
Bagazo de caña	----	----	----	----	----	----	----	----	20.8	4.2
Tallo de maíz	37.1	18	0	2.2	0.8	58.1	33.5	32.6	11	1
Paja de trigo	36.2	18.5	0	1.6	0.7	57	34	27.6	18	1.3

Fuente: (Modificado de Cunningham & López, 1994)

*El contenido de hemicelulosa corresponde a la suma de xilano, manano, arabano, galactano y una porción de glucano, además de otras especies.

1.5. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL MEDIANTE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

Debido a la recalcitrancia de la pared celular al proceso fermentativo, son necesarias más etapas en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica que en los procesos convencionales a partir de sacarosa o almidón. Inicialmente, es necesaria la ruptura del complejo lignina-celulosa-hemicelulosa para poder utilizar en la fermentación los diferentes componentes obtenidos a partir de materiales lignocelulósicos y el quiebre de las fracciones de carbohidratos por técnicas de pre-tratamiento (físico y químico) e hidrólisis. En seguida, es necesaria la fermentación de los azúcares liberados a etanol, y como última etapa se realiza una destilación y deshidratación para obtener una concentración de etanol superior al 99% (Figura 12).

De esta manera, el proceso de producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos consta de tres etapas principales: pretratamiento, hidrólisis y fermentación.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

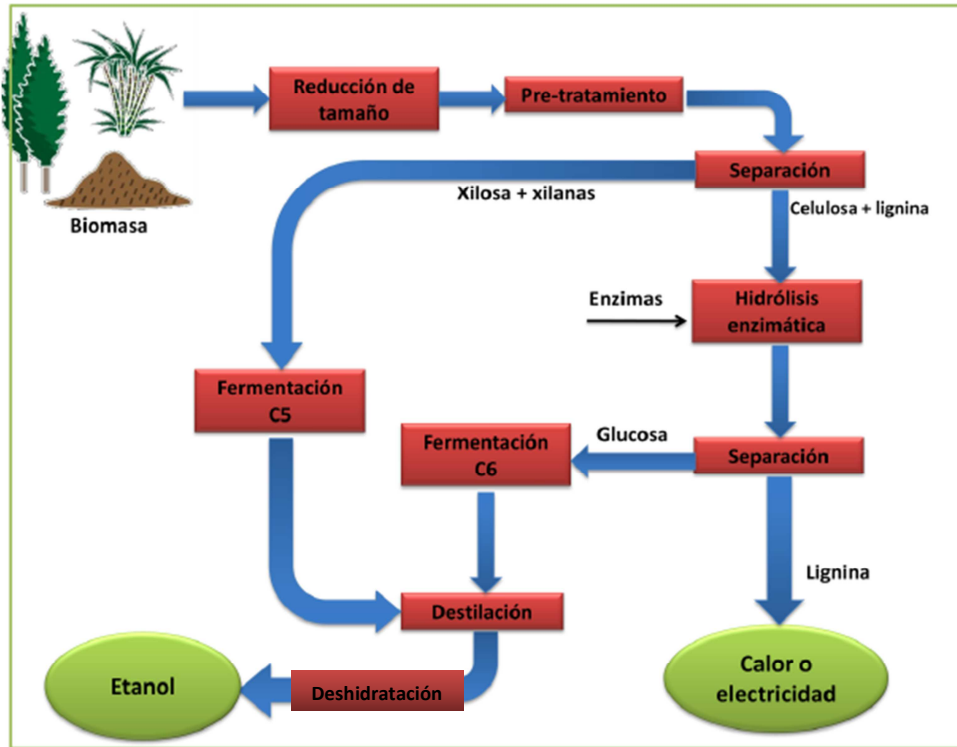


Figura 12. Etapas de la producción de etanol a partir de material lignocelulósico (Modificado de Monteiro, 2010).

1.6. PRETRATAMIENTOS DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

Una de las etapas distintivas y fundamentales para la producción de bioetanol de segunda generación es la etapa de pretratamiento, ya que esta etapa tendrá un impacto directo en las etapas subsecuentes del proceso.

Cualquier biomasa lignocelulósica en su forma nativa es resistente a la sacarificación enzimática, por lo que estos residuos necesitan ser pretratados para facilitar la despolimerización de la celulosa e hidrolizar la hemicelulosa. Por lo cual, esta etapa es requerida para alterar la estructura de la biomasa y como consecuencia facilitar el ataque enzimático a la celulosa en la etapa de hidrólisis enzimática para la obtención de azúcares fermentables (Figura 13).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

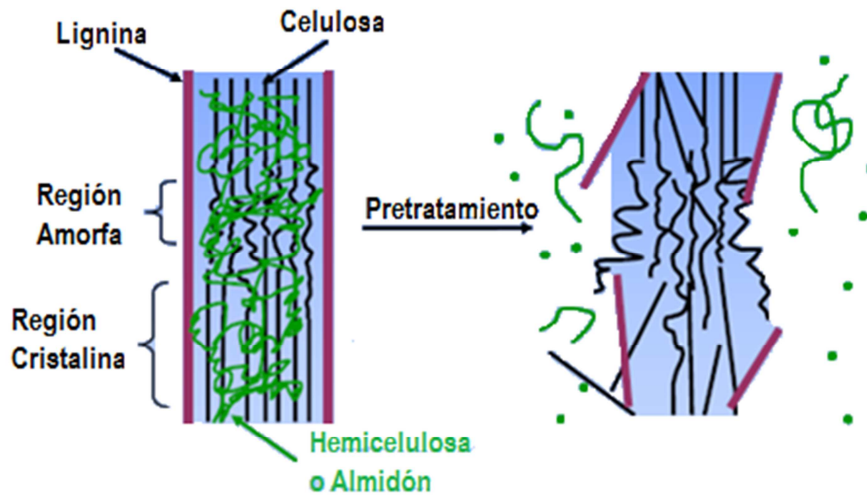


Figura 13. Efecto del pretratamiento sobre el material lignocelulósico (Mosier *et al.*, 2004)

El objetivo fundamental del pretratamiento es remover la protección formada por lignina y hemicelulosa, alterar la estructura cristalina y reducir el grado de polimerización de la celulosa (Zheng, 2009). La etapa de pretratamiento es considerada como la etapa de mayor costo del proceso de la biomasa lignocelulósica para su conversión a azúcares fermentables. Por otro lado, los avances de nuevas tecnologías de pretratamientos tienen un gran potencial para mejorar la eficiencia y disminuir los costos mediante investigación y desarrollo.

De acuerdo a las técnicas desarrolladas del pretratamiento de la lignocelulosa, estas se dividen en tres categorías: métodos químicos, físicos y biológicos, y aunque una combinación de las tres puede ser aplicada, no se considera como una categoría aparte.

A pesar de que muchos de estos pretratamientos ya han sido desarrollados y aplicados, no hay alguno universal conocido.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Algunos de los pretratamientos más frecuentes incluyen la hidrólisis ácida, explosión de vapor, tratamiento básico-oxidante, pretratamiento con ozono (Ozonólisis), explosión con amoníaco diluido (AFEX), entre otros.

Dentro de las categorías de pretratamiento, el pretratamiento químico es la técnica más estudiada. Estos pretratamientos químicos que han sido estudiados hasta la fecha han tenido el objetivo principal de mejorar la biodegradabilidad de la celulosa mediante la eliminación de lignina y/o hemicelulosa, y en un grado menor disminuir el grado de polimerización (DP) y la cristalinidad.

Para que un pretratamiento sea efectivo se deben considerar ciertos criterios, como: preservar las fracciones de hemicelulosa, limitar la formación de inhibidores debido a la degradación de productos, recuperación de productos de valor agregado, tratamiento de residuos, etc.

Pretratamientos físicos.

- Trituración mecánica. La biomasa es triturada por diversos astillados, trituración y molienda. La molienda puede ser más detallada en martillo y bolas de molienda (húmedo, molino de bolas, molino de cuchillos o martillos). La reducción de tamaño de partículas lleva a un aumento de superficie específica, modifica la cristalinidad de la celulosa y a su vez reduce el grado de polimerización (DP), mediante el rompimiento de la biomasa en partículas pequeñas, haciendo al substrato más susceptible a la hidrólisis enzimática subsecuente. El incremento del área superficial específica es un factor que incrementa los rendimientos de la hidrólisis entre el 5–25% (dependiendo de la clase de biomasa y duración de la molienda) y también se disminuye el tiempo de digestión entre el 23–59% incrementando la velocidad de hidrólisis (Lynd LR, 1991).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Pretratamientos físico-químicos.

- Explosión con vapor. La materia prima se somete a temperaturas entre 160-260 °C, mediante la inyección directa de vapor saturado, por un intervalo de tiempo entre 1 y 10 minutos. Seguidamente se lleva el producto a una rápida descompresión hasta presión atmosférica. Como resultado se obtiene biomasa con alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras), y químicas (despolimerización y ruptura de enlaces) y una celulosa más accesible a la hidrólisis enzimática. Las variables a controlar en este tipo de procedimiento son la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula, y la humedad (Sánchez *et al.*, 2010)
- Proceso de explosión de fibra con amoníaco (AFEX). AFEX es otro tipo de pretratamiento similar al de explosión con vapor. En este pretratamiento la biomasa es expuesta a amoníaco líquido por un largo periodo de tiempo y alta presión, y posteriormente la presión es reducida súbitamente. Esta repentina reducción de presión abre la estructura de la biomasa lignocelulósica provocando un incremento de la digestibilidad de la biomasa. AFEX simultáneamente deslignifica y solubiliza algo de hemicelulosa mientras que reduce la cristalinidad de la celulosa, pero no remueve significativamente la hemicelulosa como otros pretratamientos.

Pretratamientos químicos.

- Hidrólisis ácida. Es un proceso químico que emplea catalizadores ácidos para transformar las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. Este tipo de hidrólisis utiliza diferentes clases de ácidos: sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico. Siendo solamente usados a nivel industrial los ácidos clorhídrico y sulfúrico. La principal reacción que ocurre durante el pretratamiento ácido es la hidrólisis de hemicelulosa, especialmente xilano

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

como glucomanano. La hemicelulosa puede ser sometida a reacciones hidrolíticas produciendo monómeros, como furfural, HMF² y otros productos. Durante el pretratamiento ácido la lignina es rápidamente condensada y precipitada en ambientes ácidos (Sánchez *et al.*, 2010)

- Pretratamiento alcalino. El pretratamiento alcalino es una de las tecnologías que cuenta con mayores estudios. Este pretratamiento emplea varias bases, incluyendo hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, entre otros. Este pretratamiento es básicamente un proceso de deslignificación, en el cual una significativa cantidad de hemicelulosa es solubilizada también. Se cree que el mecanismo de acción es una saponificación de los enlaces éster intermoleculares por la reticulación de xilanos de hemicelulosas y otros componentes. El pretratamiento alcalino causa hinchazón, disminuye el grado de polimerización (DP) y la cristalinidad, incrementa el área superficial interna, modifica la estructura de la lignina, y la separación de enlaces estructurales entre la lignina y carbohidratos. La efectividad de los pretratamientos alcalinos varía, dependiendo de las condiciones del sustrato y del tratamiento. En general, el pretratamiento alcalino es más efectivo en madera dura, cultivos herbáceos y residuos de la agricultura con bajo contenido de lignina que en madera blanda con alto contenido de lignina (Bjerre *et al.*, 1996)
- Pretratamientos orgánicos (Organosolv). En el proceso, un compuesto orgánico o acuoso se mezcla con un ácido inorgánico (HCl o H₂SO₄), este se utiliza para romper el interior de la lignina y puentes de hemicelulosa. Se emplean disolventes orgánicos como metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol y alcohol tetrahidrofurfurílico. Ácidos orgánicos como oxálico, acetilsalicílico y salicílico también pueden ser utilizados como catalizadores

² Hidroximetil Furfural

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

en el proceso. A temperaturas altas (por encima de 185 °C), el uso de catalizadores es innecesario para la deslignificación (Sánchez & Cardona, 2005).

- Deslignificación básica/oxidante: El pretratamiento alcalino/oxidativo ha sido reconocido como un poderoso agente oxidante y la digestibilidad enzimática de la biomasa pretratada se ve efectivamente enriquecida. Se suelen utilizar mezclas de peróxido de hidrógeno con hidróxido de sodio. El tratamiento disminuye la cristalinidad de la celulosa y el contenido de lignina. El rol del peróxido de hidrógeno en la deslignificación es proveer de radicales HO⁻ y radicales superóxido (O₂⁻), ya que estas especies de oxígeno activo pueden deslignificar la lignocelulosa por degradación y oxidación (Guzmán, 2012).
- Pretratamiento con líquidos iónicos (ILs). La técnica de líquidos iónicos ha recibido recientemente una atención amplia en su investigación sobre la dilución de la celulosa. Los líquidos iónicos prometen ser un disolvente novedoso eficiente y “verde” de la celulosa. Estos disolventes pueden disolver grandes cantidades de celulosa a condiciones considerablemente suaves y viables para recuperar cerca del 100% de los ILs empleados a su pureza inicial, lo que los hace atractivos. Como solventes de la celulosa, los ILs poseen varias ventajas sobre los solventes volátiles orgánicos como su biodegradabilidad, baja toxicidad, amplia selección de combinación de aniones y cationes, baja hidrofobicidad, baja viscosidad, mejorada estabilidad electroquímica, estabilidad térmica, tasas altas de reacción, baja volatilidad con el mínimo impacto potencial del ambiente y propiedades no inflamables. El mecanismo de disolución de la celulosa en los ILs involucra los átomos de oxígeno e hidrógeno de los grupos hidroxilo de la celulosa en la formación de los complejos electrón donante-aceptor de electrones (EDA) que interactúan con los ILs. En la interacción del -OH de la celulosa y los ILs, el enlace de hidrógeno se rompe resultando en la apertura de los puentes de

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

hidrógeno entre las cadenas de la celulosa. La interacción finalmente resulta en la disolución de la celulosa (Zheng, 2009).

Pretratamientos biológicos.

En este tratamiento el material lignocelulósico se somete a la acción de determinadas enzimas o micro-organismos, como los hongos de la podredumbre blanca, marrón o blanda. El objetivo es degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático, por lo que generalmente se hace necesario hacer primero un tratamiento con hongos y posteriormente con las enzimas.

En la tabla 6 se muestra un resumen de los pretratamientos antes mencionados y algunos otros para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Tabla 6. Diversos métodos de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol.

MÉTODOS	PROCESO/AGENTE	OBSERVACIONES
FÍSICOS		
Reducción de tamaño	Trituración, molienda	Molino de bolas (tamaño final 0,2-2 mm); molino de cuchillos o martillos (tamaño final 3-6 mm)
FÍSICO-QUÍMICOS		
Pirólisis	T>300 °C, seguida por enfriamiento y condensación	Formación de productos volátiles y carbón. Los residuos pueden pasar por una hidrólisis ácida en condiciones blandas (H ₂ SO ₄ 1 N, 2,5 h a 95 °C) para producir 80-85% de azúcares reductores (> 50% de glucosa). Puede ser conducida en vacío (400 °C, 1 mmHg, 20 min).
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160 – 290 °C, p = 0,69-4,85 MPa por algunos minutos, seguido por descompresión hasta presión atmosférica	Reducción de tamaño con menor input de energía, si es comparado con la reducción de tamaño; Hidrólisis de 80-100% de la hemicelulosa, degradación de parte de la fracción de xilana (45-65% de recuperación de la xilosa); Hay cierto grado de despolimerización de la celulosa; La lignina no es solubilizada, pero redistribuida; Formación de inhibidores; Adición de H ₂ SO ₄ , SO ₂ o CO ₂ aumenta la eficiencia de hidrólisis enzimática subsecuente.
Agua caliente	Agua caliente presurizada, p >MPa, T = 170-230 °C, 1-46 min; solución con < 20% de sólidos	80-100% de hidrólisis de la hemicelulosa, 88-98% de recuperación de la xilosa, > 50% oligómeros; Hay cierto grado de despolimerización de la celulosa y conversión subsecuente de un 90%; Solubilización parcial de la lignina (20-50%); Baja o ninguna formación de inhibidores

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Explosión con Amoníaco diluido (AFEX)	1-2 kg amoníaco/kg biomasa seca. 90 °C, 30 min, p = 1,12-1,36 MPa	Es la versión alcalina de la explosión a vapor, y es necesaria la recuperación del amoníaco; 0-60% de hidrólisis de la hemicelulosa, dependiendo de la humedad Hay cierto grado de despolimerización de la celulosa y su conversión subsecuente puede llegar a >90%, para biomasa con alto grado de lignina; 10-20% de solubilización de lignina; No hay formación de inhibidores
Explosión de CO ₂	4 kg CO ₂ /kg fibra, p = 5,6 Mpa	No hay formación de inhibidores; Conversión subsecuente de la celulosa puede ser >75%
QUÍMICOS		
Ozonólisis	Ozono a temperatura ambiente y presión	No hay formación de inhibidores Conversión subsecuente de la celulosa puede ser >57% Degradación de la lignina
Hidrólisis con ácido diluido	0,75-5% H ₂ SO ₄ , HCl, o HNO ₃ , p ≈ 1 MPa, Proceso Continuo: bajo cargamento de sólidos (5-10% en peso); T = 160-200 °C; Proceso discontinuo: alto cargamento de sólidos (10-40% en peso); T = 120-160 °C	Es necesaria la corrección de pH, lo que genera yeso como residuo; 80-100% de la hemicelulosa es hidrolizada, con una recuperación de 75-90% de xilosa; Hay cierto grado de despolimerización de la celulosa y su conversión subsecuente es favorecida por el uso de mayores temperaturas; La lignina no es solubilizada, siendo, sin embargo, redistribuida
Hidrólisis con ácido concentrado	10-30% H ₂ SO ₄ , HCl, 170-190 °C, razón sólido-líquido 1:1,6 21-60% ácido paracético	Necesaria la recuperación del ácido; Tiempo de residencia es mayor si es comparado al ácido diluido; El ácido paracético provoca oxidación de la lignina
Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h, 60 °C; Ca(OH) ₂ , 4 h, 120 °C; Puede ser complementada por la adición de H ₂ O ₂ (0,5-2,15 vol.%) a baja temperatura (35 °C)	Costo del reactor es menor si es comparado a la hidrólisis ácida; >50 % de hidrólisis de la hemicelulosa con 60-75% de recuperación de la xilosa; Baja formación de inhibidores; Expansión de la celulosa y conversión subsecuente pudiendo llegar a >65%; 25-55% de remoción de la lignina en maderas duras (menor que eso para maderas blandas)

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Deslignificación oxidativa	Peróxido al 2% (H ₂ O ₂), 20 °C, 8 h	Prácticamente total solubilización de la hemicelulosa; Conversión subsecuente de la celulosa hasta un 95%; Solubilización de 50% de la lignina
Oxidación húmeda	1,2 MPa de presión de oxígeno, 195 °C, 15 min., adición de agua y pequeñas cantidades de Na ₂ CO ₃ o H ₂ SO ₄	Solubilización de la mayor parte de la hemicelulosa; Formación de inhibidores; Degradación de la lignina;
Proceso Organosolv	Solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol) con 1% de H ₂ SO ₄ o HCl, 185 °C, 30-60 minutos, pH = 2-3,4	Recuperación de solvente requerida; Hidrólisis prácticamente completa de la hemicelulosa y alto rendimiento en xilosa; Solubilización prácticamente total de la lignina y ruptura de los enlaces internos de lignina y hemicelulosa
BIOLÓGICOS		
Hongos	Uso de hongos o macrohongos descompositores de la madera por fermentación en el estado sólido	Diversos hongos producen diversas enzimas degradadoras de la pared celular (celulasas, hemicelulasas, ligninasas, peroxidasas, polifenoloxidasas, etc.); Proceso muy lento, demora semanas
Proceso Bio-organosolv	Fermentación de Ceriporiopsis subvermispora por 2-8 semanas seguida de etanólisis a 140-200 °C por 2 h	El hongo descompone la red de lignina y la acción del etanol permite la hidrólisis de la hemicelulosa; El pre-tratamiento biológico lleva a una economía de un 15% de la electricidad necesaria para etanólisis; El etanol puede ser reutilizado; proceso ambientalmente amigable.

Fuente: Monteiro (2010).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.7. SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

La etapa de hidrólisis enzimática o sacarificación enzimática es un proceso catalizado por enzimas denominadas celulasas, cuyo propósito es la degradación de la celulosa en sus productos monoméricos. Los productos de la hidrólisis son en su mayoría pentosas y hexosas, incluida la glucosa, que pueden ser fermentadas a etanol mediante microorganismos. Las condiciones de esta etapa son relativamente livianas (pH de 4,8 y temperatura entre 45-50 °C), además de que no presenta problemas de corrosión.

Debido a que la biomasa lignocelulósica es un sustrato muy complejo, no puede ser completamente hidrolizada por una única enzima, por lo cual se requiere de una acción combinada de tres diferentes tipos de enzimas en el proceso:

- 1) *Endoglucanasas (EGs)*, las cuales rompen internamente los enlaces β -1,4 glucosídicos de la celulosa, atacando las regiones amorfas de la celulosa y generando cadenas libres de enlaces (oligosacáridos), que causa la disminución en el largo de las cadenas y un incremento de los azúcares reductores.
- 2) *Exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBHs)*, actúan en los extremos no reductores de las moléculas de celulosa generando disacáridos de glucosa (celobiosa).
- 3) *Glucosidasas*, las cuales hidrolizan celobiosa y productos de cadena corta para liberar monómeros de glucosa.

En la figura 14 y 15 se representa el modelo de acción de las celulasas en las zonas de la celulosa amorfa y cristalina, y la acción de las endo-, exo-, y glucosidasas.

Debido al proceso de hidrólisis por la acción de las enzimas se pueden generar diversos productos como se muestra en la Figura 16.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

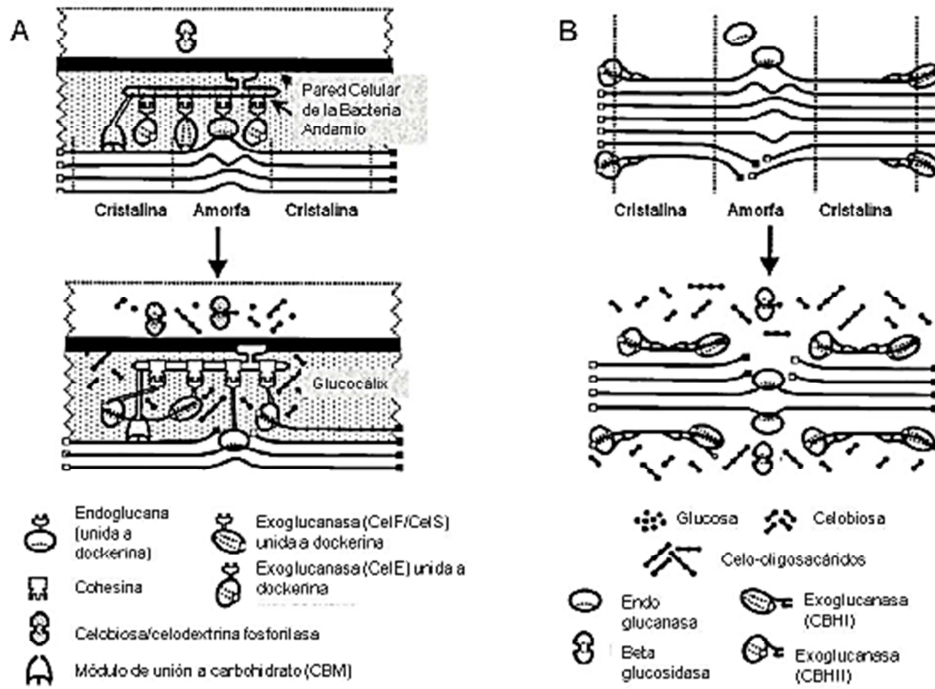


Figura 14. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina en el sistema de celulasas (A) complejo y (B) no complejo. (Tomado de Cuervo *et al.* 2009).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

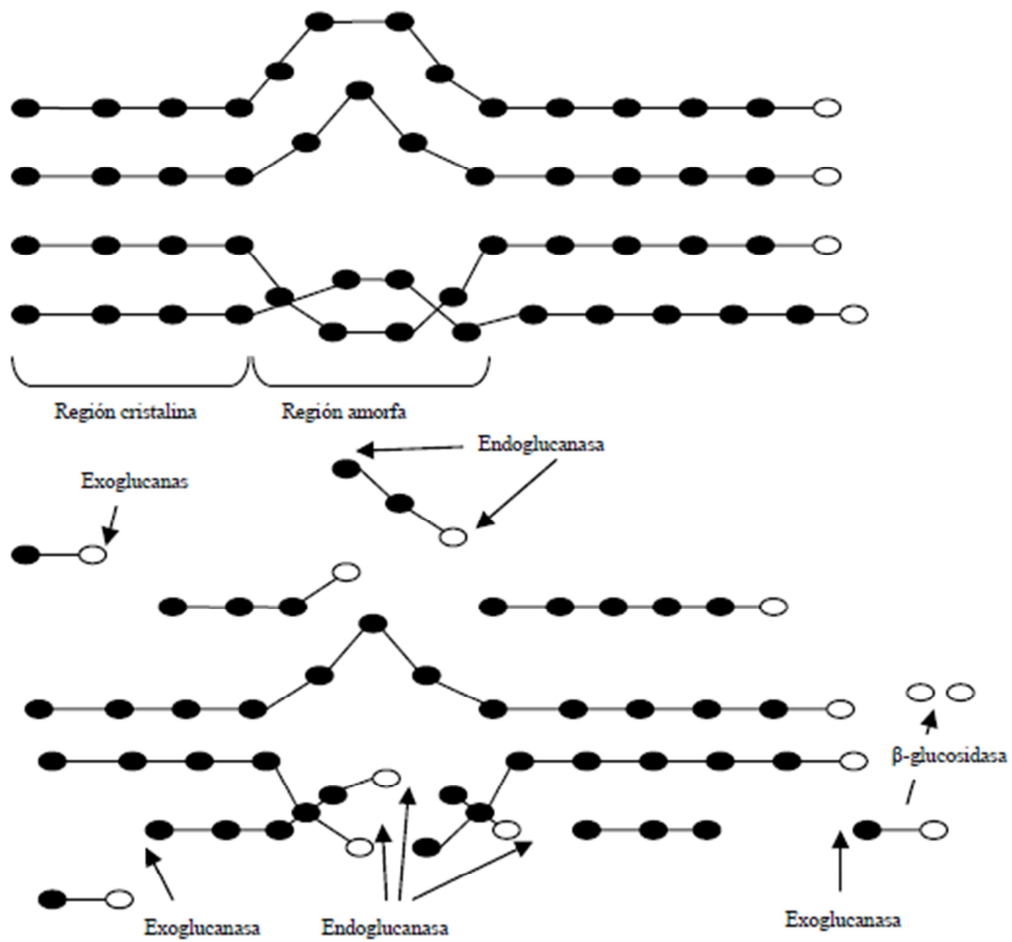


Figura 15. Representación del modo de acción de las celulasas (Barreto, 2008)

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

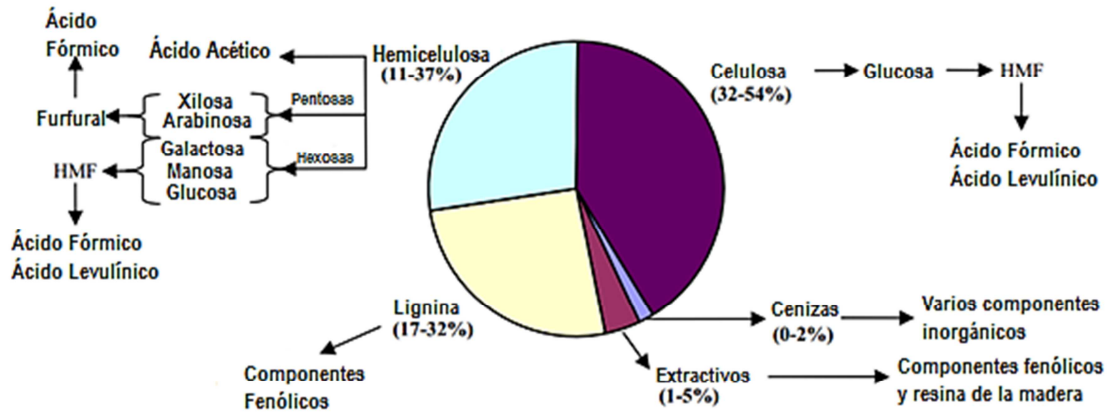
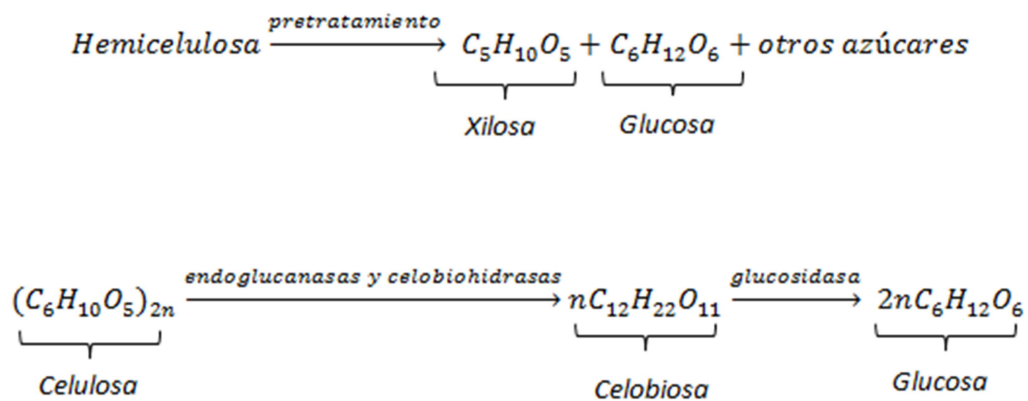


Figura 16. Composición del material lignocelulósico y sus productos potenciales de la hidrólisis (Taherzadeh & Karimi, 2007).

El proceso de hidrólisis se puede expresar mediante las siguientes expresiones:



CAPÍTULO 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de diferentes pretratamientos sobre la etapa de sacarificación enzimática aplicada al material lignocelulósico y seleccionar la ruta de proceso que permita la mayor producción de azúcares fermentables para la producción de etanol de segunda generación.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

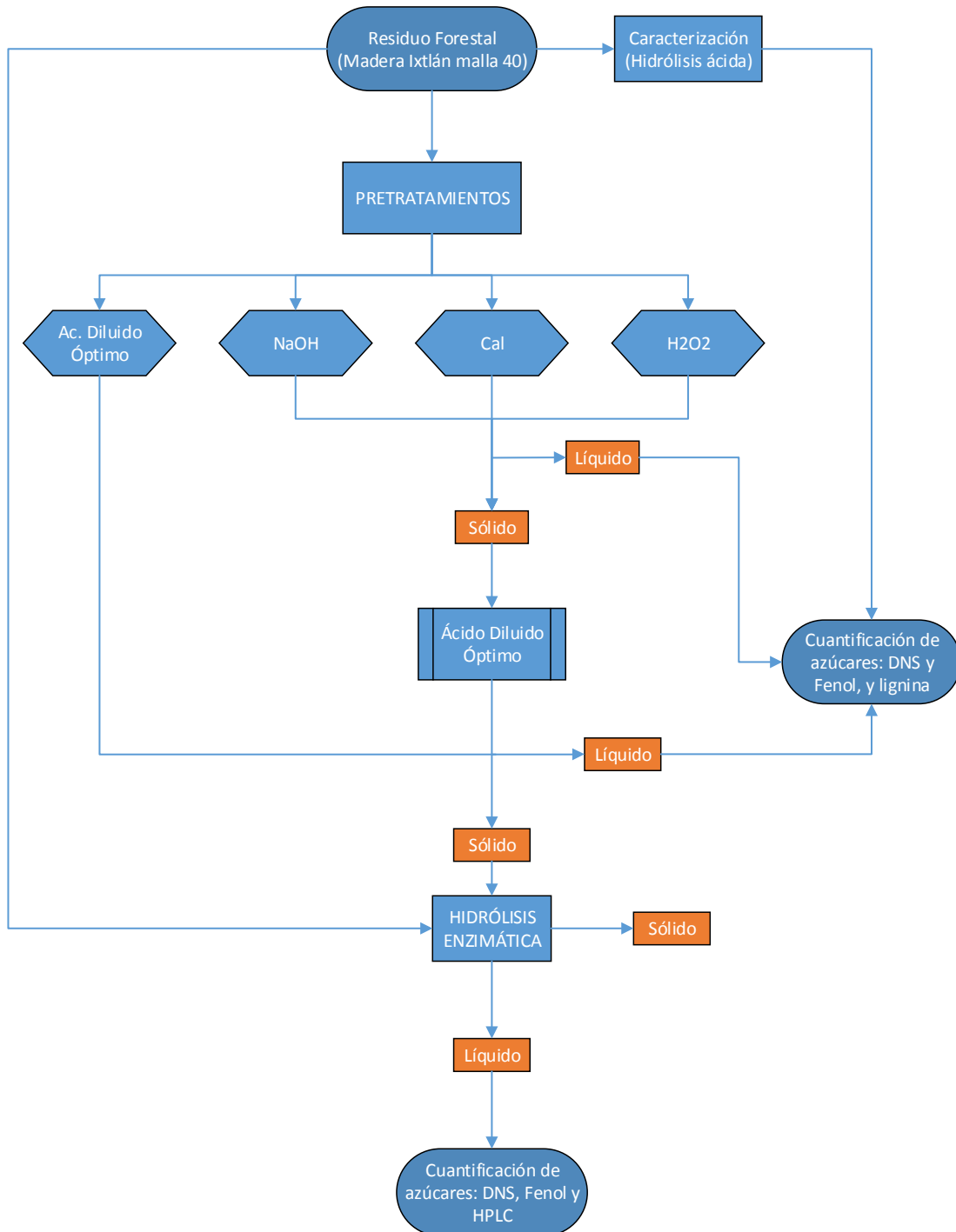
Caracterizar al residuo forestal mediante el contenido de lignina, azúcares totales y azúcares reductores, establecer un diseño de experimentos al pretratamiento ácido para determinar las mejores condiciones de operación de temperatura, tiempo de reacción y concentración, y analizar el efecto de los pretratamientos sobre el material lignocelulósico comparado con el material sin pretratar.

2.3. HIPÓTESIS.

La aplicación de los pretratamientos modificará la estructura y solubilizará parte de la lignina del material lignocelulósico, provocando así un aumento de la accesibilidad de las enzimas en la etapa de hidrólisis enzimática y por consecuencia un aumento de la generación de azúcares fermentables a etanol en comparación con el material sin pretratar.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

3.1. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.



CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

3.2. REACTIVOS Y EQUIPO.

Equipos y materiales.

- Tubos de ensayo marca Pyrex con rosca (10mL, 25mL y 40mL)
- Termobalanza marca OHAUS modelo MB45
- Mortero de porcelana
- Filtros de crisol de porcelana.
- Equipo de filtración al vacío.
- Matraces Erlenmeyer de 50mL marca Pyrex
- Autoclave marca YAMATO modelo SE510
- Balanza Granataria marca SCIENTECH modelo SG 5000
- Balanza Analítica marca DENVER INSTRUMENTS modelo P1-114
- Horno de Convección marca FELISA modelo FE02292A.
- Espectrofotómetro Uv-Vis marca THERMO SPECTRONIC modelo HELIOS.
- Micropipeta automática de 5000 μ Ly 100 μ L
- Vortex
- Tiras de papel pH
- Reactor de acero inoxidable de alta presión marca Parr de 100mL modelo
- Tubos Falcon de 40 y 20 mL.
- Papel filtro Whatman No. 1
- Probetas de 10mL, 25 mL y 50 mL.
- Evaporador (baño de temperatura con agitación) marca BÜCHI modelo Syncore P-101
- Viales de 5mL, 10mL y 15mL
- Parrilla de Calentamiento marca CORNING modelo PC-620
- Eppendorf de 1.5 mL
- Centrifugadora marca EPPENDORF modelo 5810-R

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

- Filtros de 0.2 μm para jeringa
- Jeringas de Vidrio para Filtración marca MICRO-MATE
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) marca HEWLETT-PACKARD modelo 1100 con Detector Evaporativo de Dispersión de Luz marca AGILENT TECHNOLOGIES modelo 1260 ELDS
- Columna de HPLC Pinnacle™ II Amino Columns marca RESTEK. Tamaño de partícula 5 μm , esférica. Longitud: 15 cm. Tamaño del poro 110 Å. Rango de pH: 2.5 a 7.5. Límite de Temperatura: 80°C.

Reactivos.

- Ácido sulfúrico al 96%, reactivo ACS
- Hidróxido de sodio (perlas), J.T. Baker
- Alanina, ALDRICH
- Reactivo DNS
- Peróxido de hidrógeno al 30% , Ferm-nt
- Cal (CaO)
- Glucosa SIGMA-ALDRICH
- Solución de fenol al 5% (p/v)
- Buffer de Citratos pH 4.80
- Carbonato de sodio, ALDRICH
- Acetonitrilo de alta pureza para HPLC, Ferm-nt
- Coctel enzimático (Por cuestiones de confidencialidad del Instituto Mexicano del Petróleo con la empresa proveedora, se referirá en este trabajo a los cocteles enzimáticos utilizados como E6 y E7 sin hacer referencia al proveedor).

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

3.3. METODOLOGÍA DESCRIPTIVA.

3.3.1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

La industria forestal está constituida en su mayor parte por aserraderos en donde se procesan los troncos de los árboles para obtener madera. El aserrín derivado del corte de la madera con sierras es un residuo que no se aprovecha y en la mayoría de los casos se acumula en lugares cercanos a los aserraderos. Esto debido a que los troncos de los árboles se asemejan a cilindros, y para obtener las tablas se tienen que realizar cortes para formar prismas rectangulares o cuadrados. De esta manera, las partes exteriores que se cortan de los troncos tienen formas irregulares que son consideradas como costeras, y parte de estas costeras se utilizan para obtener palos de escoba y cajas de empaque de frutas y verduras, pero el resto es considerado como residuo.

El 80% del aprovechamiento forestal es de diferentes especies de pinos, las cuales varían dependiendo del lugar. En el caso de Ixtlán, Oaxaca, las especies aprovechadas son *Pinus patula*, *Pinus pseudostrobus*, *Pinus oaxacana*, *Pinus douglasiana*, *Pinus ayacahuite*, *Pinus teocote*, *Pinus rudis* y *Pinus leiophylla*.

Para el presente trabajo se utilizó una mezcla de estas especies a la cual se le denominó como madera Ixtlán costera proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en forma de aserrín con tamaño de malla 40, procedente de la región de Ixtlán, Oaxaca (Figura 17).

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.



Figura 17. Residuo forestal lignocelulósico utilizado. Madera Ixtlán costera con tamaño de malla 40.

3.3.2 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

Contenido de humedad y ceniza.

El contenido de humedad del residuo forestal se determinó mediante el uso de una termobalanza por calentamiento de la muestra a 105 °C, para reportar los resultados de los análisis de la biomasa en base seca (b.s.)

La determinación de cenizas se realizó con la ayuda de un crisol a peso constante, en el cual se colocó una muestra de 3 a 5 gramos y se calcinó posteriormente con un mechero hasta que ya no desprendiera humos. Posteriormente, se dejó enfriar en una mufla y se trasladó al desecador para su completo enfriamiento.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Hidrólisis ácida.

La hidrólisis ácida presenta una alta productividad y rendimiento en comparación con la hidrólisis enzimática. Sin embargo, durante la hidrólisis ácida puede ocurrir una degradación significativa de los monosacáridos y formar compuestos como furfural de las pentosas e hidroximetilfurfural de las hexosas. Éstos furanos pueden formar ácidos alifáticos como el ácido fórmico o levulínico, causando bajos rendimientos en la fermentación (Duarte, 2009).

De esta manera se aplicó una hidrólisis ácida al residuo forestal únicamente con el propósito de determinar el contenido de total de azúcares totales, reductores y lignina (soluble e insoluble en ácido) del material a modo de caracterización.

Procedimiento.

Se pesaron alrededor de 300 mg de madera Ixtlán en dos matraces Erlenmeyer con tapón al cual se añadió 3 mL de ácido sulfúrico al 72%. Posteriormente, se incubaron en un baño con agua y agitación a 30°C durante 60 minutos. Pasado el tiempo de reacción se agregaron 51 mL de agua destilada con el propósito de diluir el ácido al 4%. Después se colocaron los matraces en una autoclave a una temperatura de 121°C por 1 hora. Pasado este tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente (Barrera *et al.*, 2013).

Determinación del contenido total de lignina.

La cuantificación de lignina presente en la biomasa se determina indirectamente con el peso del residuo sólido remanente después de la hidrólisis completa de los polisacáridos de dicho material.

El material insoluble se forma por condensación de la lignina original en condiciones fuertemente ácidas utilizadas en la hidrólisis, mientras que en el hidrolizado líquido se solubiliza una pequeña porción de lignina (lignano), la cual es determinada midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Uv-VIS.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

La lignina total está representada por la lignina soluble y la insoluble en ácido (Sluiter *et al.*, 2008).

Determinación de lignina insoluble en ácido (LIA).

Para la determinación de LIA (Ecuación 1) se filtró el líquido obtenido en la hidrólisis ácida mediante un equipo de filtración al vacío utilizando filtros de crisol previamente pesados (hasta alcanzar peso constante). Se recuperaron todos los sólidos remanentes y se secaron en una estufa a 100°C por 24 horas.

$$\%LIA = \frac{\text{masa filtro con muestra} - \text{masa filtro}}{\text{masa biomasa sin humedad}} * 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

Determinación de lignina soluble en ácido (LSA).

La determinación de lignina soluble en ácido se realizó mediante la técnica propuesta por Sluiter (2010). Esta técnica consiste en medir la absorbancia de una alícuota del líquido de la hidrólisis ácida utilizando un UV-Vis, a una longitud de onda recomendada de 240 nm y 320 nm correspondientes al bagazo de caña y rastrojo de maíz respectivamente.

El porcentaje de lignina (% LSA) se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%LSA = \frac{UVabs \times \text{Volumen del filtrado} \times \text{dilución}}{\epsilon \times \text{peso de la biomasa sin humedad} \times \text{ancho de la celda}} \times 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

Dónde:

UVabs = valor de la absorbancia de la muestra

Volumen del filtrado [=] mL

ϵ = absortividad de la biomasa a la longitud de onda específica

Peso de la biomasa sin humedad [=] mg

Ancho de la celda [=] cm

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Con el propósito de determinar el valor de absorptividad recomendada (ϵ) se realizó una comparación de los perfiles de lignina del residuo forestal utilizado con los tipos de biomasa mostrados en la Tabla 7 (Ver Anexo A).

Tabla 7. Constantes de absorptividad para medir lignina soluble en ácido para distintos tipos de biomasa (Barrera *et al.*, 2013)

Biomasa	Lambda max (nm)	Absorptividad a lambda max (L/gcm)	Longitud de onda recomendada (nm)	Absorptividad a la longitud de onda recomendada (L/gcm)
<i>Pinus radiata</i>	198	25	240	12
Bagazo de caña	198	40	240	25
Rastrojo de maíz	198	55	320	30
<i>Populus deltoides</i>	197	60	240	25

Cuantificación de azúcares totales.

Fundamento.

Para la cuantificación de azúcares totales se utilizó un método colorimétrico propuesto por Dubois (1956) fundamentado en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones, una serie de reacciones toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol. Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. Los carbohidratos en presencia de un medio ácido, se hidrolizan y se deshidratan dando lugar a la formación de furfural y 5-hidroxi metilfurfural (HMF) que al reaccionar con el fenol forman los compuestos

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

coloridos que pueden ser leídos en una longitud óptica específica (Figura 18). 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 (Barrera *et al.*, 2013)

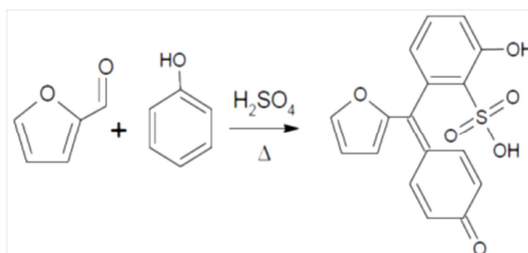


Figura 18. Reacción de hidrólisis y condensación de carbohidratos.

Procedimiento.

Para la aplicación de este método se prepararon curvas de calibración con glucosa y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 490 nm (Anexo A).

Para el tratamiento de la muestra se colocó un volumen de 1 mL en un tubo de ensayo realizando la dilución necesaria con el propósito de que la absorbancia leída en el UV-Vis entrara en el intervalo de la curva de calibración. Posteriormente se añadió 1 mL de solución de fenol al 5% (p/v), en seguida se agregó 5 mL de ácido sulfúrico concentrado al 96% (p/p) y se homogenizó con la ayuda de un vortex. Por último, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se determinó su absorbancia en un UV-Vis a una longitud de onda de 490 nm.

De esta manera, la cuantificación de azúcares totales se realizó interpolando la absorbancia obtenida en las curvas de calibración preparadas.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Cuantificación de azúcares reductores.

Fundamento.

De acuerdo al método descrito en 1951 por Bernfeld, el grupo aldehído de los azúcares reductores reaccionan con el grupo 3-nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para producir el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Figura 19). Este último reacciona con el reactivo DNS para producir una ozazona (compuesto de tonalidad amarilla) y el ácido correspondiente al carbohidrato que actúo como agente reductor (Barrera *et al.*, 2013).

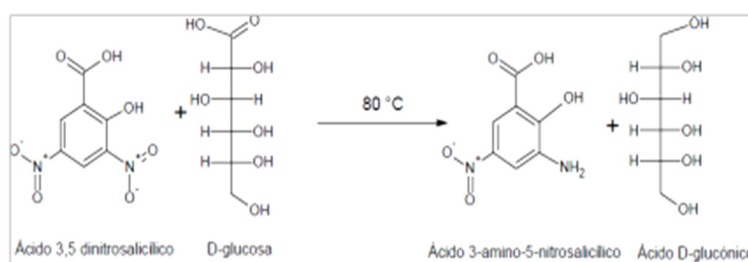


Figura 19. Reacción de hidrólisis y condensación de carbohidratos.

Procedimiento.

Al igual que el método anterior se prepararon curvas de calibración utilizando una solución de glucosa, y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 540 nm (Anexo A).

Para el tratamiento de la muestra se colocó 1 mL de alícuota en un tubo de ensayo con la dilución necesaria de tal manera que la absorbancia leída entrara en el intervalo de las curvas de calibración previamente preparadas. Posteriormente se agregó 1 mL de reactivo DNS y se calentó por 5 minutos en un baño a ebullición. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar la mezcla y se agregaron 8 mL de agua destilada, homogeneizando la mezcla con ayuda de un vortex. Por último se leyó la absorbancia en el UV-Vis a una longitud de onda de 540 nm.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

3.3.3 OPTIMIZACIÓN DEL PRETRATAMIENTO ÁCIDO MEDIANTE UN DISEÑO DE EXPERIMENTOS.

Los carbohidratos al contener un grupo aldehído o un grupo cetona y varios hidroxilos están sujetos a cambios químicos debido a que se ven afectados principalmente por diversos factores como la concentración de ácidos, bases, temperatura, tiempo de reacción, etc. Debido a que estos factores están interrelacionados, se realizó un análisis multivariable denominado diseño de experimentos de compositos centrales 2^3 (Figura 20). Este método realiza una serie de combinaciones de los tres parámetros establecidos a partir de un valor central seleccionado para cada parámetro (Plasun, 1999).

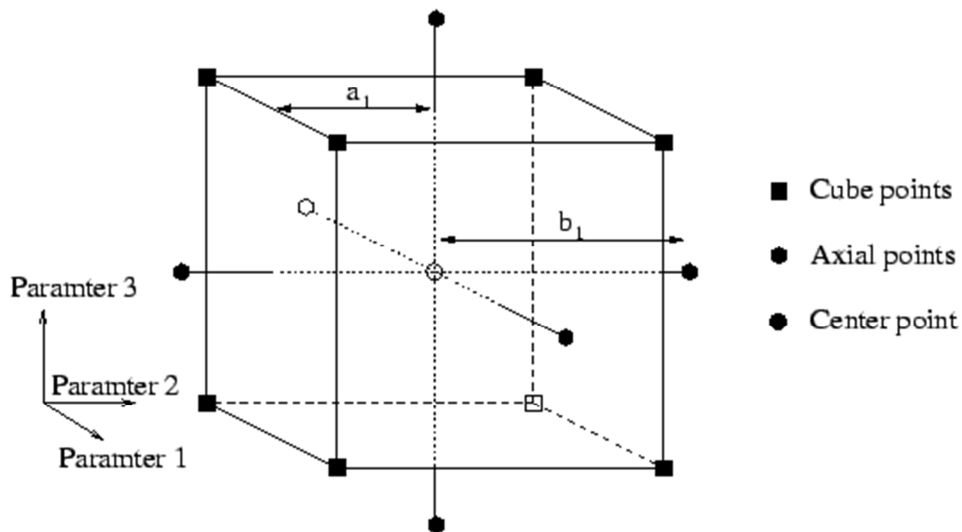


Figura 20. Diseño circunscrito de compositos centrales con tres parámetros de entrada (Plasun, 1999).

Para el presente diseño de experimentos, se evaluó el efecto de tres factores independientes sobre el pretratamiento ácido: la temperatura de operación, la concentración de ácido y el tiempo de reacción. De esta manera, el modelo

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

utilizado fue un modelo de compositos centrales del tipo 2^k , con 3 factores, 2 niveles y 1 bloque, más 5 puntos centrales para estimar el error experimental. De esta manera se definió el valor de k igual a 3, dando como resultado 8 experimentos entre la interacción de los parámetros, más 5 experimentos en el punto central y 6 experimentos correspondientes al plano axial, resultando en 19 experimentos.

En la figura 21 se muestra una representación del dominio experimental de los tres factores (temperatura= X_1 , concentración= X_2 y tiempo de reacción= X_3) en el que cada esfera indica un posible experimento con valores concretos de cada factor, sin embargo, para conocer el efecto de un factor es suficiente hacerlo variar entre dos factores (Ferré, 2004).

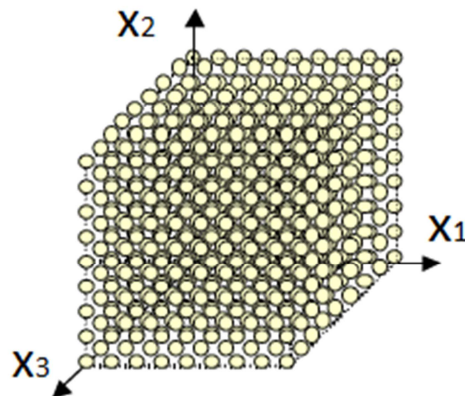


Figura 21. Representación del dominio experimental como combinación de los dominios particulares de cada factor.

Los rangos y los niveles de las variables independientes establecidas fueron seleccionados basados en estudios preliminares aplicados a maderas (Tabla 8). Los puntos centrales de las variables constituyen el nivel cero, y la combinación de cada variable a su nivel más alto o más bajo con el nivel cero constituyen puntos axiales.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Tabla 8. Valores propuestos de los niveles de las variables independientes para el diseño de experimentos.

Variable independiente	Valor del nivel del factor		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	95	120	145
[H ₂ SO ₄] (% p/p)	1	2	3
Tiempo (min)	40	60	80

El diseño de experimentos se realizó con la ayuda del software *STATISTICA v.10* con el cual se obtuvo una combinación aleatoria de los tres factores, obteniendo un dominio experimental (Tabla 9). Cabe mencionar que el diseño de experimentos arrojó 6 experimentos más allá del nivel alto y bajo (1.682 y -1.682) de manera aleatoria para abarcar un dominio experimental más amplio, correspondiente a cada una de las caras del cubo de los tres factores estudiados (puntos axiales, Figura 20).

Cada experimento se realizó utilizando una relación de sólidos del 10% (m/v). Por lo que se estableció utilizar 1.0 g de madera Ixtlán añadiendo un volumen de 10 mL de la solución de ácido sulfúrico.

Para observar el efecto de estos factores se eligieron tres variables de respuesta que se consideraron más significativas para la producción de etanol: azúcares totales, azúcares reductores y lignina soluble en ácido (LSA).

Los experimentos se realizaron en un reactor de alta presión marca Parr de 100 mL (Figura 22), a las condiciones establecidas en la Tabla 9, monitoreando la temperatura y presión mediante la ayuda del software de control de los reactores (Figura 23).

Al término de cada reacción se utilizó un equipo de filtración al vacío para separar el líquido resultante de los sólidos, posteriormente al filtrado se le determinó el

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

contenido de lignina soluble en ácido (LSA) dentro de las primeras 6 horas posteriores al término de cada reacción a una longitud de onda de 240 nm. Así mismo, se determinó el contenido de azúcares totales y reductores mediante las técnicas descritas a una absorbancia de 490 nm y 540 nm respectivamente.

Tabla 9. Dominio experimental para el estudio del efecto de la temperatura, concentración de ácido y tiempo de reacción sobre el pretratamiento ácido.

No. Exp	Variable real			Variable codificada		
	T (°C)	[H2SO4] (%p/p)	t (min)	T	[H2SO4]	t
1	145	1.0	80	1.000	-1.000	1.000
2	95	1.0	80	-1.000	-1.000	1.000
3	120	2.0	60	0.000	0.000	0.000
4	120	2.0	94	0.000	0.000	1.682
5	95	1.0	40	-1.000	-1.000	-1.000
6	162	2.0	60	1.682	0.000	0.000
7	145	3.0	40	1.000	1.000	-1.000
8	120	2.0	26	0.000	0.000	-1.682
9	78	2.0	60	-1.682	0.000	0.000
10	95	3.0	40	-1.000	1.000	-1.000
11	145	3.0	80	1.000	1.000	1.000
12	120	2.0	60	0.000	0.000	0.000
13	120	2.0	60	0.000	0.000	0.000
14	95	3.0	80	-1.000	1.000	1.000
15	120	0.3	60	0.000	-1.682	0.000
16	120	2.0	60	0.000	0.000	0.000
17	145	1.0	40	1.000	-1.000	-1.000
18	120	3.7	60	0.000	1.682	0.000
19	120	2.0	60	0.000	0.000	0.000

3.3.4 PRETRATAMIENTOS DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

En el presente trabajo se aplicaron cuatro pretratamientos: ácido diluido con H₂SO₄, básico con NaOH, básico-oxidante con H₂O₂ y básico con cal (CaO). Con cada pretratamiento básico se realizó una combinación con el pretratamiento ácido, es decir, posterior a cada pretratamiento básico se aplicó el pretratamiento

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

con ácido diluido con el propósito de aumentar la cantidad de azúcares fermentables a etanol.

Cada pretratamiento se realizó en un reactor de alta presión marca Parr de 100 mL, utilizando un software para su control y un sistema de enfriamiento (Figura 22 y 23). Posteriormente, se determinó la cantidad de lignina soluble en ácido (LSA) y la cantidad de azúcares totales y reductores, mediante los métodos descritos anteriormente.

En cada pretratamiento se decidió utilizar una cantidad significativa de biomasa con el propósito de tener biomasa suficiente para las etapas subsecuentes de pretratamiento ácido e hidrólisis enzimática, limitándose a las dimensiones del vaso del reactor, ya que por arriba de 2.5 g de carga de biomasa no había suficiente espacio entre el agitador del reactor y la biomasa, lo cual provocaba que se comprimiera la biomasa y se dificultara la agitación y el ensamblado del reactor. De esta manera, se estableció pesar alrededor de 2.3 g de biomasa para los pretratamientos con NaOH y cal con el fin de tener suficiente biomasa disponible para la etapa subsecuente de pretratamiento ácido e hidrólisis ácida y evitar problemas de agitación. Mientras que para el pretratamiento con ácido diluido, se estableció pesar alrededor de 2.0 g para poder utilizarla en la etapa de hidrólisis enzimática. Finalmente, se estableció en el pretratamiento con H₂O₂ pesar alrededor de 1.0 g de biomasa, ya que este pretratamiento se realizó en tubos de ensayo por triplicado. Cabe mencionar que en todos los pretratamientos se conservó la relación de sólidos del 10% excepto para el pretratamiento con H₂O₂, ya que se utilizó 15% debido a que esta relación se tomó del trabajo de Vázquez (2012).

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.



Figura 22. Reactor Parr de alta presión y el sistema de enfriamiento utilizado en la aplicación de pretratamientos.



Figura 23. Monitoreo y control del reactor.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Pretratamiento con ácido diluido.

Este pretratamiento es usado para modificar la estructura del material lignocelulósico e hidrolizar principalmente la hemicelulosa y la celulosa. El ácido comúnmente utilizado es ácido sulfúrico, ya que ha sido empleado para pretratar una amplia variedad de biomasa.

Las condiciones de operación utilizadas en este pretratamiento fueron las obtenidas por el diseño de experimentos:

Tabla 10. Condiciones de operación para el pretratamiento con ácido diluido.

Factor	Valor
Temperatura (°C)	121
[H ₂ SO ₄] (% p/p)	1
Tiempo de reacción (min)	30

En el reactor de 100 mL, se colocó 1.0 g de biomasa y se añadieron 10mL de una solución de H₂SO₄ al 1% (p/p) previamente preparada, manteniendo la relación de sólidos del 10%. Posteriormente, se programó el reactor con una agitación de 250 rpm y una temperatura de 121 °C mediante la programación de 4 segmentos. El primer segmento correspondiente a una etapa de calentamiento, el segundo segmento a la etapa de reacción, el tercer segmento a la etapa de enfriamiento y el cuarto segmento a una etapa de estabilización a temperatura ambiente (Figura 24). Una vez terminada la reacción en el reactor, la muestra se trasvasó a un tubo Falcon para después filtrar la mezcla en un equipo de filtración al vacío. En las primeras 6 horas posteriores a la reacción se determinó la LSA y el filtrado restante se almacenó en congelación para su posterior cuantificación de azúcares totales y reductores. Por otro lado, el sólido filtrado se lavó con una solución de buffer de citratos (pH 4.8) con el propósito de neutralizar la biomasa pretratada hasta alcanzar un pH entre 4.5 y 5.8, midiendo el pH del lavado con ayuda de tiras

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

de papel pH. Finalmente, la biomasa neutralizada se almacenó en congelación para la posterior etapa de hidrólisis enzimática.

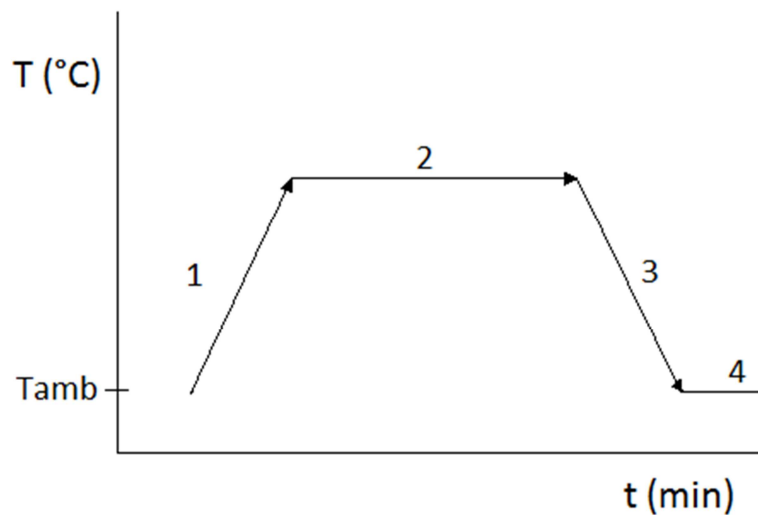


Figura 24. Representación de los segmentos para la programación del reactor.

Pretratamiento básico con NaOH y posterior aplicación del pretratamiento ácido.

Este pretratamiento prácticamente es un proceso de deslignificación, el cual causa hinchazón del material lignocelulósico, modifica la estructura de la lignina y disminuye la cristalinidad.

Las condiciones de operación de este pretratamiento fueron utilizadas de estudios previos por el equipo de trabajo del laboratorio en otros materiales lignocelulósicos (Tabla 11).

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Tabla 11. Condiciones de operación para el pretratamiento con NaOH (Vázquez, 2012).

Factor	Valor
Temperatura (°C)	121
[NaOH] (% p/p)	1
Tiempo de reacción (min)	60

En el reactor de 100 mL, se colocó 2.3 g de biomasa (base seca) y se añadieron 23mL de una solución de NaOH al 1% (p/p) previamente preparada, manteniendo la relación de sólidos del 10%. Posteriormente, se programó el reactor con una agitación de 250 rpm y una temperatura de 121 °C mediante la programación de 4 segmentos. El primer segmento correspondiente a una etapa de calentamiento, el segundo segmento a la etapa de reacción, el tercer segmento a la etapa de enfriamiento y el cuarto segmento a una etapa de estabilización a temperatura ambiente. Una vez terminada la reacción en el reactor, la muestra se trasvasó a un tubo FALCON para después filtrar la mezcla en un equipo de filtración al vacío. En las primeras 6 horas posteriores a la reacción se determinó la LSA y el filtrado restante se almacenó en congelación para su posterior cuantificación de azúcares totales y reductores. Por otro lado, el sólido filtrado se lavó con una solución de buffer de citratos (pH 4.8) con el propósito de neutralizar la biomasa pretratada hasta alcanzar un pH entre 4.5 y 5.3, midiendo el pH del lavado con ayuda de tiras papel pH. Finalmente, la biomasa neutralizada se almacenó en congelación para la posterior aplicación del pretratamiento ácido.

Una vez aplicado el pretratamiento básico se procedió a aplicar el pretratamiento ácido al material lignocelulósico. Para esto, se determinó el contenido de humedad del material pretratado con NaOH con la ayuda de una termobalanza. Con la humedad obtenida se calculó la cantidad de biomasa húmeda a pesar para realizar el pretratamiento ácido, de tal manera que se pretratara biomasa suficiente para la etapa subsecuente de hidrólisis enzimática.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Realizado esto, se aplicó el procedimiento para el pretratamiento ácido con las condiciones establecidas anteriormente.

Pretratamiento con Cal (CaO) y posterior aplicación del pretratamiento ácido.

En este pretratamiento, se utilizó óxido de calcio (CaO) y el óxido de calcio de magnesio (CaMgO₂) conocido comúnmente como cal viva. Este pretratamiento está basado en el proceso de nixtamalización, el cual es un proceso prehispánico que consiste en la lixiviación del grano de maíz mediante un tratamiento térmico alcalino. Éste tratamiento consiste en la cocción del grano de maíz en agua con 1 a 3 % de CaO, a 95-100°C durante 60-180 min, seguido de un reposo de 12 horas. En la industria se utilizan estas condiciones en procesos continuos que optimizan el uso de energía y reducen la variabilidad de los parámetros del proceso. Es común que se modifiquen estas condiciones con el fin de obtener productos específicos. En la nixtamalización, el pH alcalino y el calor, así como el prolongado tiempo de reposo en la solución, logran debilitar las paredes celulares por la solubilización parcial de hemicelulosas y se hincha la estructura del material lignocelulósico.

Se decidió utilizar la cal viva debido a las ventajas que representa, tal como su bajo costo y además es capaz de proporcionar mayor alcalinidad que otros componentes alcalinos como el hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) por unidad de masa. Las condiciones utilizadas para este pretratamiento se basaron en el trabajo de Vélazquez (2012), Tabla 12, estandarizando el valor de la temperatura para hacer el pretratamiento comparable con el pretratamiento de hidróxido de sodio.

Tabla 12. Condiciones de operación para el pretratamiento con Cal viva.

Factor	Valor
Temperatura (°C)	121
CaO (% p/v)	1
Tiempo de reacción (min)	60

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

En el reactor de 100 mL, se colocaron 2.3 g de biomasa (base seca) y se añadieron 23mL de una solución de Cal al 1% (p/p) previamente preparada, manteniendo la relación de sólidos del 10%. Posteriormente, se programó el reactor con una agitación de 250 rpm y una temperatura de 121 °C mediante la programación de 4 segmentos mencionada anteriormente. Una vez terminada la reacción en el reactor, la muestra se trasvasó a un tubo FALCON para después filtrar la mezcla en un equipo de filtración al vacío. En las primeras 6 horas posteriores a la reacción se determinó la LSA y el filtrado restante se almacenó en congelación para su posterior cuantificación de azúcares totales y reductores. Por otro lado, el sólido filtrado se lavó con una solución de buffer de citratos (pH 4.8) con el propósito de neutralizar la biomasa pretratada hasta alcanzar un pH entre 4.5 y 5.3, midiendo el pH del lavado con ayuda de tiras papel pH. Finalmente, la biomasa neutralizada se almacenó en congelación para la posterior aplicación del pretratamiento ácido.

Una vez aplicado el pretratamiento con cal se procedió a aplicar el pretratamiento ácido al material lignocelulósico. Para esto, se determinó el contenido de humedad del material pretratado con Cal con la ayuda de una termobalanza. Con la humedad obtenida se calculó la cantidad de biomasa húmeda a pesar para realizar el pretratamiento ácido, de tal manera que se pretratara suficiente biomasa para la etapa subsecuente de hidrólisis enzimática.

Realizado esto, se aplicó el procedimiento para el pretratamiento ácido con las condiciones establecidas.

Pretratamiento básico/oxidante con H₂O₂ y posterior aplicación del pretratamiento ácido.

El pretratamiento básico/oxidante ha sido reconocido como un poderoso agente oxidante y en su selectividad a la estructura de la lignina.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Las condiciones utilizadas en este pretratamiento se tomaron de un trabajo previo realizado por Guzmán (2012).

Tabla 13. Condiciones de operación para el pretratamiento con H₂O₂.

Factor	Valor
Temperatura (°C)	35
H₂O₂ (% v/v)	9
Tiempo de reacción (h)	26

Primeramente se ajustó el pH de la solución de H₂O₂ con concentración del 9% a un pH de 11.5 añadiendo una solución de NaOH 2M y con la ayuda de un potenciómetro.

En un tubo de ensayo, se colocó 1.0 g de biomasa a la cual se añadió 7mL de la solución de H₂O₂ previamente preparada para mantener la relación del 15% de sólidos propuesta por Guzmán (2012). Posteriormente, se colocaron los tubos en un evaporador Syncore a 35°C y 180 rpm durante 26 horas. Este experimento se realizó por triplicado utilizando 3 tubos en una misma carga al evaporador Syncore. Una vez terminada la reacción en el evaporador Syncore, la muestra se trasvasó a un tubo FALCON para después filtrarla en un equipo de filtración al vacío.

En las primeras 6 horas posteriores a la reacción, se determinó la LSA y el filtrado restante se almacenó en congelación para su posterior cuantificación de azúcares totales y reductores. Por otro lado, el sólido filtrado se lavó con una solución de buffer de citratos (pH 4.8) con el propósito de neutralizar la biomasa pretratada hasta alcanzar un pH entre 4.5 y 5.3, midiendo el pH del lavado con ayuda de tiras papel pH. Finalmente, la biomasa neutralizada se almacenó en congelación para la posterior aplicación del pretratamiento ácido.

3.3.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Para la etapa de hidrólisis enzimática, se utilizaron dos cócteles enzimáticos comerciales denominados E6 y E7. El coctel enzimático E6 contiene principalmente enzimas xilanasas, mientras que en el coctel enzimático E7 las enzimas predominantes son las celulasas. Aunque en ambos cocteles predominan principalmente este tipo de enzimas, cabe destacar que su actividad no es solo una, es decir, contienen otro tipo de enzimas tal como endo y exoglucanasas y β -glucosidasas, que trabajan sinérgicamente para desdoblar la celulosa contenida en el material lignocelulósico.

En dos viales, se pesaron por separado alrededor de 2.0 g de biomasa (base seca) del material previamente pretratado. Posteriormente, se agregó una solución buffer de citratos (50 mM, pH 4.8) correspondiente a un volumen del 90% en peso (base seca) de la biomasa con el propósito de asegurar el pH adecuado para la acción de las enzimas. Una vez agregada la solución buffer, el vial se colocó en un evaporador Marca Buchi modelo Syncore Q-101 y se dejó reposar durante 5 minutos a una temperatura de 50°C y agitación de 180 rpm para ambientar la mezcla a las condiciones adecuadas para la posterior adición de la enzima. Posteriormente, se agregó la enzima E6 y E7 por separado en cada vial con una relación del 10% con respecto al peso (base seca) de la biomasa. La reacción se mantuvo durante 1 hora a 50°C y 180 rpm. Finalmente y transcurrido el tiempo de reacción, cada vial se colocó en un baño de agua a ebullición con el propósito de inactivar la enzima.

Una vez efectuada la hidrólisis enzimática, se determinó el pH de la mezcla para corroborar que el pH de la reacción se haya mantenido, posteriormente las muestras se trasvasaron a tubos Eppendorf para centrifugarlas, y así poder recuperar el líquido de la hidrólisis enzimática. De esta manera, al líquido obtenido se le determinó azúcares totales, reductores y se realizó la identificación de azúcares mediante HPLC.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Cabe mencionar que este procedimiento se aplicó al material pretratado con: ácido diluido, básico con NaOH y post pretratamiento ácido diluido, básico con H₂O₂ y post pretratamiento ácido diluido y CaO y post pretratamiento ácido diluido, y además se realizó un experimento con biomasa sin pretratar para utilizarla como referencia de comparación.

3.3.6 IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica cromatográfica usada para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito, la fase estacionaria en una columna cromatográfica y la fase móvil. Básicamente es un sistema compuesto de una fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector.

El analito se pasa a través de una columna con una fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo se conoce como tiempo de retención, único para el analito y depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil (Guzmán, 2012).

Para la fase móvil se utilizó una mezcla de agua con acetonitrilo. Además, se realizaron curvas de calibración de los azúcares en los hidrolizados: glucosa, xilosa, celobiosa, sacarosa y manosa con el propósito de determinar el tiempo de retención y las áreas correspondientes a distintas concentraciones de cada azúcar (Anexo C). Posteriormente, se inyectaron las muestras de los hidrolizados obtenidos de cada sacarificación enzimática para determinar el área de los picos obtenidos y así cuantificar la concentración de azúcares en la muestra. Cabe mencionar que se utilizó alanina como estándar interno, con un tiempo de retención de 30 minutos.

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

Las condiciones de operación de la columna se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Condiciones de operación de HPLC.

Parámetro	Condición
Temperatura del detector	80°C
Ganancia	7
Filtro	4
Presión	3.5 Bar
Temperatura de la columna	30°C
Flujo	1 mL/min
Tiempo de corrida	30 min
Volumen de inyección	10 µL
Fase móvil	Agua 18%, Acetonitrilo 82%

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

CONTENIDO DE HUMEDAD Y CENIZA.

La determinación de humedad se realizó por triplicado obteniendo una humedad promedio de $6.35 \pm 0.04\%$ (Tabla 15).

Tabla 15. Determinación de humedad de la madera Ixtlán malla 40.

No. muestra	masa muestra (g)	% humedad
1	0.501	6.39
2	0.504	6.35
3	0.506	6.32

Promedio % humedad	6.35
σ^3	0.04

La determinación de cenizas se realizó por triplicado obteniendo un contenido de cenizas promedio del $0.2009 \pm 0.0196\%$ (Tabla 16).

Tabla 16. Determinación del contenido de cenizas del material lignocelulósico.

No. Crisol	masa muestra (g)	crisol (g)	crisol+cenizas (g)	% cenizas
1	4.0069	44.3758	44.3839	0.2159
2	4.0029	41.7284	41.7351	0.1787
3	4.0038	41.8164	41.8242	0.2080

%cenizas promedio	0.2009
σ	0.0196

³ σ : Desviación estándar.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

HIDRÓLISIS ÁCIDA.

Con el propósito de caracterizar el material lignocelulósico se aplicó una hidrólisis ácida para cuantificar el contenido total de azúcares reductores y azúcares totales en el material forestal. De acuerdo a los resultados se obtuvo $65.87 \pm 2.93\%$ (mg/100 mg biomasa seca) de azúcares totales y $66.57 \pm 0.63\%$ (mg/100 mg biomasa seca) de azúcares reductores (ver Anexo A). La cantidad de azúcares totales contenidas en la biomasa es prácticamente la misma cantidad de azúcares reductores generados en la hidrólisis ácida, considerando por supuesto el error experimental en la determinación.

De esta manera, la madera Ixtlan se puede utilizar como una fuente para la producción de etanol ya que cuenta con una gran cantidad de azúcares para su fermentación, comparada con otros materiales como lo son el eucalipto globulus 69.9%, el álamo 73.2%, pino radiata 55.7%, bagazo de caña 68.7%, tallo de maíz 58.1%, paja de trigo 57% (Cunningham & López, 1994), además de su aprovechamiento como residuo.

Lignina insoluble en ácido.

Tabla 17. Determinación del %LIA.

No. Filtro	masa filtro (g)	filtro+muestra (g)	masa muestra (mg)	%LIA
1	30.021	30.109	88.400	29.477
2	29.485	29.576	91.300	30.082

%LIA promedio	29.78
σ	0.96

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Lignina Soluble en ácido.

Tabla 18. Resultados del %LSA de la madera Ixtlán a longitudes de onda de 240 y 320 nm.

λ rec (nm)	Absorptividad (L/g cm)	Absorbancia @ λ rec	%LSA
muestra 1			
240	25	0.711	2.53%
320	30	0.214	0.63%
muestra 2			
240	25	0.692	2.43%
320	30	0.207	0.61%

Datos: Ancho celda= 1cm y Volumen de filtrado=50 mL

λ rec (nm)	%LSA promedio	σ
240	2.48%	0.07%
320	0.62%	0.02%

Contenido de lignina total.

No. Matraz	masa biomasa (mg)
1	300.0
2	303.5

El contenido de lignina total (Ecuación 3) se determinó mediante la suma de la lignina insoluble en ácido (LIA, Tabla 17) y la lignina soluble en ácido (LSA, Tabla 18). Para ello, se consideró la longitud de onda recomendada de 240 nm para LSA, debido a su similitud con el perfil de lignina correspondiente al bagazo de caña (ver ANEXO A).

$$\%Total\ Lignina = \%LIA + \%LSA \quad \text{Ec. (3)}$$

$$\%Total\ Lignina = 29.78 + 2.48$$

$$\%Total\ Lignina = 32.26 \pm 1.03\%$$

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De esta manera, el contenido de lignina total es de $32.26 \pm 1.03\%$ (mg/100 mg biomasa seca) que representa un contenido alto, por lo que el material forestal utilizado corresponde al tipo de maderas blandas.

La caracterización del residuo forestal se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Caracterización del material lignocelulósico.

Determinación	% (p/p) ⁴	σ
Azúcares totales	65.87	2.93
Azúcares reductores	66.57	0.63
Lignina soluble en ácido	2.48	0.07
Lignina insoluble en ácido	29.78	0.96
Lignina Total	32.26	1.03
Humedad	6.35	0.04

⁴ % p/p: mg por cada 100 mg biomasa seca

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS.

Pretratamiento con ácido diluido.

Con el propósito de determinar el efecto de tres parámetros independientes del pretratamiento con ácido diluido sobre la madera Ixtlán, se realizó un diseño de experimentos de compositos centrales. Los parámetros son la temperatura, concentración de ácido y el tiempo de reacción, en tanto que las variables de respuesta son la cantidad de azúcares totales, de azúcares reductores y de lignina soluble en ácido.

La interacción de los parámetros fueron distribuidos aleatoriamente mediante la ayuda del software STATISTICA v.10.

Con la matriz obtenida de los parámetros mediante el diseño de experimentos se llevaron a cabo los experimentos a las diferentes condiciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20.

Para evaluar el efecto de las variables independientes sobre las variables de respuesta se ajustó un modelo matemático que representara los datos obtenidos. El modelo utilizado fue una ecuación cuadrática polinomial del tipo (Kang *et al*, 2012):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde Y es la variable de respuesta, X_i y X_j son las variables independientes codificadas (valores -1, 0 y +1), y β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} son los coeficientes constante independiente, lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente. La utilización de variables codificadas permite realizar una comparación más fácil entre los efectos ya que los coeficientes tienen las mismas unidades, ya que, utilizar

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

variables reales dificultaría esta comparación porque cada coeficiente tendría una unidad diferente correspondiente a la naturaleza de la variable.

Tabla 20. Resultados del diseño de experimentos en el pretratamiento ácido diluido de madera Ixtlán.

Exp. No.	Condiciones			Variables de respuesta		
	T(°C)	[H ₂ SO ₄] %(p/p)	t (min)	A. totales %(p/p)	A. reductores %(p/p)	% LSA
1	145	1	80	8.330	7.782	7.609
2	95	1	80	6.308	4.508	0.588
3	120	2	60	17.468	13.412	0.935
4	120	2	94	15.347	10.348	1.497
5	95	1	40	4.440	2.319	0.654
6	162	2	60	3.482	4.023	8.519
7	145	3	40	10.944	9.080	6.128
8	120	2	26	12.059	10.729	1.025
9	78	2	60	2.332	1.454	0.650
10	95	3	40	8.457	4.910	0.499
11	145	3	80	7.418	8.310	7.652
12	120	2	60	12.018	9.976	0.874
13	120	2	60	12.537	10.718	1.037
14	95	3	80	9.642	5.895	0.496
15	120	0.32	60	12.691	7.904	0.789
16	120	2	60	12.437	12.639	0.843
17	145	1	40	14.150	12.537	3.490
18	120	3.7	60	16.968	11.714	1.240
19	120	2	60	13.722	12.904	1.331

Con un análisis de varianza con nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$) se determinaron los factores significativos sobre las variables de respuesta.

Los coeficientes de respuesta, de acuerdo a la ecuación 4, representan el cambio de la misma en cada una de las variables independientes en el dominio experimental definido (Tabla 21).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tabla 21. Coeficientes del modelo experimental para las variables de respuesta en el pretratamiento ácido diluido de madera Ixtlán.

Efecto	Coeficiente	%A. totales (mg/100 mg m.s.)	%A. Reductores (mg/100 mg m.s.)	%LSA
Independiente	β_0	13.70±1.01**	11.95±0.77**	0.97±0.34**
(1) A(L)	β_1	1.02±0.61	1.79±0.47**	2.59±0.21**
A(Q)	β_2	-4.13±0.61**	-3.36±0.47**	1.47±0.21**
(2) B(L)	β_3	0.76±0.61	0.55±0.47	0.27±0.21
B(Q)	β_4	0.09±0.61	-0.86±0.47	0.21±0.21
(3) C(L)	β_5	-0.06±0.61	-0.22±0.47	0.43±0.21
C(Q)	β_6	-0.31±0.61	-0.60±0.47	0.30±0.21
A(L) by B(L)	β_{12}	-1.43±0.80	-0.86±0.61	0.43±0.27
A(L) by C(L)	β_{13}	-1.55±0.80	-1.09±0.61	0.65±0.27**
(B)L by (C)L	β_{23}	0.20±0.80	0.35±0.61	-0.25±0.27

**Factores preponderantes sobre las variables de respuesta correspondientes.

*(L): lineal, (Q): cuadrático. "A(L)byB(L)" representa la interacción de los parámetros correspondientes al factor codificado lineal, en este caso A: temperatura, B: [H₂SO₄], y C: tiempo.

Para la comprobación del modelo matemático se realizó un análisis estadístico con los parámetros estadísticos R², gráfica de distribución normal de los residuos y gráfica de valores predichos contra valores observados. Mientras que los factores de mayor significancia sobre las variables de respuesta se determinaron mediante tablas de ANOVA⁵ con la ayuda del software STATISTICA v.10 (ver Anexo B).

En las gráficas de probabilidad normal para cada uno de las variables de respuesta por el modelo (Figura B1, B3 y B5, Anexo B) se aprecia una distribución normal de los residuos ya que se distribuyen normalmente en torno a cero. Por otro lado, las gráficas de valores predichos por el modelo contra valores observados (Figura B2, B4 y B6, Anexo B) muestran que los datos predichos por el modelo y los datos observados se distribuyen aleatoriamente en torno a una

⁵Análisis de Varianza.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

línea de 45°, lo que significa que los modelos representan de manera adecuada los datos experimentales.

Mediante la ANOVA se logró determinar los factores significativos sobre las variables de respuesta estudiadas.

En la tabla ANOVA del modelo de azúcares totales (Tabla B1, Anexo B), se puede deducir que los parámetros estadísticos son buenos ya que se obtiene un valor de $R^2=0.86575$ ($R=0.93$). Así, el modelo tiene una correlación del 86%, y nos indica que hay una relación estrecha entre las variables significativas con la variable de respuesta de acuerdo al coeficiente de correlación (R , Tabla 22).

Por otra parte, al análisis del valor de “F” de Fischer comparado con el valor $F_{critica}$ con una confianza del 95 % nos indica que existe una diferencia del efecto del factor cuadrático de la temperatura (Q) con respecto a los demás, rechazándose la hipótesis nula ($F > F_{critica}$), es decir, esta variable tiene significancia en la generación de azúcares totales. De la misma manera, se obtuvieron los factores de significancia sobre las variables de respuesta de azúcares reductores y LSA (Tabla B2 y B3), siendo para los azúcares reductores el factor de temperatura lineal y cuadrática los de significancia. Para el caso de la LSA, los factores significativos son la temperatura lineal y cuadrática, así como la interacción temperatura-tiempo.

Tabla 22. Parámetros estadísticos del ajuste de los modelos: %A. Totales, %A. Reductores y %LSA.

Modelo	R^2	Err. Std ⁶
% A. Totales	0.866	2.267
% A. Reductores	0.892	1.722
%LSA	0.961	0.764

⁶ Error Estándar del modelo

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una vez comprobado el modelo mediante el análisis estadístico se pueden establecer las ecuaciones matemáticas de cada variable de respuesta acorde a los factores significativos codificados determinados por la ANOVA.

De acuerdo a los factores significativos de la tabla 21 se obtuvieron los siguientes modelos:

$$\%A. \text{ totales} = 13.70 - 4.13 A^2 \pm 2.27$$

$$\%A. \text{ reductores} = 11.95 + 1.79A - 3.36A^2 \pm 1.72$$

$$\%LSA = 0.97 + 2.59A + 1.47 A^2 + 0.65(A)(C) \pm 0.76$$

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE LAS VARIABLES DE RESPUESTA.

Para observar de manera clara el efecto de los factores independientes sobre las variables de respuesta, se elaboraron las superficies de respuesta de cada modelo con la ayuda del software STATISTICA v.10. Para demostrar el efecto de los factores independientes, dos de estos factores se variaron en un cierto rango mientras que el otro factor se mantuvo constante.

Efecto sobre la concentración de A. Totales.

En la figura 25.A y 25.B, se puede observar que la influencia de la temperatura en el rango investigado, 78°C-162°C (-1.68 a 1.68 en el valor codificado), concuerda con lo reportado por otros investigadores. Así, a medida que aumenta el valor de este parámetro a cualquier concentración de H₂SO₄ y tiempo de reacción se favorece la generación de azúcares totales. Hasta un punto en el que cambia esta tendencia, ya que los azúcares comienzan a degradarse a compuestos como el hidroximetilfurfural y furfural (Eckholt, 2011), por lo que se observa una curvatura en la variable temperatura presentando un punto óptimo cercano al valor central.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la figura 25.A, se aprecia el efecto de la concentración de ácido sulfúrico manteniendo constante el factor tiempo. Aquí existe una ligera tendencia de incremento de azúcares totales desde el nivel más bajo hasta el nivel más alto de H_2SO_4 , ya que hay una diferencia promedio de 2.6% entre ambos niveles de azúcares totales. De acuerdo a la Figura 25.A para el valor más bajo de $[H_2SO_4]$ en los puntos centrales de temperatura y tiempo, el valor de azúcares totales corresponde a 12.6% mientras que para el valor más alto de $[H_2SO_4]$ corresponde a 15.2%, por lo que el efecto de este factor no es muy significativo, tal como lo indica el análisis estadístico del modelo.

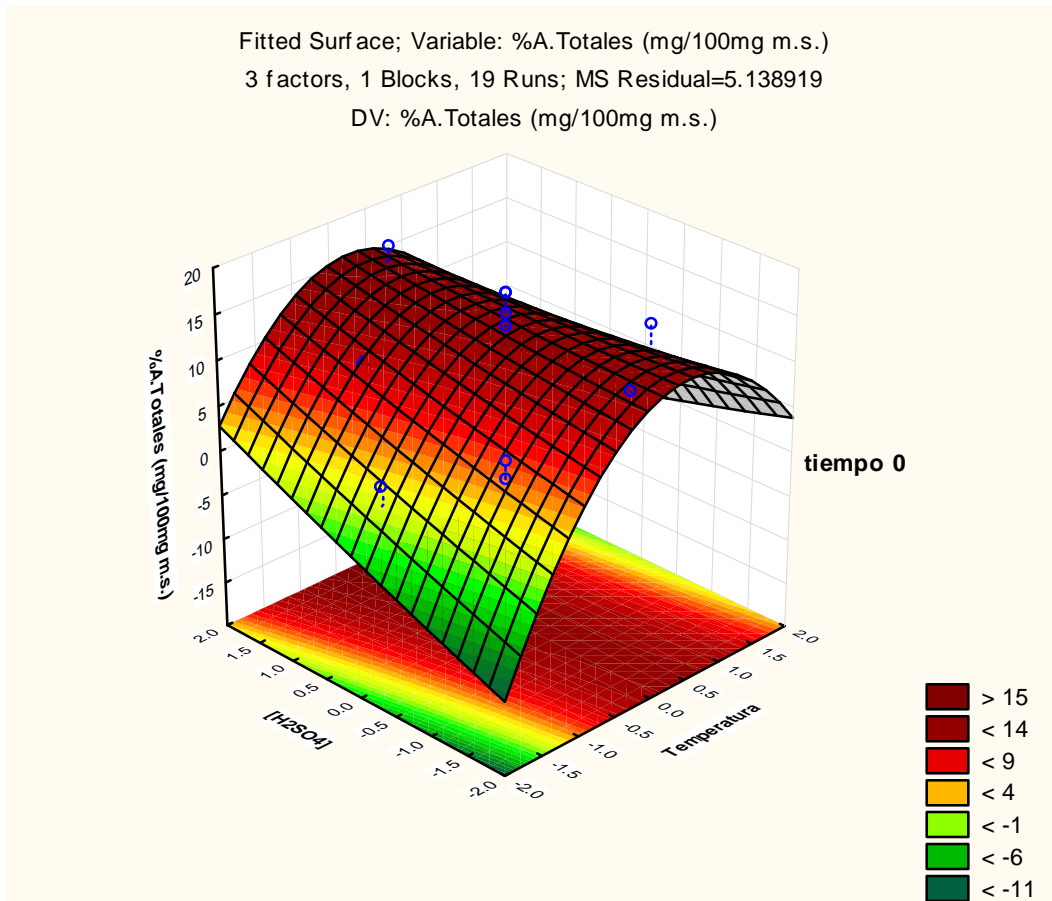


Figura 25.A. Superficie de respuesta de azúcares totales al valor central del tiempo, variando temperatura y $[H_2SO_4]$. Valor central de tiempo: 60 min.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

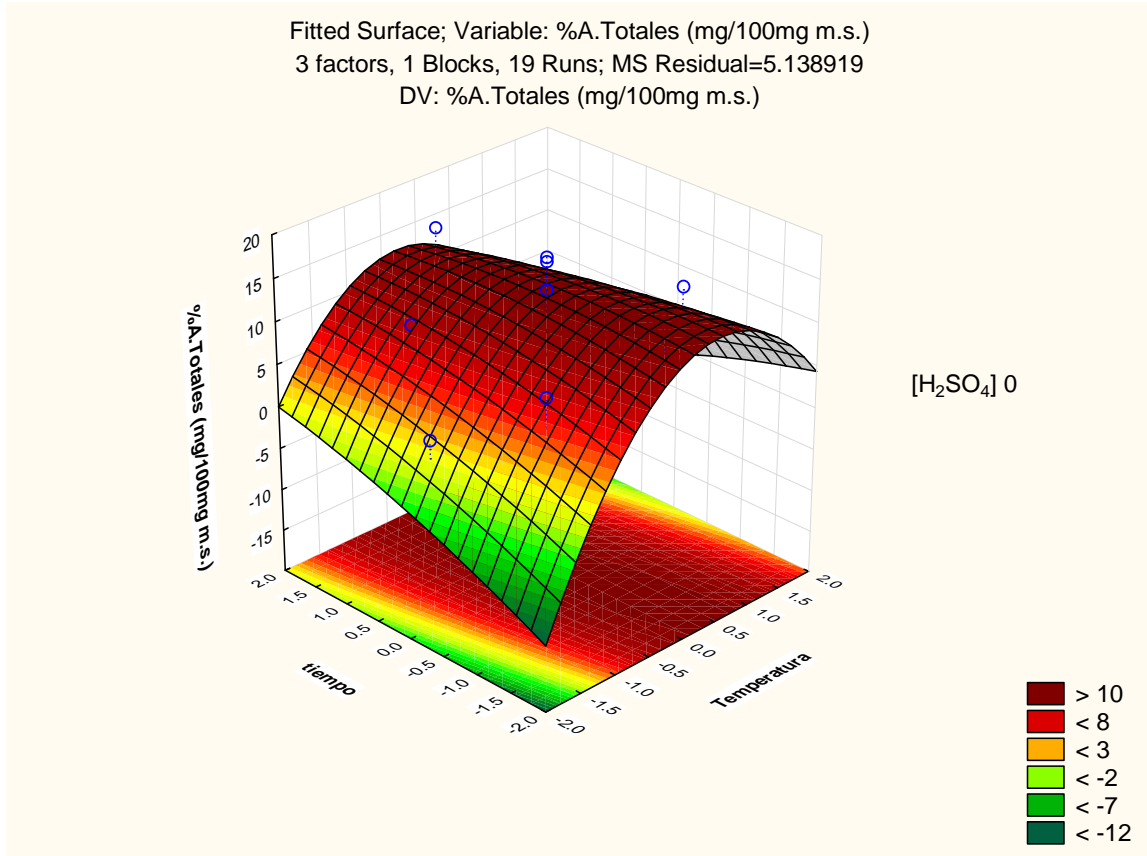


Figura 25.B. Superficie de respuesta de azúcares totales al valor central de [H₂SO₄]. Variando tiempo y temperatura. Valor central [H₂SO₄]: 2% (p/p).

De la misma manera en la figura 25.B se aprecia el efecto del tiempo de reacción en la generación de azúcares totales manteniendo el factor [H₂SO₄] constante en el valor central. La superficie de respuesta muestra que el tiempo favorece la generación de azúcares totales a temperaturas por debajo de su valor central aunque esta diferencia es pequeña, mientras que para valores de temperatura por arriba del valor central se observa el efecto inverso, sin embargo, de la misma manera la diferencia es insignificante. Para valores cercanos al valor central de temperatura este efecto es casi nulo, ya que presenta un valor casi constante en la generación de azúcares totales.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

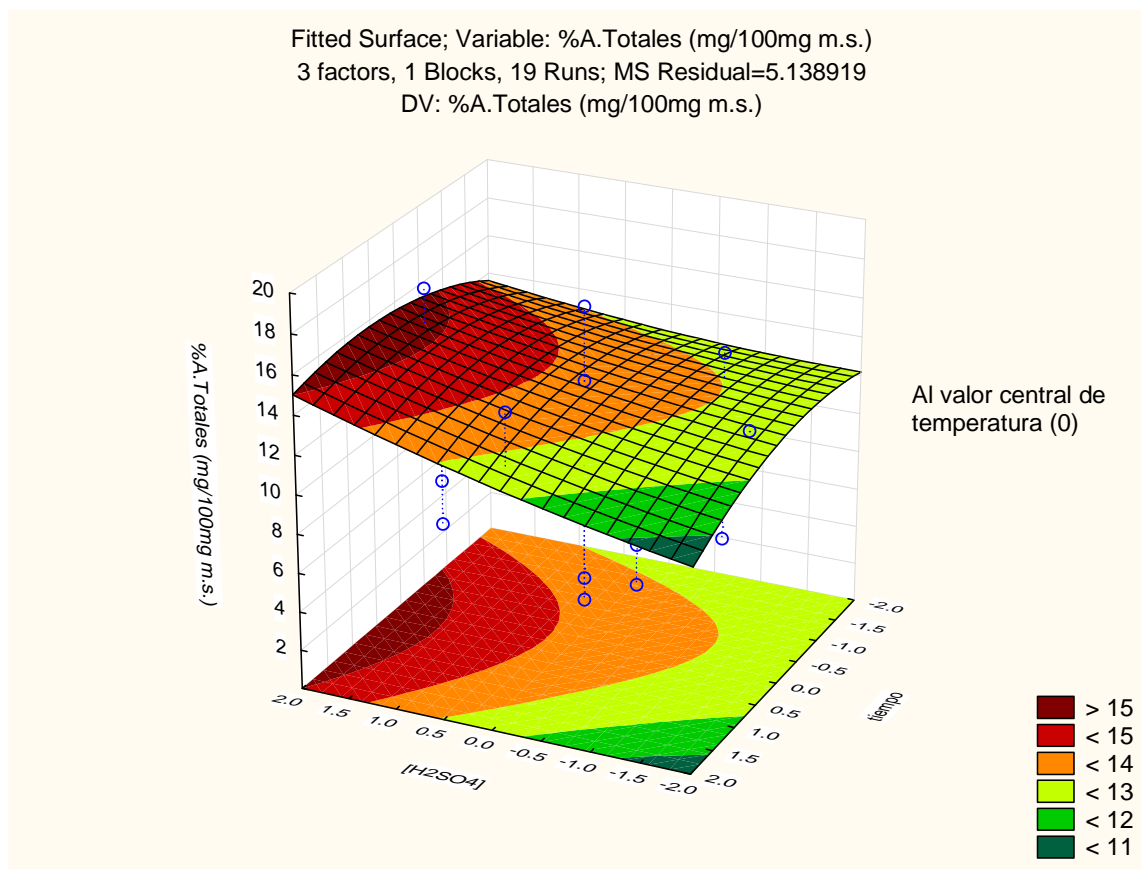


Figura 25.C. Superficie de respuesta de azúcares totales al valor central de temperatura. Variando tiempo y $[H_2SO_4]$. Valor central de temperatura: $120^\circ C$.

En la Figura 25.C, se observa claramente que los factores concentración de H_2SO_4 y tiempo de reacción no tienen un gran efecto significativo en la generación de azúcares reductores.

De acuerdo al análisis de los factores independientes sobre la generación de azúcares totales, la temperatura es el factor que muestra significancia. Así, se tomó el valor central de este factor como el óptimo ya que es donde se aprecia la mayor generación de azúcares totales. Debido a que la concentración de H_2SO_4 y tiempo de reacción no presentan un efecto considerable en la generación de

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

azúcares totales, se decidió establecer el tiempo de reacción en el valor más pequeño por conveniencia, mientras que para la concentración de H_2SO_4 se eligió el valor central, ya que este último presenta un mayor efecto.

Por lo tanto, las condiciones óptimas establecidas para la generación de azúcares totales de acuerdo al análisis del diseño de experimentos son: $120^\circ C$, 1% de $[H_2SO_4]$ y un tiempo de reacción de 26 minutos para obtener un valor predicho de 13% en la generación de azúcares totales.

Efecto sobre la generación de Azúcares Reductores.

La influencia de los factores estudiados sobre la generación de azúcares reductores se muestra en las superficies de respuesta respectivas (Figura 26).

En la Figura 26.A y 26.B se observa que la temperatura, presenta un efecto significativo en la generación de azúcares reductores cuando se mantienen el tiempo y $[H_2SO_4]$ constantes. Se observa que existe un valor máximo muy cercano al punto central presentando una curvatura. Con valores por encima de este punto, es decir, a temperaturas mayores de $120^\circ C$, la generación de azúcares reductores comienza a disminuir, lo que corresponde a lo observado en la literatura, ya que se favorece la degradación de los azúcares (pentosas y hexosas) a compuestos derivados del furfural. En este caso, el tiempo de reacción no presenta un efecto significativo en la generación de azúcares reductores en el rango estudiado (26-94 minutos).

Se detectaron valores de azúcares reductores de 10.61% para el nivel más bajo, 11.95% para el valor central y 9.88% para el nivel más alto a valores centrales de temperatura y concentración de ácido. Por otro lado, el efecto de la concentración prácticamente no influye, ya que se obtiene una diferencia promedio del 2.2% entre el nivel más alto y más bajo en la generación de reductores. Presentando un valor para el nivel más alto, central y bajo de 10.43%, 11.95% y 8.6% respectivamente a valores centrales de temperatura y concentración.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

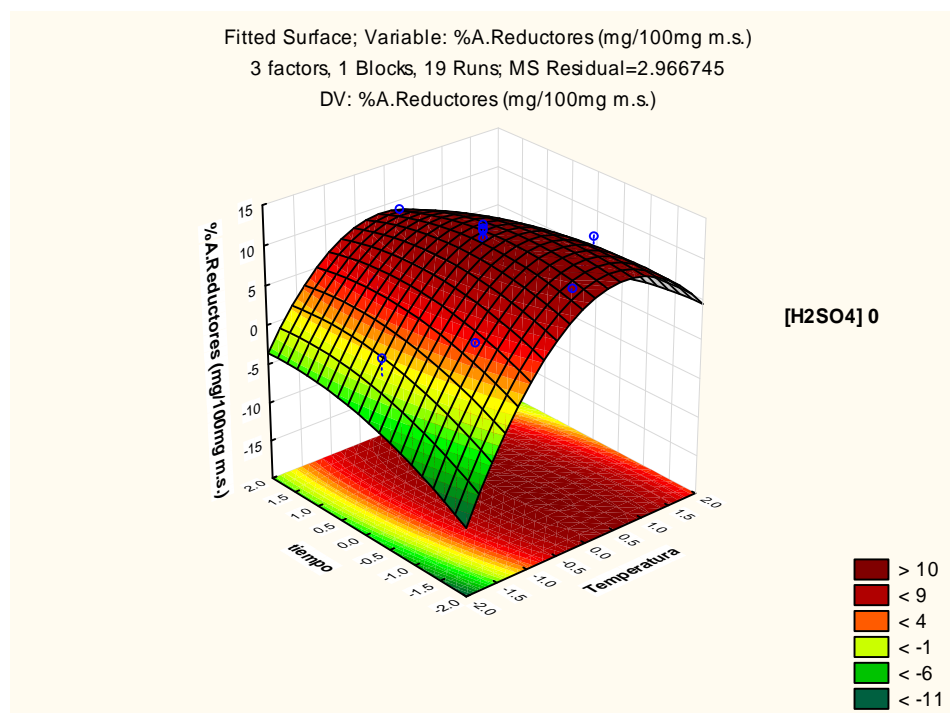


Figura 26.A. Superficie de respuesta de azúcares reductores al valor central de [H₂SO₄]. Variando tiempo y temperatura Valor central [H₂SO₄]: 2% (p/p).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

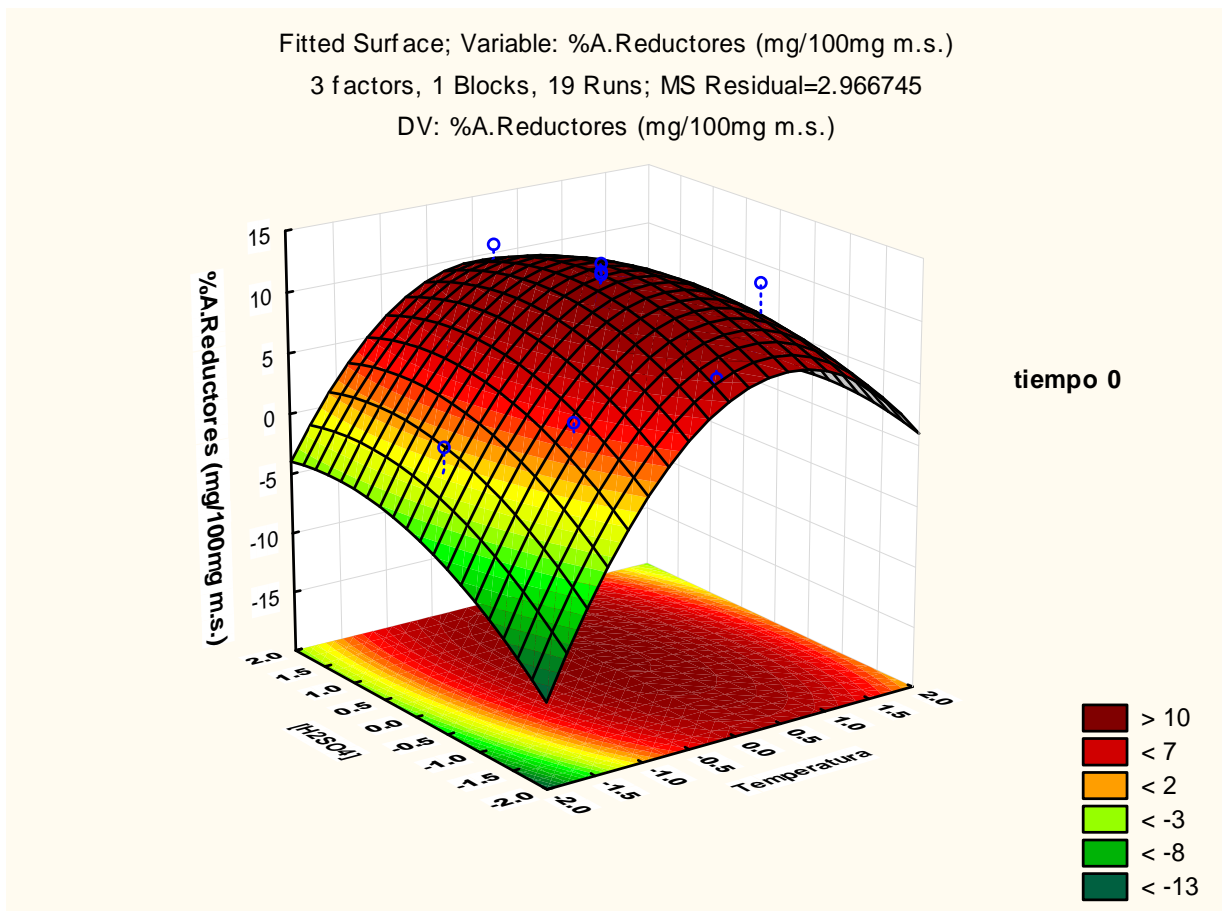


Figura 26.B. Superficie de respuesta de azúcares reductores al valor central de tiempo. Variando [H₂SO₄] y temperatura. Valor central tiempo: 60 min.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

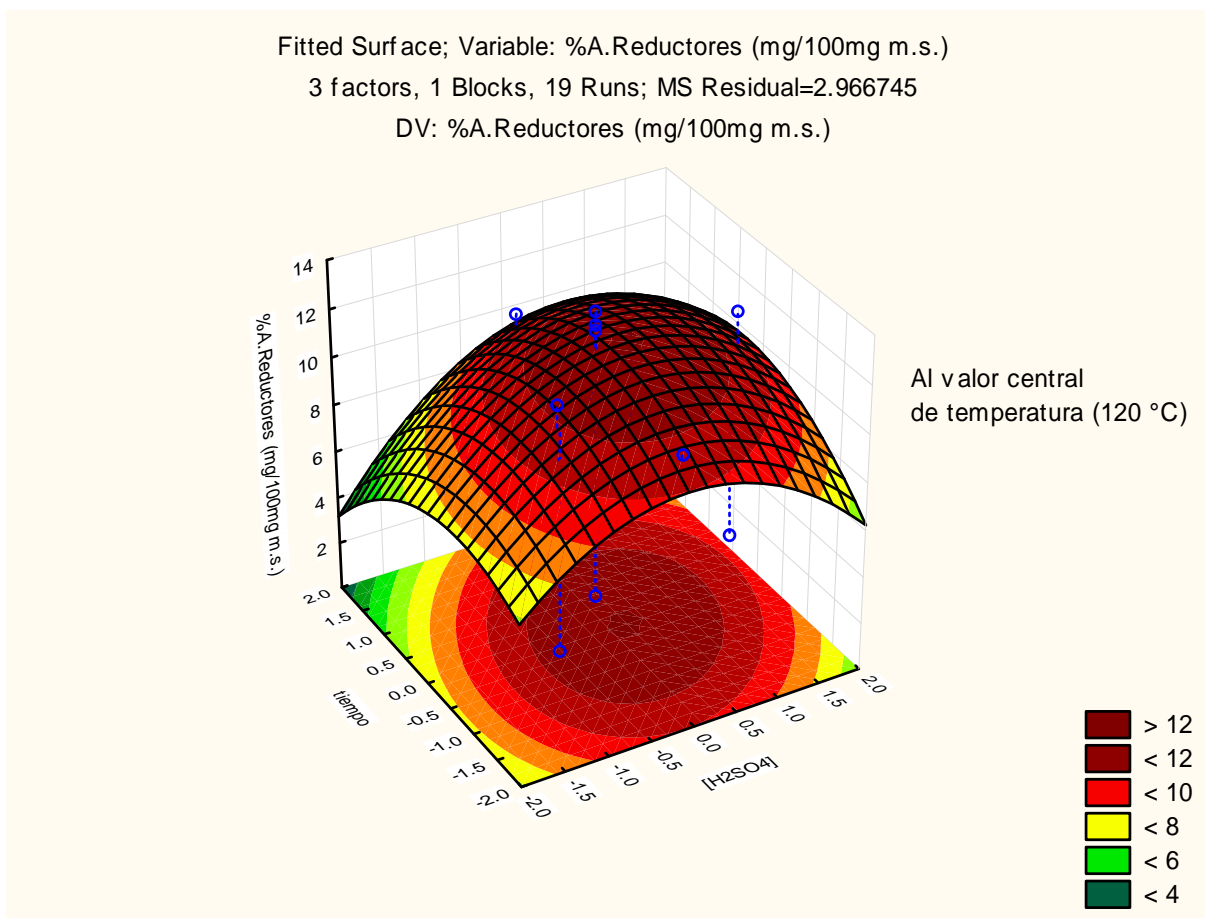


Figura 26.C. Superficie de respuesta de azúcares reductores al valor central de temperatura. Variando tiempo y $[H_2SO_4]$. Valor central temperatura: 120°C.

En la figura 26.C, se observa la influencia de la concentración de ácido sulfúrico ($[H_2SO_4]$) y el tiempo de reacción. Se estima que el efecto de cada una de estas variables no es significativo, ya que se observa que por arriba del 10% de azúcares reductores se abarca la mayor parte del rango de tiempo y concentración estudiado a un mismo nivel, representando un cambio promedio de sólo el 2%.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De acuerdo al análisis de los factores independientes sobre la generación de azúcares reductores, se comprobó la influencia de la temperatura como el factor de significancia tal como se obtuvo del modelo. De acuerdo a este modelo el punto óptimo se presenta a una temperatura de 136°C, 2.1% H₂SO₄ y 40 minutos obteniéndose una concentración del 12% de reductores. Sin embargo, se decidió establecer una temperatura en el valor central, es decir, 120°C, concentración de ácido de 1% y un tiempo de reacción de 26 minutos, obteniéndose una generación de azúcares del 10%. Al observar que no existe un efecto significativo del tiempo de reacción y la concentración, se minimiza considerablemente el tiempo de proceso y la concentración de ácido, sin verse afectada de manera considerable la generación de azúcares reductores.

Efecto sobre LSA.

El modelo establecido para el %LSA nos advierte que además del efecto lineal y cuadrático de la temperatura, existe un efecto positivo por la interacción de la temperatura y el tiempo de reacción. Esta interacción se aprecia en la figura 27.A, en la que se observa que la liberación de LSA aumenta conforme se aumenta el tiempo de reacción y la temperatura. Además de que se aprecia la influencia de la temperatura a valores de tiempo constante.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

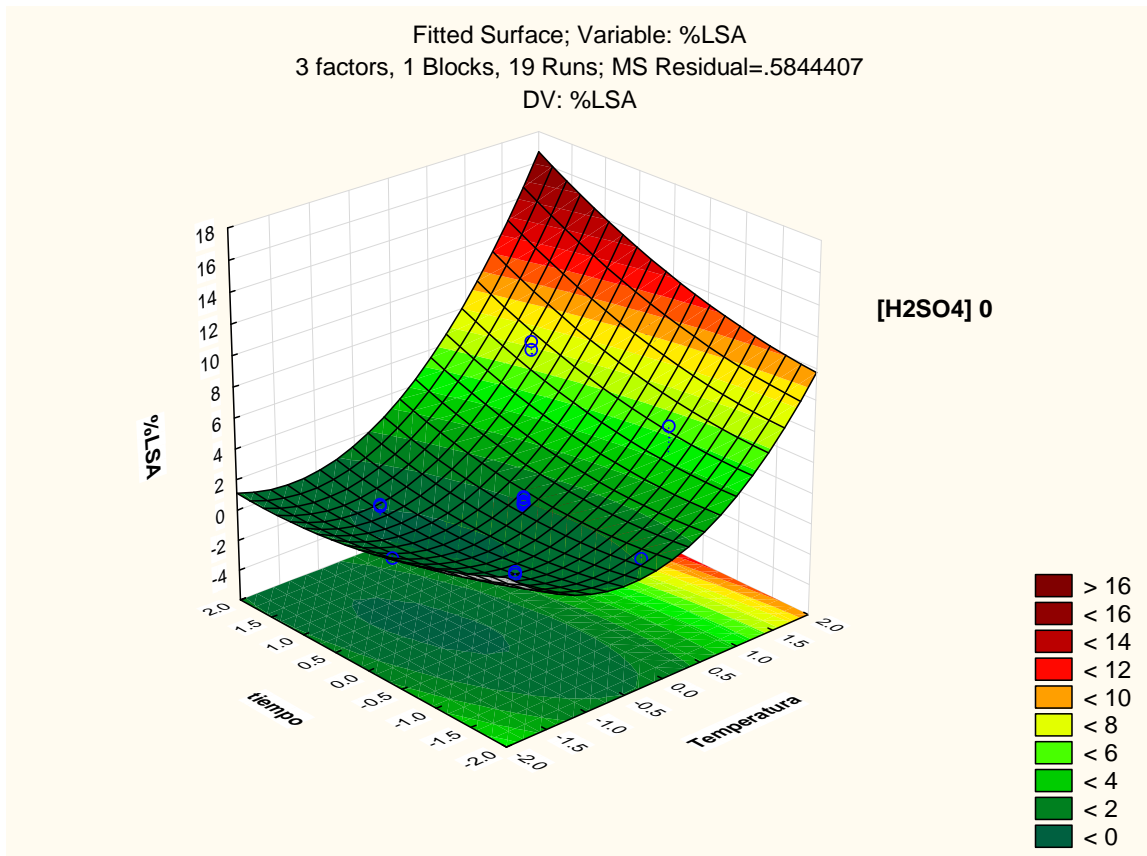


Figura 27.A. Superficie de respuesta de LSA al valor central de [H₂SO₄]. Variando tiempo y temperatura. Valor central [H₂SO₄]: 2% (p/p).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

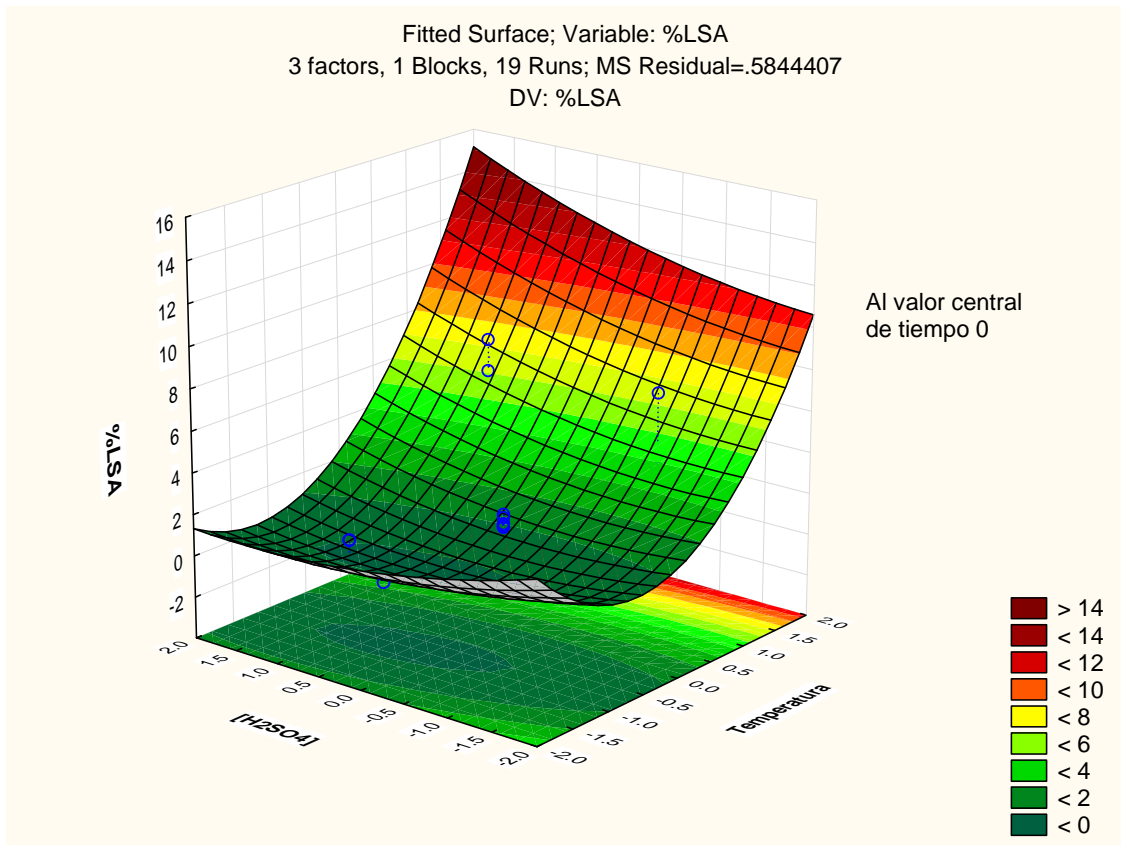


Figura 27.B. Superficie de respuesta de LSA al valor central de tiempo.

Variando $[H_2SO_4]$ y temperatura. Valor central tiempo: 60 min.

Con respecto a la concentración de ácido se aprecia un efecto poco significativo, en la que la concentración comienza a tener un mayor efecto a valores por arriba del punto central de temperatura, aunque este efecto no es muy significativo.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

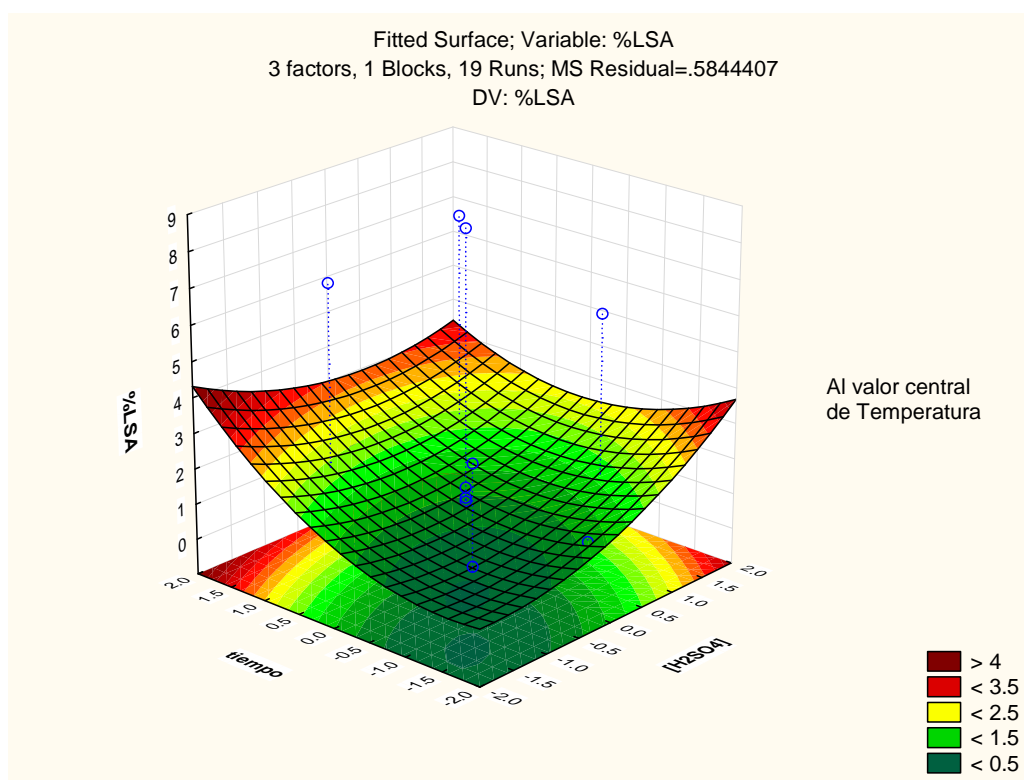


Figura 27.C. Superficie de respuesta de LSA al valor central de temperatura. Variando $[H_2SO_4]$ y tiempo. Valor central temperatura: 120 °C.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

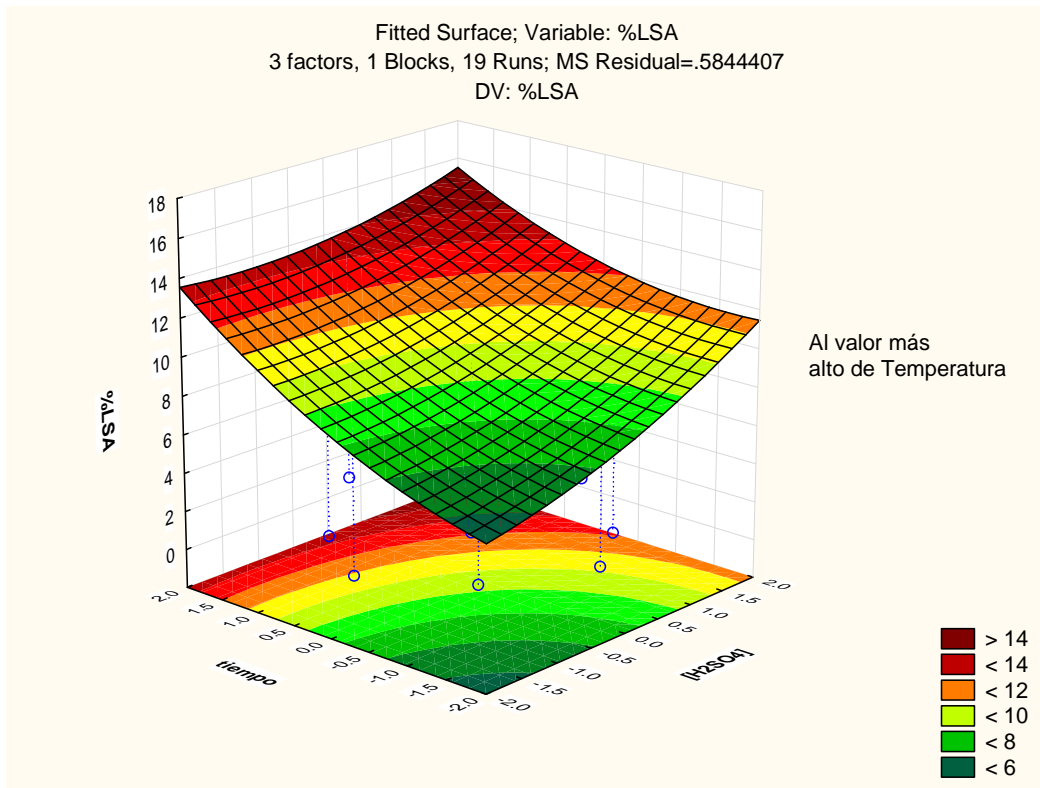


Figura 27.D. Superficie de respuesta de LSA al valor superior de temperatura. Variando $[H_2SO_4]$ y tiempo.

Más claramente se puede apreciar la influencia de la temperatura en la Figuras 27.C y 27.D, donde los factores concentración y tiempo no presentan un efecto importante a temperaturas del valor central para abajo, ya que al valor más alto de temperatura estudiado se triplica la liberación de LSA con respecto al valor central.

El efecto de la temperatura concuerda con lo reportado por otros investigadores, como lo menciona Kang *et al.* (2012) donde se favorece la designificación a altas temperaturas y con condiciones mas severas, la disolucion de lignina se acelera.

Basado en el análisis de los tres factores sobre las variables de respuesta: % Azúcares totales, % Azúcares reductores y % LSA, se decidió establecer las

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

condiciones óptimas del pretratamiento con ácido diluido aplicado a la madera Ixtlán como aquellas que mejoran el rendimiento de azúcares totales y reductores, ya que permite obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables para su conversión a etanol. Por lo que, las condiciones establecidas a partir del diseño de experimentos fueron: temperatura de 120°C, tiempo de reacción de 26 minutos y concentración de ácido sulfúrico de 1% (p/p), obteniendo valores predichos por el modelo en la generación de azúcares totales, reductores y LSA de 12.5%, 10% y 0.60%, respectivamente.

4.3. PRETRATAMIENTOS DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.

Se aplicaron cuatro pretratamientos a la madera Ixtlán con el propósito de favorecer la etapa de hidrólisis enzimática permitiendo mayor acceso de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa para la obtención de azúcares fermentables a etanol. Los pretratamientos aplicados se evaluaron para elegir la ruta de proceso que permita obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables. En la tabla 23 se presentan los resultados obtenidos de la generación de azúcares totales, reductores y lignina soluble en ácido para cada pretratamiento. Cabe mencionar que primero se aplicaron los cuatro pretratamientos a diferentes muestras de biomasa y posteriormente se aplicó el pretratamiento ácido al mismo material con las condiciones establecidas como óptimas en el diseño de experimentos, cuantificando azúcares totales, reductores y lignina en cada paso.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tabla 23. Resultados de los pretratamientos aplicados al material lignocelulósico: % Azúcares Totales, % Azúcares Reductores y %LSA.

Pretratamiento	masa muestra base seca (mg)	%A. Totales (mg/100 mg b.s.)	σ	%A. Reductores (mg/100 mg b.s.)	σ	%LSA
Ác. Óptimo	2000.294	12.183	0.607	10.162	0.171	1.040
NaOH	2298.746	1.595	0.031	1.054	0.042	20.953
Cal	2304.458	1.533	0.038	0.042	0.001	3.262
H ₂ O ₂	3009.337	1.045	0.183	0.198	0.048	4.629
Cal+Pret. Ac.	2302.137	0.864	0.049	0.330	0.015	0.758
NaOH+Pret. Ac.	1601.090	5.902	0.100	3.373	0.216	1.868
H ₂ O ₂ +pret Ac.	1999.964	8.203	0.153	5.055	0.590	0.674

4.3.1 Generación de Azúcares Totales y Reductores en el pretratamiento de madera Ixtlán.

De acuerdo a los resultados observados se obtiene una mayor cantidad de azúcares totales y reductores con el pretratamiento con ácido diluido (Ácido Óptimo) de $12.183 \pm 0.607\%$ y $10.162 \pm 0.171\%$ respectivamente. Esto concuerda con estudios realizados para otros tipos de madera, por ejemplo Lengua y Eucalipto, con las que se obtuvieron rendimientos en azúcares reductores de 15% y 7% respectivamente, a condiciones de 60 minutos, 121°C y 1% de H₂SO₄ para el caso de Lengua, y 121°C, 1.25% de H₂SO₄ y 30 minutos para el Eucalipto (Cortínez, 2010).

En el caso de los demás pretratamientos, se observan valores por debajo del 2%. Esto se puede explicar ya que prácticamente los pretratamientos básicos con NaOH, H₂O₂ y Cal son pretratamientos para deslignificar, modificar la superficie del material y la cristalinidad de la celulosa, mientras que el pretratamiento ácido involucra en mayor medida la solubilización de la hemicelulosa y la celulosa.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una vez que se aplicaron los cuatro pretratamientos, se utilizó la biomasa pretratada con NaOH, H₂O₂ y Cal para la aplicación del pretratamiento con ácido diluido con el propósito de aumentar la cantidad de azúcares fermentables. Los resultados obtenidos muestran que la cantidad de azúcares totales y reductores aumentó para las muestras previamente pretratadas con NaOH y H₂O₂, obteniendo $5.902 \pm 0.100\%$ y $8.203 \pm 0.153\%$ respectivamente, mientras que respecto al pretratamiento con cal el incremento de azúcares fue muy bajo.

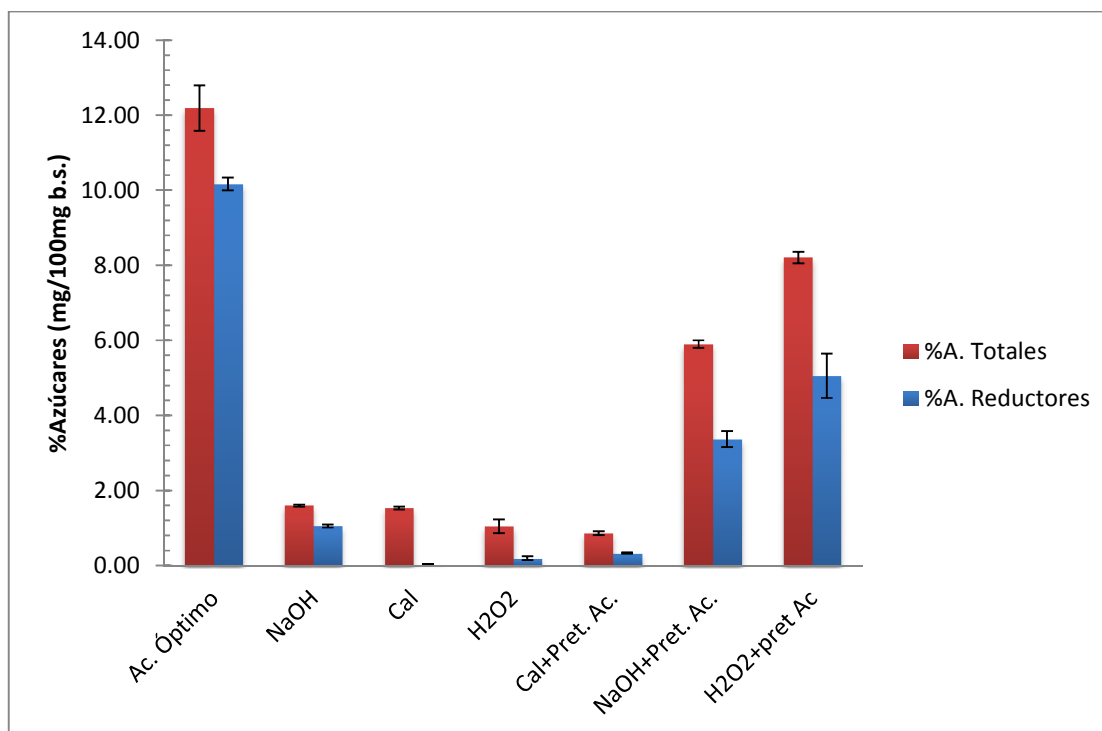


Figura 28. Porcentaje de azúcares totales y reductores en la etapa de pretratamiento al material lignocelulósico con respecto a la biomasa sin humedad.

De esta manera, la mayor cantidad de azúcares fermentables se consiguieron a partir del pretratamiento con ácido diluido. Se obtuvo un líquido que de acuerdo a la literatura está compuesto principalmente por pentosas y hexosas debido a la solubilización de una gran porción de hemicelulosa y un poco de celulosa que es característico de este pretratamiento. Así mismo, este líquido puede ser convertido

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

a etanol por microorganismos específicos, como por ejemplo levaduras *Pichia Stipitis*, *Candida Shehatae* y *Pachysolen tannophiluso* con bacterias entéricas modificadas genéticamente (Cortínez, 2010).

4.3.2 Lignina Soluble

De acuerdo a los resultados se aprecia que el pretratamiento con el que se obtuvo mayor cantidad de lignina soluble fue el pretratamiento con NaOH con el que se consiguió 20.953% de LSA. Este pretratamiento fue el más efectivo en la remoción de lignina ya que es un método para deslignificar. Es muy usado en maderas como es el caso del proceso Kraft en la industria del papel, en el que su mecanismo de reacción se basa en la saponificación de los enlaces éster intermoleculares de las estructuras de la lignina y hemicelulosa.

El segundo mejor pretratamiento de deslignificación fue el pretratamiento básico/oxidante con H_2O_2 ya que también es un proceso para deslignificar aunque en menor medida, aunque cabe mencionar que depende de la naturaleza del material lignocelulósico. En este caso la cantidad de lignina obtenida fue menor que el obtenido con NaOH. La deslignificación mediante este pretratamiento es causada principalmente por la liberación del ion hidroxilo (OH^-) y aniones superóxido (O_2^-) generados como producto de la adición de la solución alcalina de NaOH (Gould, 1984).

El pretratamiento básico con Cal viva (CaO y $CaMgO_2$) fue con el que se obtuvo menor cantidad de lignina soluble, siendo esta del 3.262% de lignina soluble. Esto se debe a la naturaleza recalcitrante del material, ya que el CaO es una base débil comparada con los otros pretratamientos, por lo que este tipo de bases deben tener tiempos de residencia más largos para permitir la ruptura de la estructura de la lignocelulosa (Xu *et al.*, 2012).

De los cuatro, el pretratamiento con ácido diluido fue con el que se obtuvo menor cantidad de lignina soluble. Esto se debe a que este pretratamiento ataca

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

principalmente a la hemicelulosa y celulosa, y sólo modifica la estructura de la lignina sin solubilizarla, por lo que se obtuvo apenas un 1.040% de lignina soluble.

Con la posterior aplicación de la hidrólisis ácida a cada muestra de biomasa sometida a los pretratamientos básicos, se observa que no hubo una gran solubilización de lignina. Obteniéndose valores por debajo del 2%, ya que el pretratamiento ácido no es un gran deslignificador, sino más bien, es un pretratamiento que altera la estructura de la lignina y solubiliza la hemicelulosa y celulosa. Apreciándose este efecto en la generación de azúcares totales y reductores el cual aumenta con respecto a la sola aplicación de los pretratamientos básicos (Figura 29).

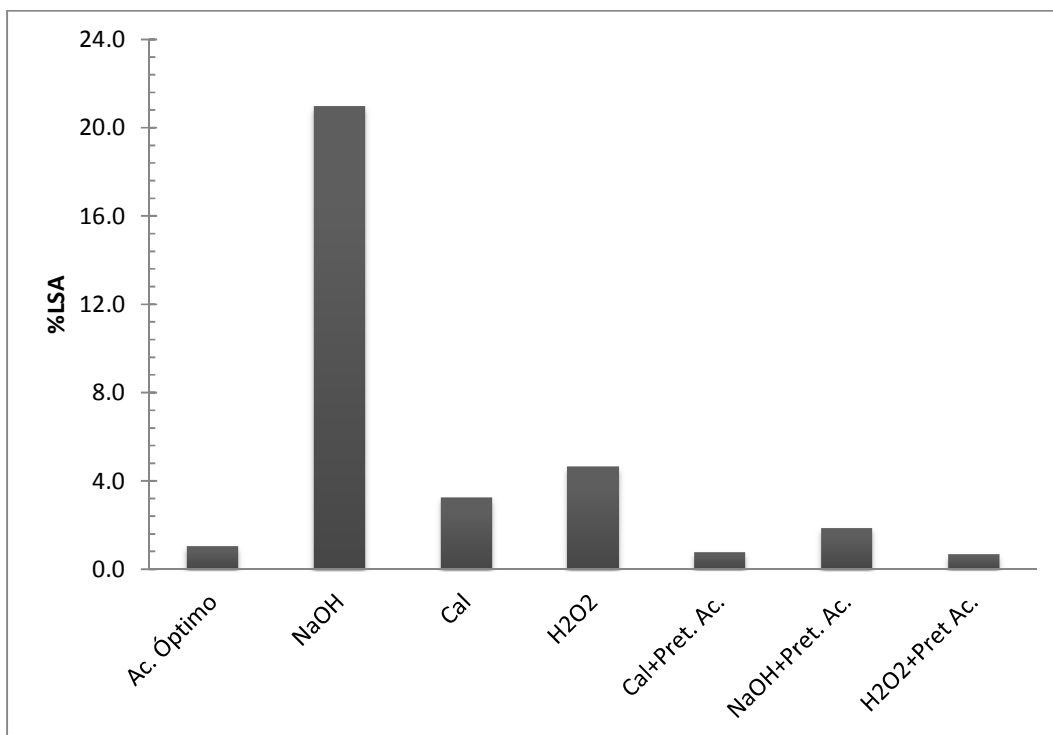


Figura 29. Lignina soluble obtenida en la etapa de pretratamiento del material lignocelulósico.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De acuerdo a los resultados de los pretratamientos se puede deducir que el pretratamiento con NaOH es el más efectivo en cuanto a la deslignificación del material lignocelulósico. Sin embargo, si se desea obtener una mayor cantidad de azúcares fermentables en esta etapa se elegiría el pretratamiento con ácido diluido con el que se obtiene una mayor generación de azúcares ricos en xilosa y un algo de glucosa debido a la hidrólisis de la hemicelulosa y una pequeña fracción de celulosa, ya que una de las ventajas de este pretratamiento es que no sólo solubiliza la hemicelulosa, sino que también la hidroliza, además de que modifica la estructura de la lignina para la posterior etapa de hidrólisis. Además dadas las condiciones bajas de temperatura, se espera que las concentraciones de inhibidores sean bajas.

Por otro lado el pretratamiento con CaO es atractivo a comparación de los demás pretratamientos básicos, debido a que el costo por usar Cal es mucho menor que si se utilizará NaOH, por lo que no se dejaría de lado la aplicación de este pretratamiento, sujeto por supuesto, a los rendimientos de azúcares fermentables obtenidos después de la hidrólisis enzimática.

4.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.

Terminada la etapa de pretratamiento mediante la aplicación de los distintos métodos, se aplicó la hidrólisis enzimática de los sólidos remanentes de cada pretratamiento utilizando dos tipos de cócteles enzimáticos por separado, denominados E6 y E7. Los sólidos utilizados para esta etapa de hidrólisis fueron los obtenidos del pretratamiento ácido y de la combinación de los pretratamientos básicos con la posterior aplicación del pretratamiento ácido, además de la biomasa sin pretratar. Los resultados obtenidos para cada muestra de biomasa pretratada y sin pretratar se muestran en la Tabla 24. Cabe mencionar que a los datos mostrados en la Tabla 24 se restó la cantidad de azúcares reductores y

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

totales asociadas al coctel enzimático, cuantificadas para cada cóctel con la ayuda de un blanco a las condiciones de la hidrólisis (ver Anexo C).

Tabla 24. Azúcares totales y reductores después de 1 hora de hidrólisis enzimática a 50°C y 180 rpm, con cocteles enzimáticos E6 y E7.

Experimento	Hidrólisis enzimática E6				Hidrólisis enzimática E7			
	A. Totales		A. Reductores		A. Totales		A. Reductores	
	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)
Sin pretratamiento	1.992	0.553	0.655	0.070	6.720	0.987	1.129	0.110
Pret. Ác. Ópt.	1.403	0.403	0.119	0.052	7.594	1.664	0.446	0.125
Pret. NaOH	3.566	1.172	1.909	0.698	13.355	0.809	2.832	1.110
Pret. Cal	1.855	1.173	0.418	0.045	10.015	1.759	0.782	0.169
Pret. H2O2	4.718	1.814	1.465	0.046	5.688	1.174	3.545	0.221

*b.s.: base seca

De acuerdo a los resultados obtenidos se aprecia que se obtuvieron mejores resultados utilizando el coctel enzimático E7, lo cual concuerda con lo esperado debido a la naturaleza de este cóctel enzimático que contiene principalmente celulasas encargadas de desdoblar la celulosa en comparación del coctel E6 que contiene xilanasas.

Se aprecia que el pretratamiento con el que se obtuvo mayor cantidad de azúcares totales fue la biomasa pretratada con NaOH obteniendo 13.355±0.809%, sin embargo, se obtuvo una cantidad muy pequeña de azúcares reductores de 2.832±1.110%. En el caso de la generación de azúcares reductores, el pretratamiento con H₂O₂ fue con el que se obtuvo mayor cantidad (3.545±0.221%) aunque este valor también es bajo. En las Figuras 30 y 31 se puede apreciar de manera visual la diferencia entre la generación de azúcares totales y reductores en la etapa de hidrólisis enzimática para cada biomasa previamente pretratada.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

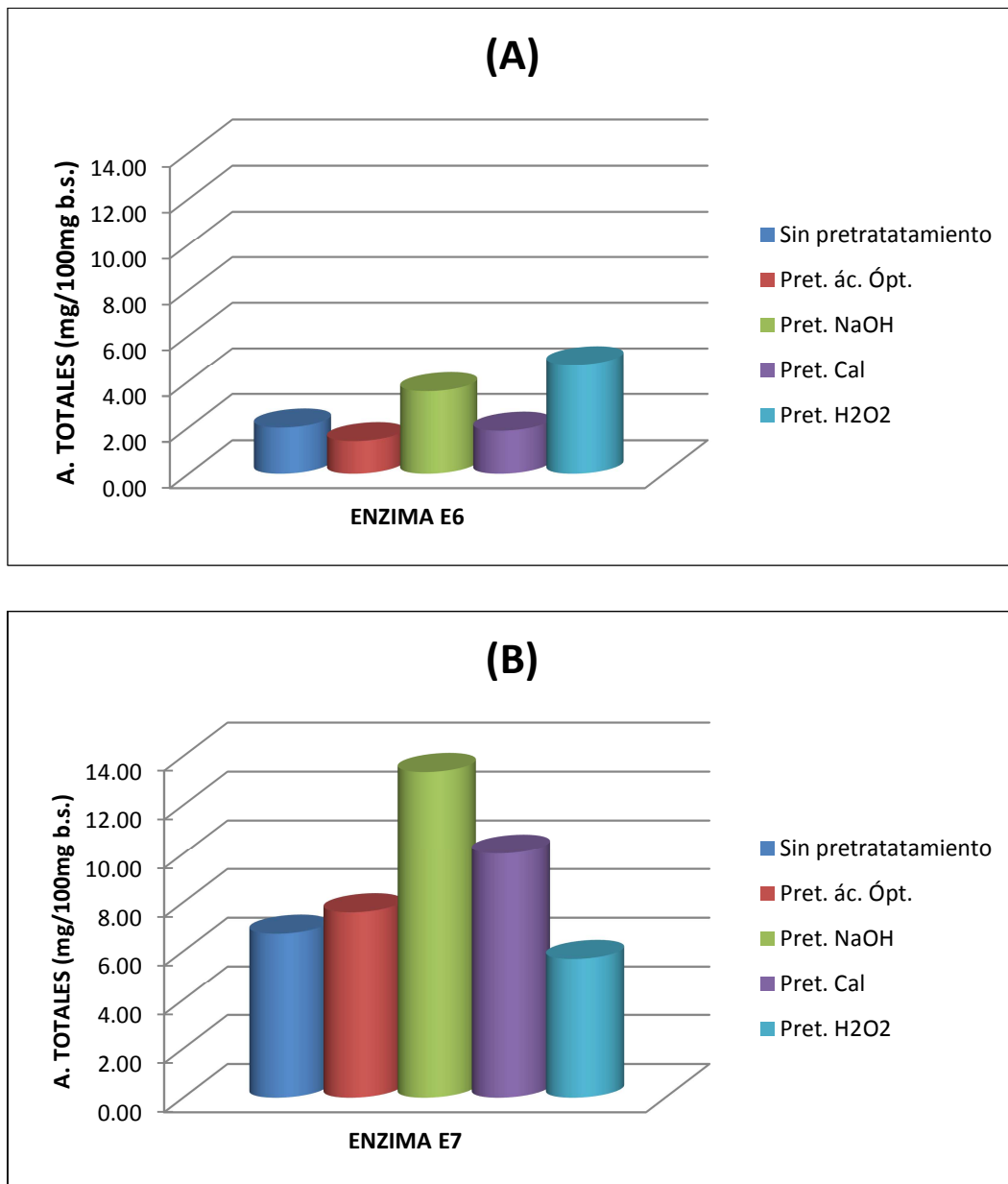


Figura 30. Azúcares totales obtenidos después de la hidrólisis enzimática con (A) coctel E6 y (B) coctel E7.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

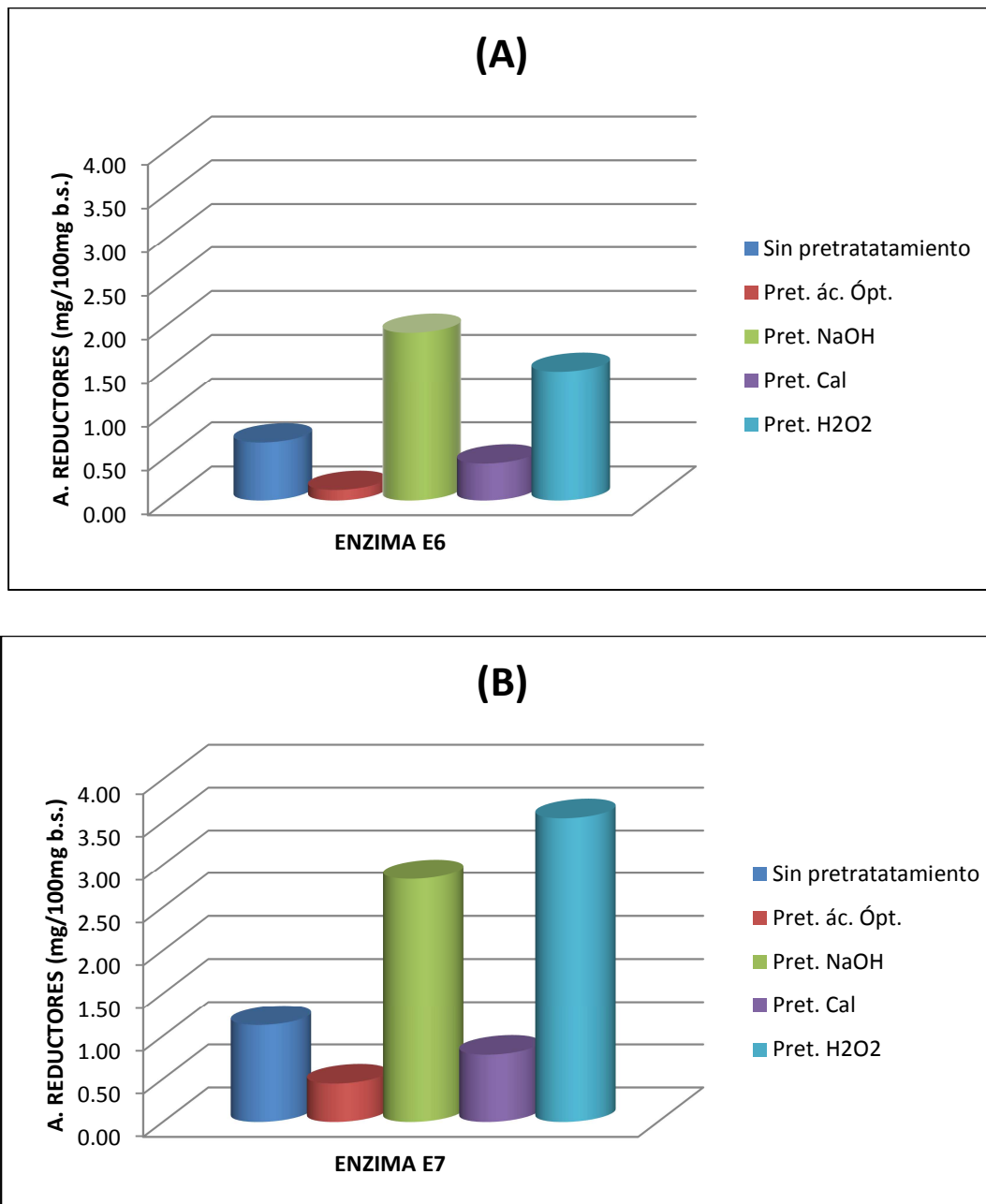


Figura 31. Azúcares reductores obtenidos después de la hidrólisis enzimática con (A) coctel E6 y (B) coctel E7.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para evaluar la eficiencia de la hidrólisis enzimática se determinó el grado de polimerización (DP). El DP está definido como el número de unidades monoméricas en una macromolécula, una molécula oligomérica, un bloque o una cadena (IUPAC, 2011). De esta manera el DP, nos dará una idea de la acción de las enzimas para degradar la celulosa a monómeros, es decir, mientras el DP sea más cercano a 1 se habrá alcanzado un mayor grado de sacarificación para la formación de monosacáridos, que son los que finalmente se podrán fermentar a etanol. En la Tabla 25, se muestra el DP calculado para cada coctel enzimático utilizado como la relación azúcares totales/azúcares reductores obtenidos de la sacarificación de cada una de las muestras de biomasa previamente pretratadas.

Tabla 25. Grado de polimerización (DP) después de la aplicación de la hidrólisis enzimática.

Sacarificación con previa hidrólisis Ácida	DP (A. Totales/A. Reductores)	
	E6	E7
Sin pretratamiento	3.0	6.0
Pret. Ác. Ópt.	11.8	17.0
Pret. NaOH+Ác.	1.9	4.7
Pret. Cal+Ác.	4.4	12.8
Pret. H2O2+Ác.	3.2	1.6

De acuerdo al DP, se puede observar que existe una variación para cada pretratamiento. Por ejemplo, se observa que para el pretratamiento con ácido óptimo se obtienen los DP más altos para ambas enzimas lo que sugiere que las enzimas no están desdoblado por completo la celulosa, por lo que se está obteniendo una gran cantidad de moléculas no monoméricas, esto se puede atribuir a que el pretratamiento no tuvo un gran efecto sobre la estructura de la lignina provocando el difícil acceso de las enzimas a la celulosa. Por otra parte, la sacarificación de la biomasa con pretratamiento con NaOH muestra grados de polimerización más pequeños siendo más cercano a 1 para el coctel enzimático

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

E6 que E7. Sin embargo, la generación de azúcares por E7, cuadruplica los azúcares totales y triplica la generación de azúcares reductores en comparación con E6. De la misma manera que el pretratamiento con H_2SO_4 , el DP para el pretratamiento con Cal muestra DP mayores comparados con el pretratamiento con NaOH, un DP de 4.4 para E6 y 12.8 para E7, lo cual muestra que el acceso de las enzimas hacia la celulosa es insuficiente para desdoblarla a monómeros.

Otro de los pretratamientos con los que se obtuvieron buenos resultados con respecto al DP, es la biomasa pretratada con H_2O_2 la cual muestra DP pequeños, siendo de mayor importancia la sacarificación con E7 ya que es con la que se genera mayor cantidad de azúcares totales y además se obtiene un DP muy cercano a 1.

De esta manera se observa que los pretratamientos que tuvieron mayor efecto en la hidrólisis enzimática fueron las muestras de biomasa pretratadas con H_2O_2 y NaOH ya que se obtuvo la mayor cantidad de azúcares y grados de polimerización más cercanos a 1, que además concuerda con que estos pretratamientos se obtuvieron los mayores valores de deslignificación en la etapa de pretratamiento.

De acuerdo a los resultados, se observa que para algunos pretratamientos no se obtuvieron rendimientos muy altos comparados con el material sin pretratar. Esto se puede explicar debido a las características del material lignocelulósico, ya que pudo haber existido una poca difusión del coctel enzimático dentro de la estructura del material lignocelulósico para su acceso a las cadenas de celulosa, debido a factores como el tiempo de reacción que en este estudio fue de una hora, y además por la recalcitrancia que presentaba el material, ya que estas condiciones de tiempo y cantidad de enzima, fueron determinadas previamente en el equipo de trabajo para materiales lignocelulósicos con menor recalcitrancia como pastos y bagazos.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De esta misma manera, la aplicación de los pretratamientos básicos se basó en las condiciones de operación aplicadas a bagazo de sorgo determinadas por un trabajo previo del equipo de trabajo, el cual resultó ser menos recalcitrante que la madera. Esto también se observó en la estructura de la madera, ya que después de cada pretratamiento no presentaba cambio alguno en su estructura a comparación de otros materiales lignocelulósicos utilizados por el equipo de trabajo, como los pastos que presentaban un cambio en su estructura después de la aplicación de los mismo pretratamientos.

4.5. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC.

Posterior a la etapa de hidrólisis enzimática se realizó la cuantificación y composición de azúcares de los jarabes obtenidos utilizando un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) acoplado a un detector de dispersión de luz evaporativo. La identificación de los azúcares se realizó mediante los tiempos de retención obtenidos del HPLC basándose en curvas estándar, mientras que la cuantificación se realizó mediante curvas patrón previamente preparadas para glucosa, xilosa, sacarosa y celobiosa (Anexo C).

Los valores de los azúcares que se lograron cuantificar se presentan en la Tabla 26. Es importante cuantificar el tipo de azúcares presentes después de la hidrólisis enzimática ya que nos da una idea de qué tipo de azúcares se obtuvieron para determinar la eficiencia de la hidrólisis y por consecuencia la efectividad del pretratamiento, además para determinar qué tipo de fermentación es más adecuada.

En la Tabla 26 se puede observar un ligero incremento en la generación de glucosa en cada pretratamiento para el coctel enzimático E7 con respecto al E6, como era de esperarse debido a la naturaleza del coctel E7. Por otro lado, se observa que se obtienen para algunos casos valores mayores de celobiosa, lo cual indica que las enzimas no realizaron por completo su función, que es

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

desdoblar la celulosa a unidades de glucosa, esto se pudo deber a diversos factores, tales como la recalcitrancia del material, además de que no se observó un cambio visual en la morfología del material después de cada pretratamiento.

Tabla 26. Determinación de azúcares mediante HPLC después de la hidrólisis enzimática.

Biomasa pretratada con:	Coctel	[Glucosa] (mg/100 mg b.s.)	[Celobiosa] (mg/100 mg b.s.)	[Glucosa]+[Celobiosa]	%A. Reductores por DNS	%Lignina Soluble en la etapa de pretratamiento
Sin pretratamiento	E6	0.143	0.353	0.496	0.655	-----
Pret. Ácido		0.063	0.048	0.111	0.119	1.040
NaOH+Pret. Ác.		0.506	0.842	1.348	1.909	22.820
Cal+Pret. Ác.		0.273	ND	0.273	0.418	4.020
H2O2+Pret. Ác.		0.558	0.777	1.335	1.465	5.303
Sin pretratamiento	E7	0.160	0.520	0.679	1.129	-----
Pret. Ácido		0.091	0.323	0.414	0.446	1.040
NaOH+Pret. Ác.		1.548	0.763	2.311	2.832	22.820
Cal+Pret. Ác.		0.357	0.315	0.672	0.782	4.020
H2O2+Pret. Ác.		2.017	1.335	3.352	3.545	5.303

ND: No se logró determinar debido a la baja concentración registrada, ya que salía del rango de las curvas patrón.

Prácticamente no se realizó una buena sacarificación ya que se aprecia que la cantidad de glucosa generada a partir de la celulosa es muy poca, lo cual sugiere que quizá las enzimas no tuvieron un fácil acceso a la celulosa, esto se puede atribuir a que las enzimas celulasas y glucosidasas se pudieron haber quedado absorbidas en la lignina presente que fue degradada parcialmente y que no se presentó una modificación en la cristalinidad de la celulosa debido a que las condiciones no fueron tan severas reflejándose en bajos rendimientos. Por otra parte, se observa que se obtuvieron rendimientos mayores para azúcares totales, por lo que se concluye que las enzimas solo atacaron levemente las cadenas de celulosa generando moléculas de mayor tamaño como son los azúcares que pertenecen a los azúcares totales, sin lograr hidrolizar la celulosa a moléculas más simples como la glucosa y la celobiosa.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.6. BALANCE GLOBAL DEL PROCESO (A. TOTALES, A. REDUCTORES Y LIGNINA).

Para observar de manera global los rendimientos obtenidos a partir de las distintas rutas del proceso, se realizó el balance de masa de lignina soluble, azúcares totales y azúcares reductores, en cada etapa del proceso para obtener el balance global del proceso.

Lignina soluble.

Los resultados globales obtenidos de la lignina soluble en la etapa de pretratamiento se presentan en la Tabla 27. Se puede apreciar claramente en la Figura 32 que la ruta del pretratamiento usando NaOH fue la más efectiva en cuanto la deslignificación ya que se obtuvo un 22.820% de LSA, lo cual era de esperar ya que el principal efecto de este pretratamiento es la deslignificación. Mientras que los pretratamientos siguientes fueron el básico/oxidante con un %LSA de 5.303 y el pretratamiento empleando Cal con un %LSA de 4.020, aunque bien se obtuvo una cantidad mucho menor que con el pretratamiento básico con NaOH. Por último, el pretratamiento con ácido diluido fue con el que se obtuvo menor cantidad de LSA ya que como se sabe el principal efecto de este pretratamiento no es la deslignificación, obteniéndose un valor de 1.040%.

Tabla 27. Balance global de Lignina Soluble.

Experimento	Pretratamiento	Posterior pretratamiento ácido.	Total del proceso
	%LSA	%LSA	%LSA
Sin pretratamiento	----	----	----
Pret. ác. Ópt.	1.040	----	1.040
Pret. NaOH+Ác. Ópt.	20.953	1.868	22.820
Pret. Cal+Ác. Ópt.	3.262	0.758	4.020
Pret. H2O2+Ác. Ópt.	4.629	0.674	5.303

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

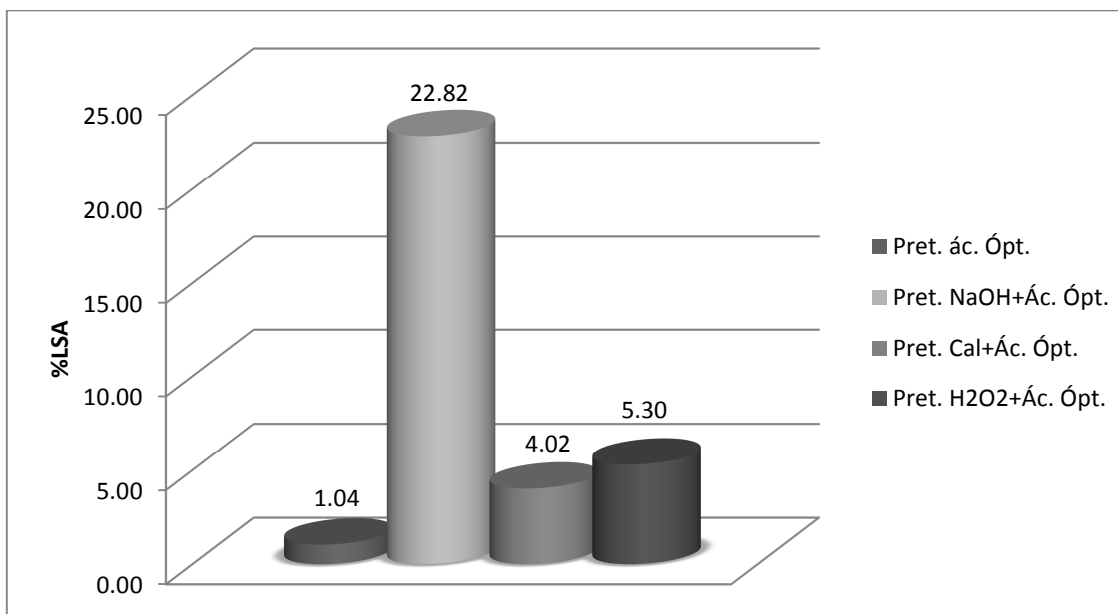


Figura 32. % LSA global del proceso.

AZÚCARES TOTALES.

Respecto a los valores obtenidos de azúcares totales generados (Tabla 28) se puede apreciar en la figura 33 (A) y (B) la generación de azúcares totales obtenidos por las diferentes rutas de pretratamiento e hidrólisis enzimática. Se observa que por la ruta de pretratamiento con ácido diluido y básico/oxidante con posterior hidrólisis enzimática, utilizando el coctel E6, se obtuvo una cantidad de azúcares totales similares de 13.585% y 13.966% respectivamente, estos valores fueron los más altos obtenidos. Mientras que para el pretratamiento con NaOH se obtuvo una generación global de 11.06% y utilizando CaO se obtuvo un rendimiento del 4.252%. Comparando estos valores obtenidos con el de biomasa sin pretratar se obtiene mayor generación de azúcares totales ya que con la biomasa sin pretratar se obtiene un valor del 1.992%.

Por otro lado, se observa que por la ruta E7 se obtuvieron valores mayores, que como se había explicado anteriormente esto se debe a la naturaleza del coctel enzimático. Se aprecia que para esta ruta (Figura 33.B), la mayor cantidad global

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

obtenida fue mediante la ruta del pretratamiento con NaOH y ácido diluido obteniendo valores muy similares de 20.852% y 19.776%. Mientras que, con el pretratamiento con CaO y H₂O₂ se obtuvieron rendimientos de 12.412% y 14.936% respectivamente. Se aprecia que se mejora la generación de azúcares totales para todos los pretratamientos con respecto a la biomasa sin pretratar, ya que se obtiene un valor del 6.720% muy por debajo de los valores obtenidos con el material pretratado.

Tabla 28. Balance global de Azúcares Totales por la ruta del coctel E6 y E7.

Experimento	Etapa de Pretratamiento		Posterior pretratamiento con H ₂ SO ₄		Hidrólisis enzimática E6		Hidrólisis enzimática E7		Total del proceso E6	Total del proceso E7
	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	Conversión (mg/100mg b.s.)
Sin pretratamiento	---	---	---	----	1.992	0.553	6.720	0.987	1.992	6.720
Ác. Óptimo	12.183	0.607	----	----	1.403	0.403	7.594	1.664	13.585	19.776
NaOH	1.595	0.031	5.902	0.100	3.566	1.172	13.355	0.809	11.063	20.852
Cal	1.533	0.038	0.864	0.049	1.855	1.173	10.015	1.759	4.252	12.412
Básico/Oxidante (H₂O₂)	1.045	0.183	8.203	0.153	4.718	1.814	5.688	1.174	13.966	14.936

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

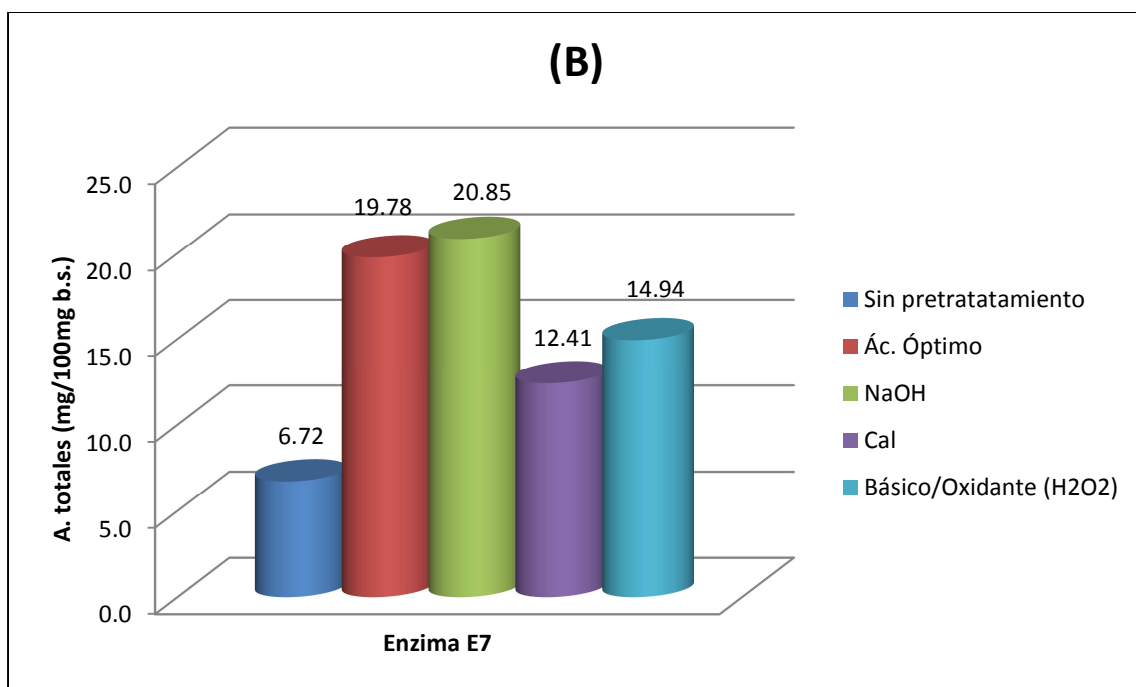
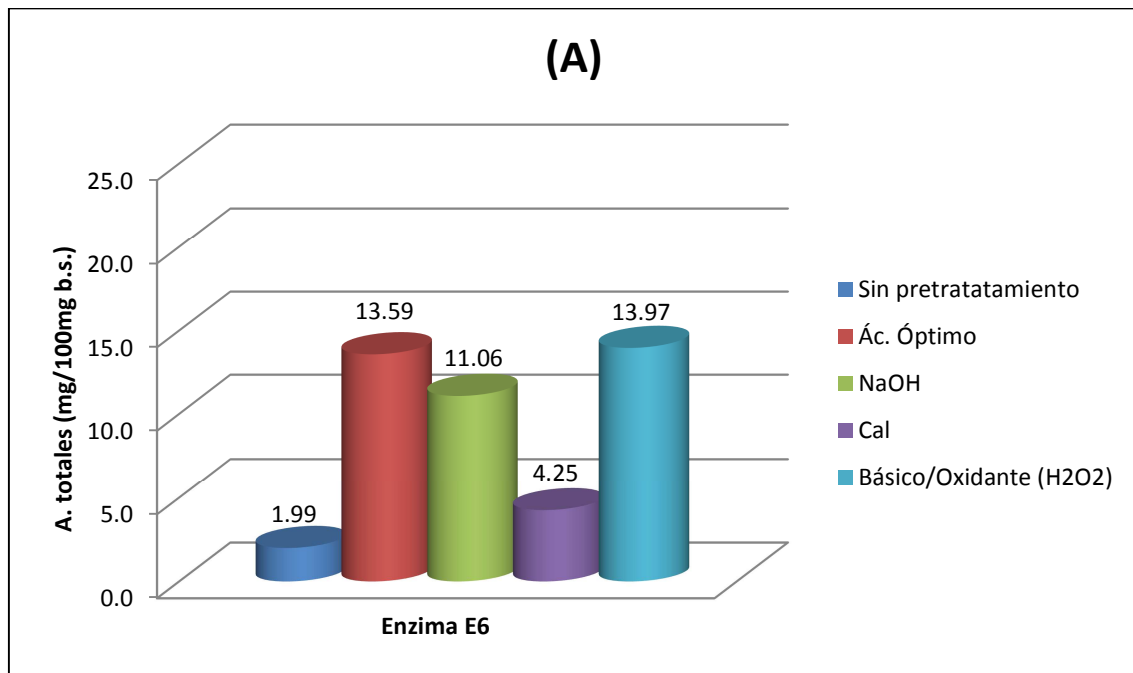


Figura 33. % Azúcares Totales globales del proceso utilizando (A) coctel E6 y (B) coctel E7.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

AZÚCARES REDUCTORES.

Los valores obtenidos para azúcares totales obtenidos en el proceso se presentan en la tabla 29, mientras que en la Figura 34 se aprecia de manera gráfica la cantidad de azúcares reductores en el proceso mediante las diferentes rutas de pretratamiento e hidrólisis enzimática. Además se observa que los mejores resultados se obtienen para la ruta con hidrólisis enzimática utilizando el coctel E7, obteniéndose el mejor resultado para el pretratamiento con ácido sulfúrico presentando un rendimiento del 10.608%, mientras que para los pretratamiento restantes se observa una generación menor de azúcares reductores, obteniéndose valores del 8.799% para el básico/oxidante y 7.259% para el NaOH, y con respecto al pretratamiento con CaO prácticamente la generación de azúcares reductores es muy baja, muy similar al de la biomasa sin pretratar, obteniendo 1.154% comparado con la biomasa sin pretratar de 1.129%.

De acuerdo a estos resultados se observa que hay poca generación de azúcares reductores, lo cual sugiere que quizá se tendrá que usar condiciones más severas o tecnologías más eficientes para facilitar el acceso de las enzimas.

Tabla 29. Balance global de Azúcares Reductores por la ruta del coctel E6 y E7.

Experimento	Pretratamiento		Posterior pretratamiento con H2SO4		Hidrólisis enzimática E6		Hidrólisis enzimática E7		Total del proceso E6	Total del proceso E7
	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	σ (%)	Conversión (mg/100mg b.s.)	Conversión (mg/100mg b.s.)
Sin pretratamiento	----	----	----	----	0.655	0.07	1.129	0.11	0.655	1.129
Ác. Óptimo	10.162	0.171	----	----	0.119	0.052	0.446	0.125	10.281	10.608
NaOH	1.054	0.042	3.373	0.216	1.909	0.698	2.832	1.110	6.336	7.259
Cal	0.042	0.001	0.330	0.015	0.418	0.045	0.782	0.169	0.790	1.154
Básico/Oxidante (H2O2)	0.198	0.048	5.055	0.590	1.465	0.046	3.545	0.221	6.718	8.799

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

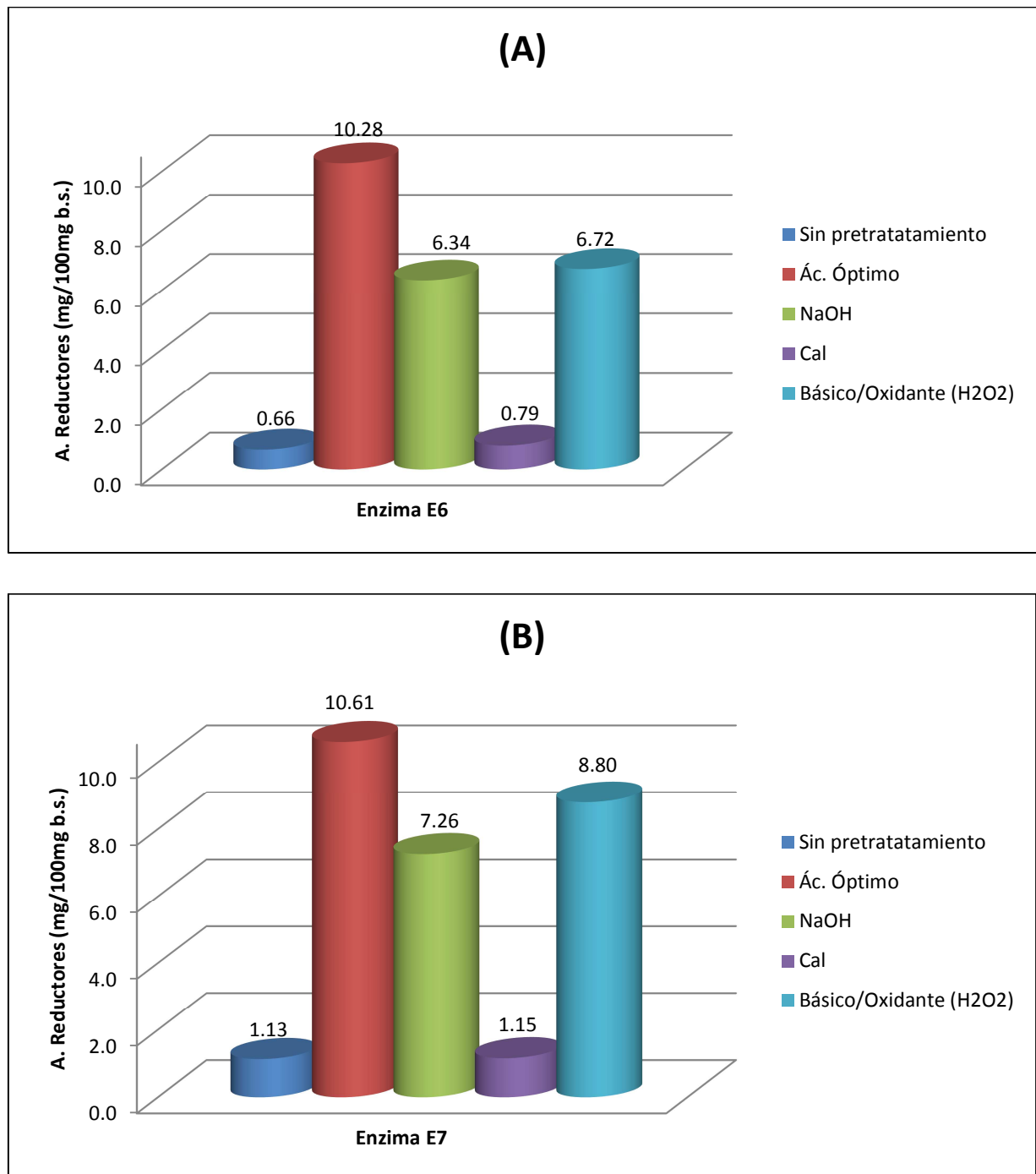


Figura 34. % Azúcares Reductores globales del proceso utilizando (A) coctel E6 y (B) coctel E7.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede deducir que el pretratamiento con CaO es el menos eficiente, ya que la generación de azúcares reductores para este pretratamiento fue muy baja. Por otro lado, se deduce que los pretratamientos con ácido, NaOH y básico/oxidante presentaron una mejor generación de azúcares reductores y totales, aunque bien, los rendimientos no fueron altos.

Sin embargo, cabe mencionar que sería una buena comparación la sola aplicación de los pretratamientos básicos con posterior hidrólisis enzimática, ya que en este trabajo sólo se aplicó la hidrólisis enzimática a la biomasa pretratada con los pretratamientos básicos y post pretratamiento ácido. Además, que la aplicación de pretratamientos básicos con post pretratamiento ácido genera una disminución de azúcares comparada con la sola aplicación del pretratamiento ácido, lo cual se puede explicar debido a que las bases utilizadas de alguna manera pudieron neutralizar moléculas de H₂SO₄ debido a la porosidad de la madera, disminuyendo la concentración del ácido y por consecuencia la liberación de azúcares.

Comparando la etapa de hidrólisis enzimática se logró determinar que el coctel E7 fue con el que se obtuvieron mejores resultados con respecto al coctel E6, lo cual concordó con lo esperado.

De acuerdo a trabajos realizados previamente a maderas, como la aplicación del pretratamiento ácido a una muestra de madera de *pinus radiata* a 170°C, 54 minutos y 1.2% de ácido mostró un rendimiento de 10.4% de azúcares reductores (Eckholt, 2011), y un trabajo realizado por Cortínez (2010) mostró que las mejores condiciones con ácido diluido para chips de Lenga fueron 1% de ácido, 60 minutos de reacción y 120°C, obteniendo un rendimiento de 15.3%, y para Eucalipto 1.25%, 30 minutos y 120°C, obteniendo 7.2% de reductores. Mientras que en la etapa de hidrólisis enzimática obtuvo un rendimiento de 12.5% para Lenga y 23.9% para Eucalipto con un tiempo de hidrólisis de 76 horas.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Por lo tanto, la mejor ruta para la generación de azúcares totales de acuerdo a los pretratamientos estudiados y resultados obtenidos fue aplicando el pretratamiento ácido bajo las condiciones del diseño de experimentos, y la posterior aplicación de la hidrólisis enzimática utilizando el coctel enzimático E7 obteniendo un rendimiento global de 19.78% de azúcares totales y 10.61% de azúcares reductores. Aunque bien, los resultados aplicando el pretratamiento con NaOH y con posterior pretratamiento ácido fueron similares, esto implica la aplicación de una etapa más, sin observarse un incremento significativo en la generación de azúcares. De esta manera, los azúcares provenientes de la celulosa (hexosas) y hemicelulosa (pentosas) pueden ser eficientemente usados mediante una fermentación separada.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.

5. CONCLUSIONES.

1. Se logró caracterizar al material forestal obteniendo un contenido de azúcares totales de $65.87 \pm 2.93\%$, azúcares reductores de $66.57\% \pm 0.63\%$, y un $32.26\% \pm 1.03\%$ de lignina. Clasificándola dentro de las maderas blandas por su alto contenido de lignina. Debido a su gran contenido de azúcares fermentables, puede ser un buen sustrato para la obtención de etanol de segunda generación.
2. El factor temperatura en la aplicación del diseño de experimentos para el pretratamiento con H_2SO_4 es el que representó un efecto significativo en la generación de azúcares, mientras que los factores concentración y tiempo no presentaron una significancia a 95% de confianza. Las condiciones óptimas determinadas fueron: $120\text{ }^\circ\text{C}$, $[H_2SO_4]$ de 1% (p/p) y 26 minutos de reacción, obteniendo un rendimiento de 12.5% de azúcares totales, 10% de azúcares reductores y 0.60% de LSA respectivamente.
3. Se determinaron los tipos de azúcares presentes en la fracción líquida después de la sacarificación enzimática mediante HPLC, dentro de los cuales se logró cuantificar glucosa y celobiosa, mientras que también se identificó fracciones de xilosa, sin embargo, no se logró cuantificar debido a la poca concentración presente.
4. Todos los pretratamientos presentaron un aumento en la generación de azúcares respecto a la biomasa sin pretratar.
5. En la etapa de pretratamiento se obtuvo una mayor generación de azúcares con el pretratamiento ácido diluido, mientras que el mejor pretratamiento para deslignificar fue empleando NaOH.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.

6. El cóctel E7 fue más efectivo que el cóctel E6 empleado en la etapa de hidrólisis enzimática.
7. La mejor ruta obtenida fue empleando el pretratamiento con ácido sulfúrico y posterior hidrólisis enzimática empleando el coctel E7, con la cual se obtuvo una generación global de 19.78% de azúcares totales y 10.61% de azúcares reductores, obteniendo la mayor cantidad de azúcares reductores en la etapa de pretratamiento. Mientras que por la ruta con el pretratamiento con NaOH post pretratamiento ácido sulfúrico presentaron rendimientos similares de 20.85% de azúcares totales y 7.26% de reductores obteniéndose la mayor cantidad de azúcares en la etapa de hidrólisis, sin embargo, por emplearse una etapa más en esta ruta se eligió el pretratamiento con ácido sulfúrico.
8. Sería interesante la comparación de los rendimientos obtenidos en este trabajo con la aplicación de tecnologías como la explosión con vapor o líquidos iónicos, ya que se ha probado que son muy efectivos para materiales como la madera.

BIBLIOGRAFÍA

Barrera, I., Aburto, J., & Gualo, N. (2013). *Manual de técnicas analíticas para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos*. Instituto Mexicano del Petróleo.

Barreto, S. (2008). Tesis de Grado. *Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del Macromiceto Grifola Frondosa*. Manizales, Colombia.

Béguin, P., & Aubert, J.-P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 25-58.

Bjerre, A. B., Olesen, A. B., Fernqvist, T., & Plöger, A. (1996). Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 568-577.

Cortínez, V. (Enero de 2010). COMPARACIÓN DE PRETRATAMIENTOS EN RESIDUOS FORESTALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN: HIDRÓLISIS ÁCIDA Y LÍQUIDOS IÓNICOS.

Cuervo, L., Folch, J. L., & Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *BioTecnología*, 11-25.

Cunningham, R. E., & López, G. D. (1994). *Etanol de lignocelulósicos: Tecnologías y Perspectivas*. Santiago: Servicio de publicaciones e intercambio científico.

Duarte, V. M. (Marzo de 2010). *Recomendaciones de especificaciones técnicas para el etanol y sus mezclas (E6) y la infraestructura para su manejo en México*. Obtenido de SENER: <http://www.sener.gob.mx>

Eckholt, M. (2011). *Utilización de la madera de P. radiata para producción integrada de etanol y pulpa de celulosa Kraft blanqueada*. Tesis de maestría, Minas Geiras, Brasil.

Ferré, J. (2004). El Diseño factorial completo 2k. *Técnicas de laboratorio*, 292, 430-434.

Fonseca da Silva, T. (2011). *Utilización de la madera de P. radiata para producción integrada de etanol y pulpa de celulosa Kraft blanqueada*. Minas Geiras, Brasil.

Gould, J. M. (1984). Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioeng.*, 46-52.

Guzmán, N. (2012). *Pretratamiento de bagazo de gramíneas para el incremento de azúcares reductores fermentables a etanol*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.

BIBLIOGRAFÍA

I. Shifter, M. V.-S. (2001). Environmental Implications on the Oxygenation of Gasoline with Ethanol in the Metropolitan Area of Mexico City. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 35(10), 1893-1901.

International Energy Agency (IEA). (2007). *IEA Energy Technology Essentials: Biofuel Production*. Obtenido de <http://www.iea.org>

Kang, N., Liu, Z., Hui, L.-F., Si, C.-L. L., Zhao, T., & Mao, S.-T. (2012). Study on the optimum process of acid-catalytic ethanol pretreatment of chinese triploid poplar to enhance sugar recovery by hydrolysis. *BioResources*, 578-592.

Lynd LR, C. J. (1991). Fuel ethanol from celulosic biomass. *Science*.

M. Camps Michelena, M. M. (2008). *Los biocombustibles*. Madrid, España: Mundi Prensa Espanha.

Machado, C. M. (2010). *Situación de los biocombustibles de 2da y 3ra generación en América Latina y Caribe*.

Maciel, C. Á. (2009). Biocombustibles: Desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, 63-89.

Monteiro, C. (2010). *Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Organización Latinoamericana de Energía (OLADE).

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., y otros. (2005). Features of promising technologies for pretreatment. *Bioresource Technology*, 673-686.

OECD-FAO Agricultural Outlook 2011. (s.f.). Recuperado el 23 de Febrero de 2013, de <http://www.oecd.org>

PEMEX Refinación. (s.f.). *Octanaje*. Recuperado el 24 de Febrero de 2013, de <http://www.ref.pemex.com/>

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Rubia, T. d., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose. *International microbiology*, 53-63.

Plasun, R. (Juni de 1999). *Optimization of VLSI Semiconductor Devices*. Dissertation, Technische Universität Wien, Viena.

Renewable Fuels Association (RFA). (s.f.). Recuperado el 15 de Febrero de 2013, de <http://www.ethanolrfa.org/>

Renewable Fuels Association. (15 de Febrero de 2013). *2013 Ethanol Industry Outlook*. Obtenido de <http://www.ethanolrfa.org/>

BIBLIOGRAFÍA

Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature Reviews*, 841-845.

Rutz, D., & Janssen, R. (Enero de 2008). *Biofuel Technology Handbook*.

SAGARPA. (2009). *Programa De Producción Sustentable De Insumos Para Bioenergéticos Y De Desarrollo Científico Y Tecnológico. 2009-2012*. Recuperado el 20 de Febrero de 2013, de <http://www.sagarpa.gob.mx>

Sánchez Riaño, A., Gutiérrez Morales, A. I., & Muñoz Hernández. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales. *Tumbaga*, 1(5), 61-91.

Sánchez, Ó. J., & Cardona, C. A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 671-678.

Sluiter, A., & Hames, R. R. (April de 2008). National Renewable Energy Laboratory. *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. U.S.

Suffet, I. (2007). A re-evaluation of the taste and odour of methyl tertiary butyl ether (MTBE) in drinking water. *Water Sci Technol*, 55, 265-273.

Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). Acid-Based Hydrolysis Processes For Ethanol From Lignocellulosic Materials: A Review. *BioResources*, 472-499.

U.S. Department of Energy, E. E. (s.f.). Recuperado el 24 de Febrero de 2013, de <http://www.afdc.energy.gov>

Unión Europea. (s.f.). *Síntesis de la legislación de la UE*. Recuperado el 16 de Febrero de 2013, de <http://europa.eu>

Vázquez, T. R. (2012). *EVALUACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BAGAZO DE SORGO PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A ETANOL Y EFECTO DE DIFERENTES PRETRATAMIENTOS*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.

Wackett, L. P. (2007). Microbial-based motor fuels: science and technology. *Society for Applied Microbiology*, 211-225.

Xu, J., Zhang, X., & Cheng, J. (2012). Pretreatment of corn stover for sugar production with switchgrass-derived black liquor. *Bioresource Technology*, 255-260.

Zheng, Y. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL ENGINEERING*, 2(3), 51-68.

ANEXO A.

ANEXO A. CARACTERIZACIÓN MADERA IXTLÁN Y CURVAS PATRÓN.

Tabla A1. Caracterización de azúcares totales. Madera Ixtlán.

No. Muestra	masa muestra (mg)	masa muestra base seca (mg)	No. Tubo	Absorbancia	Azúcares totales (mg)	%Azúcares totales (mg/100 mg b.s.)
1	300.0	280.94	1	0.209	197.347	70.245
			2	0.192	180.000	64.071
2	303.5	284.22	1	0.196	184.082	64.768
			2	0.195	183.061	64.409

Promedio	σ
65.87	2.93

Tabla A2. Caracterización de azúcares reductores. Madera Ixtlán.

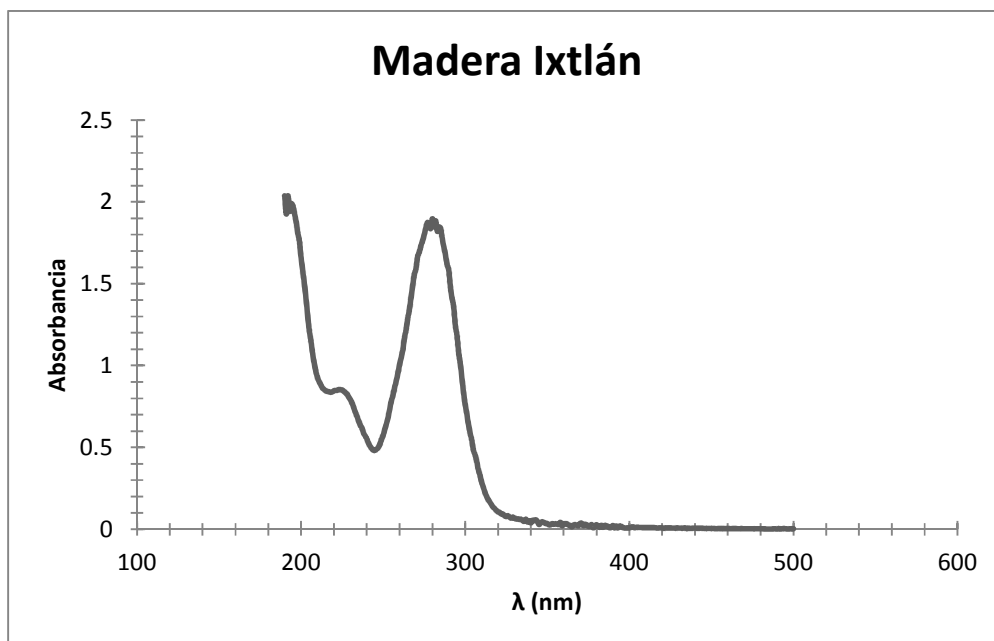
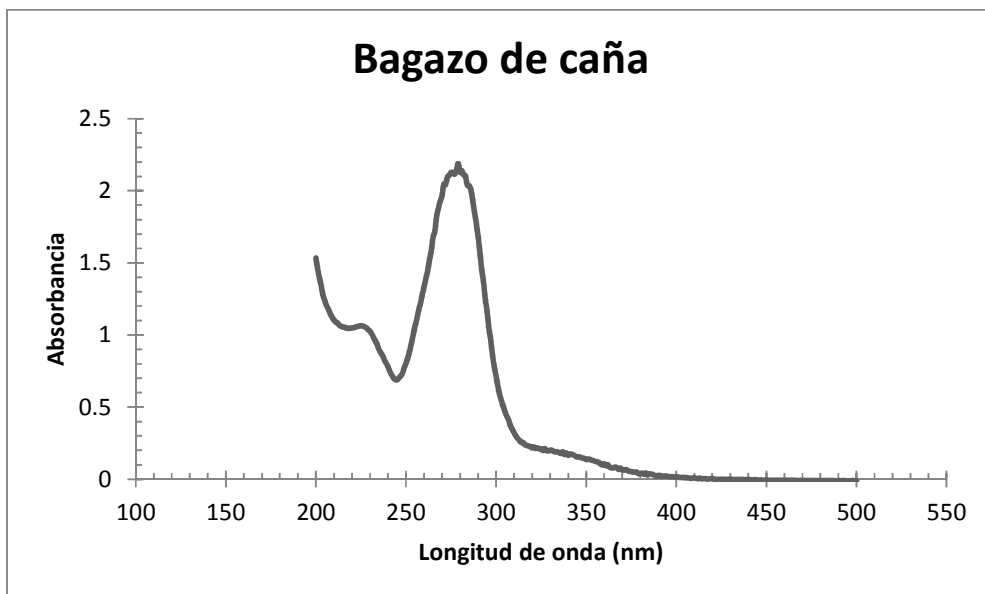
Muestra	masa muestra (mg)	masa muestra base seca (mg)	No. Tubo	Absorbancia	Azúcares reductores (mg)	% Azúcares reductores (mg/100 mg b.s.)
1	300.0	280.94	1	0.244	184.71	65.75
			2	0.250	189.00	67.27
2	303.5	284.22	1	0.251	189.71	66.75
			2	0.250	189.00	66.50

promedio	σ
66.57	0.63

ANEXO A.

PERFILES DE LIGNINA

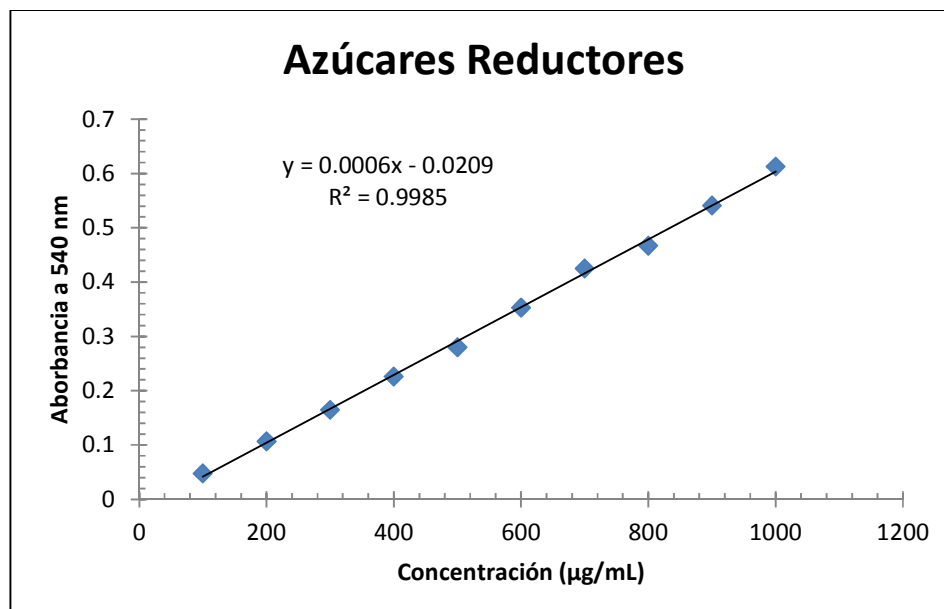
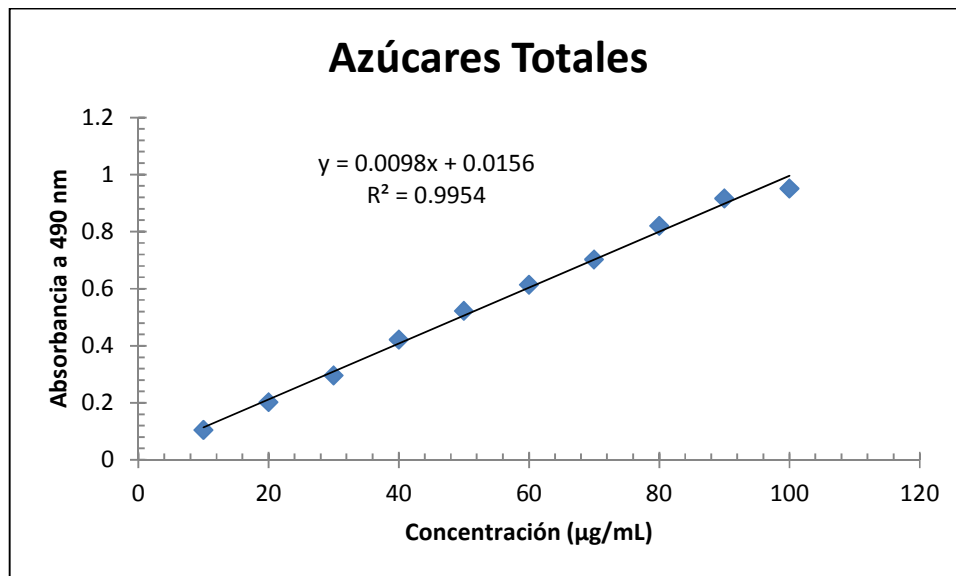
Comparación de perfiles de lignina para la determinación de la absorptividad recomendada (ϵ). En este caso se observa la similitud del perfil de bagazo de caña con el material forestal utilizado.



ANEXO A.

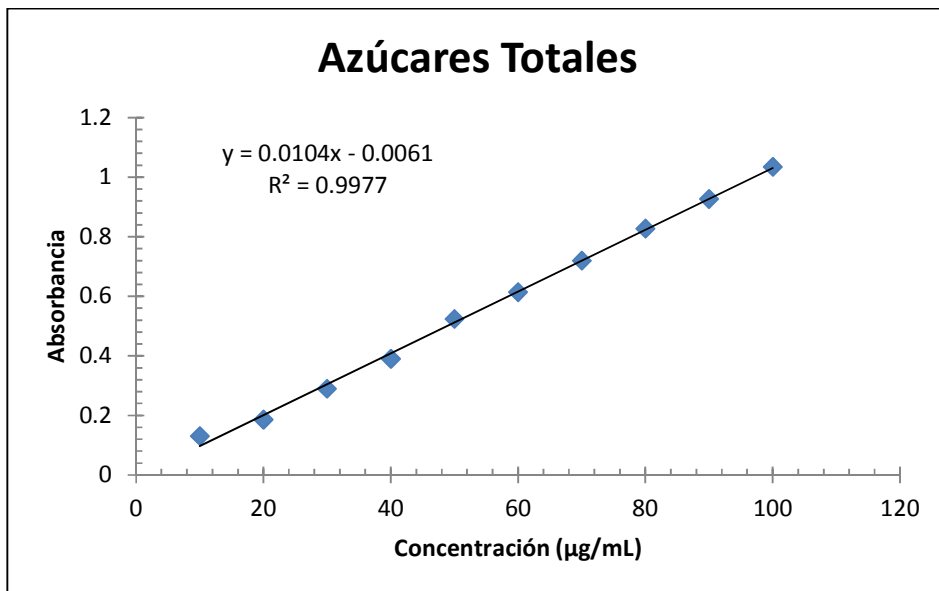
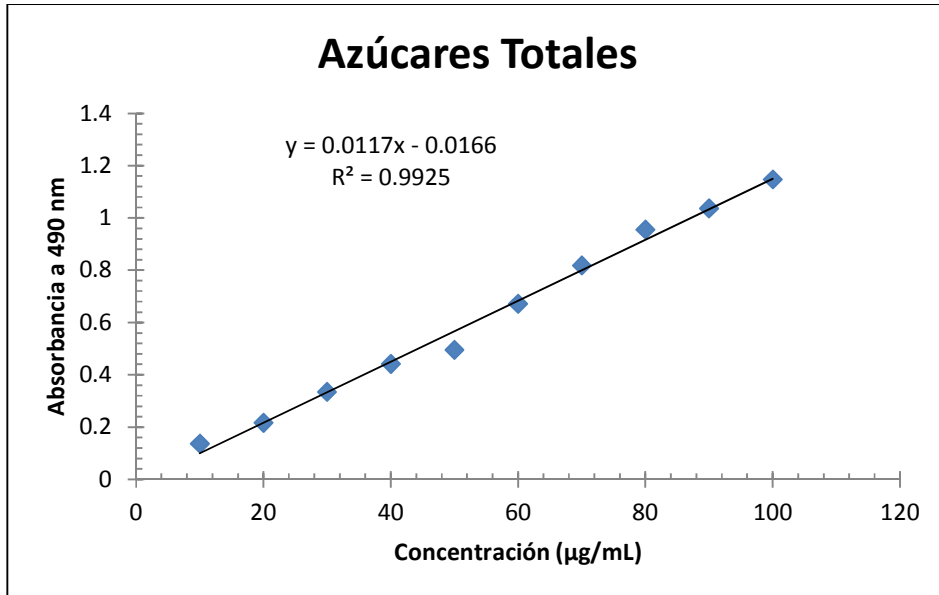
CURVAS PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES Y REDUCTORES.

Curvas patrón para la etapa de caracterización.

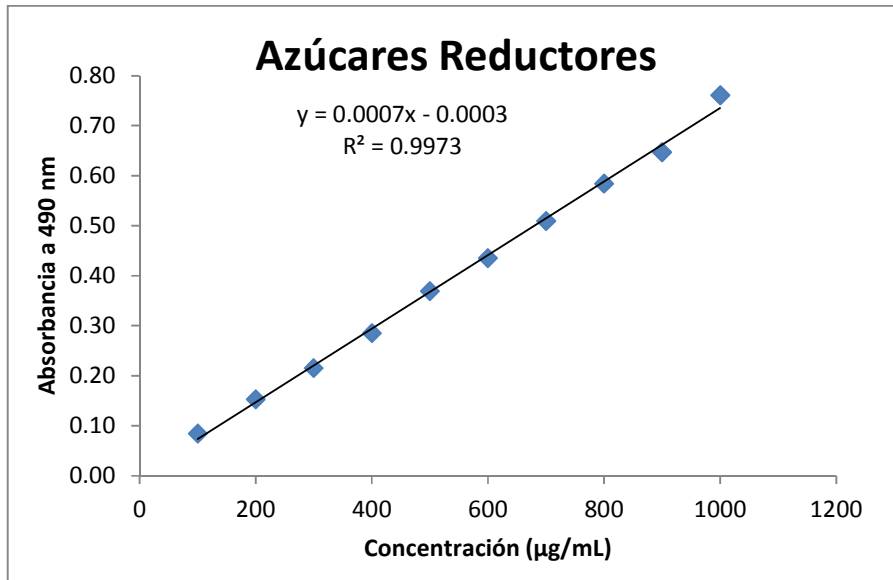


ANEXO A.

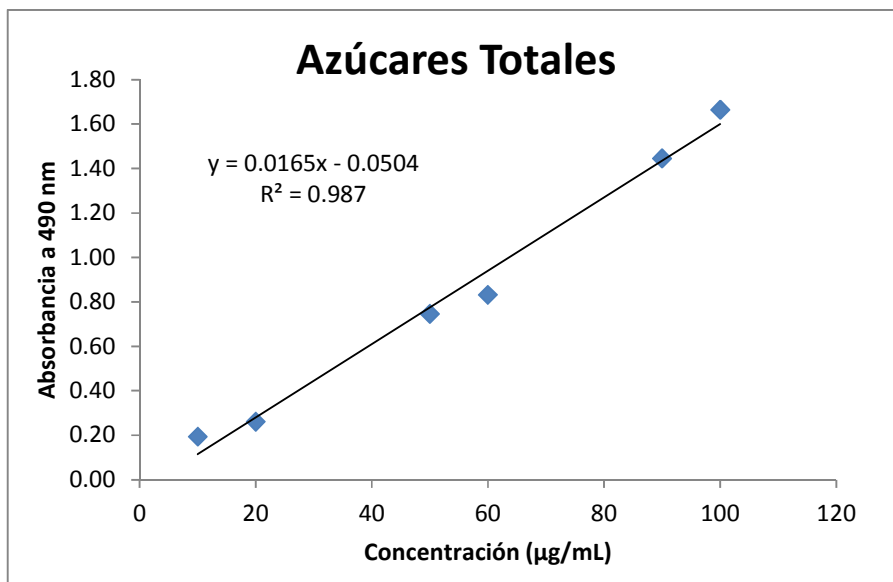
Curvas patrón utilizadas para el diseño de experimentos del pretratamiento con ácido diluido.



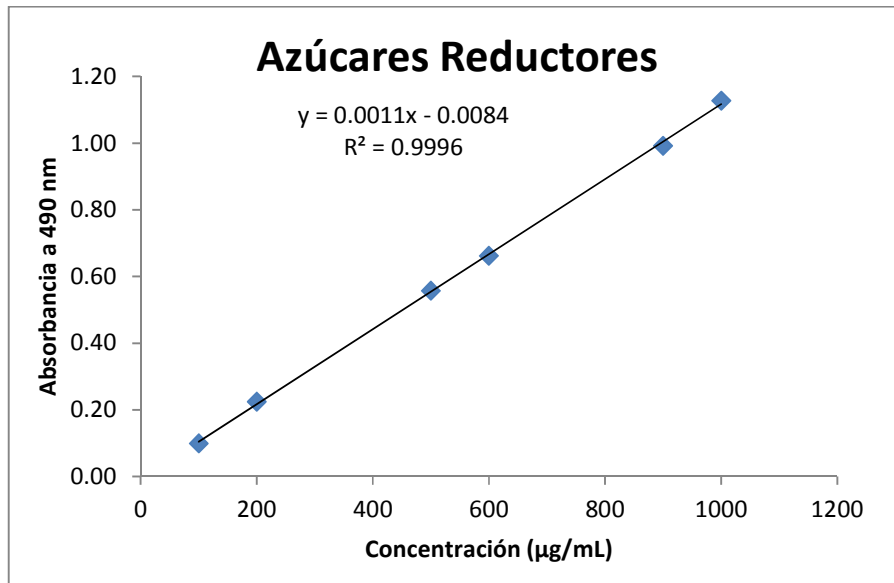
ANEXO A.



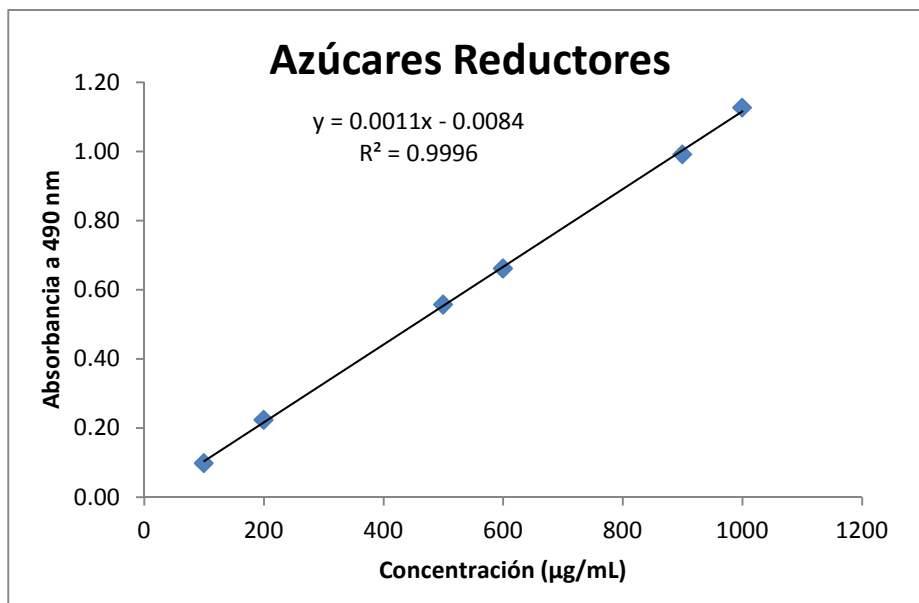
Curvas patrón utilizadas en la etapa de pretratamientos.



ANEXO A.



Curvas patrón para la etapa de hidrólisis enzimática.



ANEXO B.

ANEXO B. DISEÑO DE EXPERIMENTOS: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

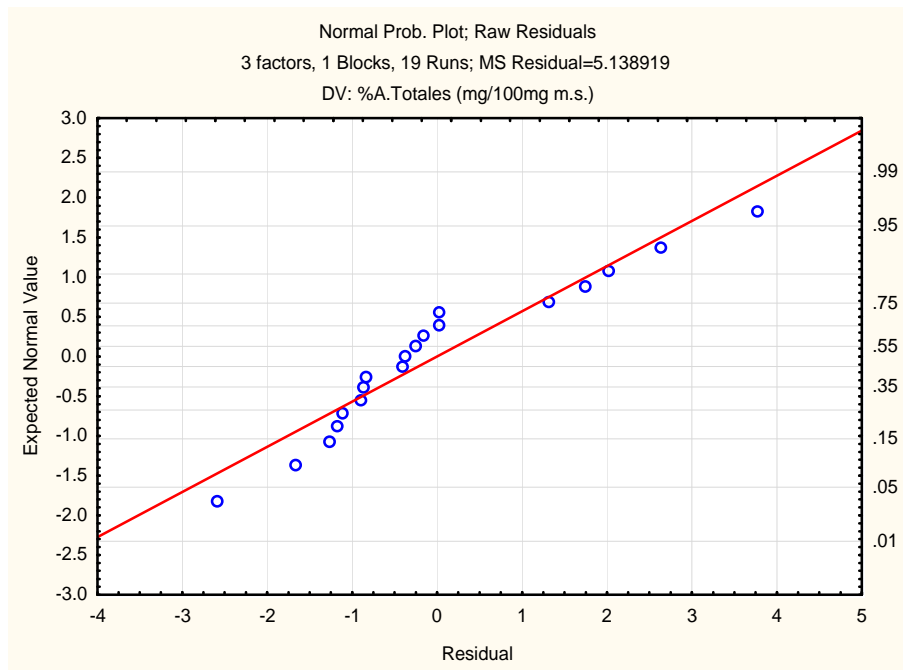


Figura B1. Distribución normal de residuos del modelo Azúcares Totales.

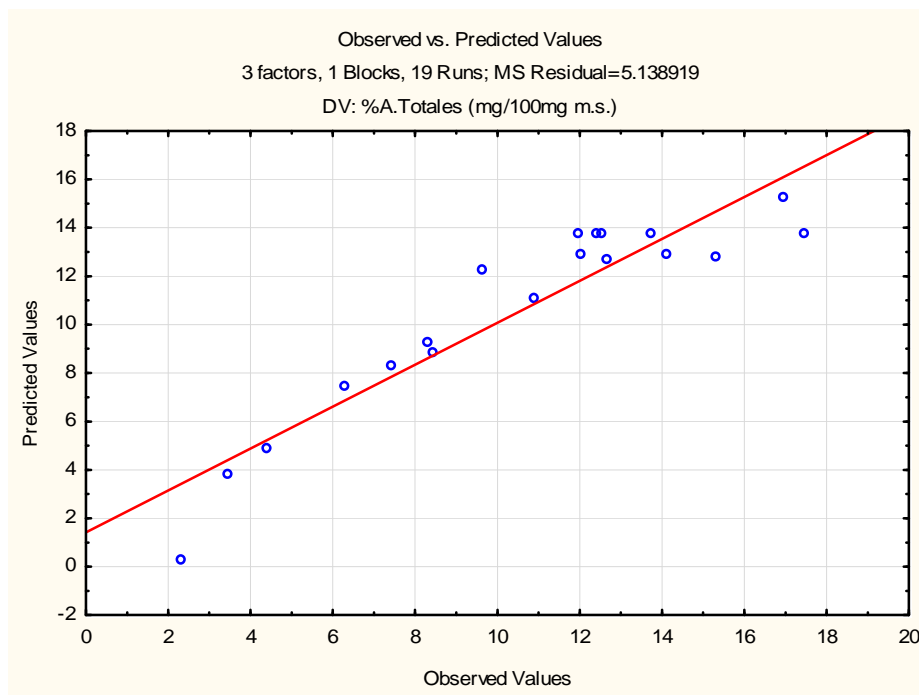


Figura B2. Valores predichos por el modelo vs valores observados de A. Totales

ANEXO B.

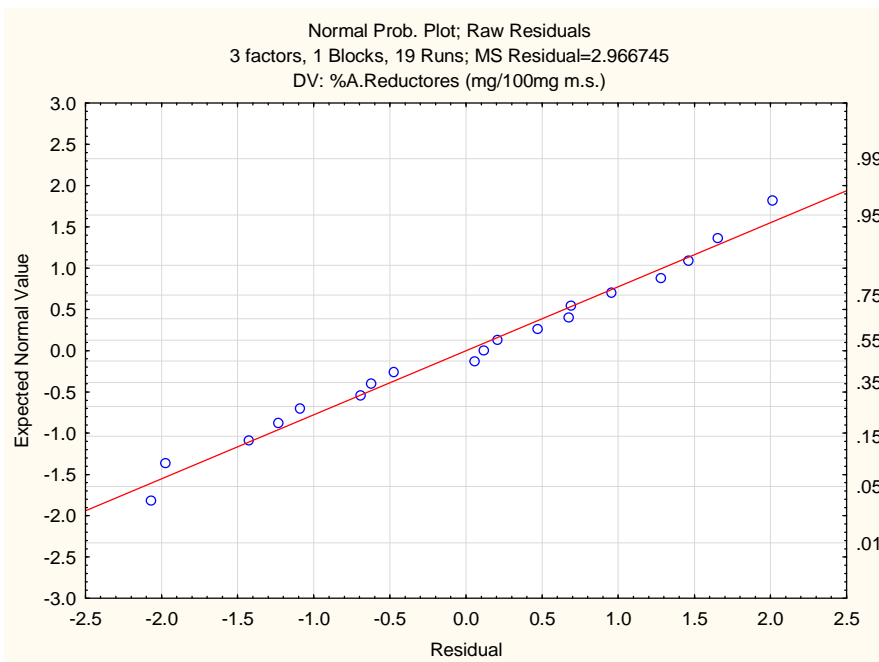


Figura B3. Distribución normal de residuos del modelo Azúcares Reductores.

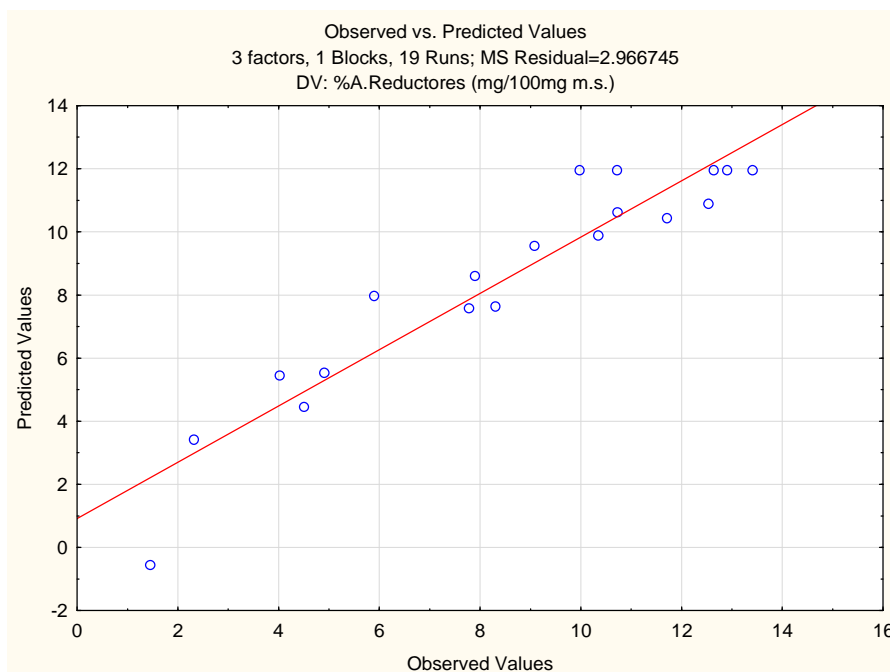


Figura B4. Valores predichos por el modelo vs valores observados de Azúcares Reductores.

ANEXO B.

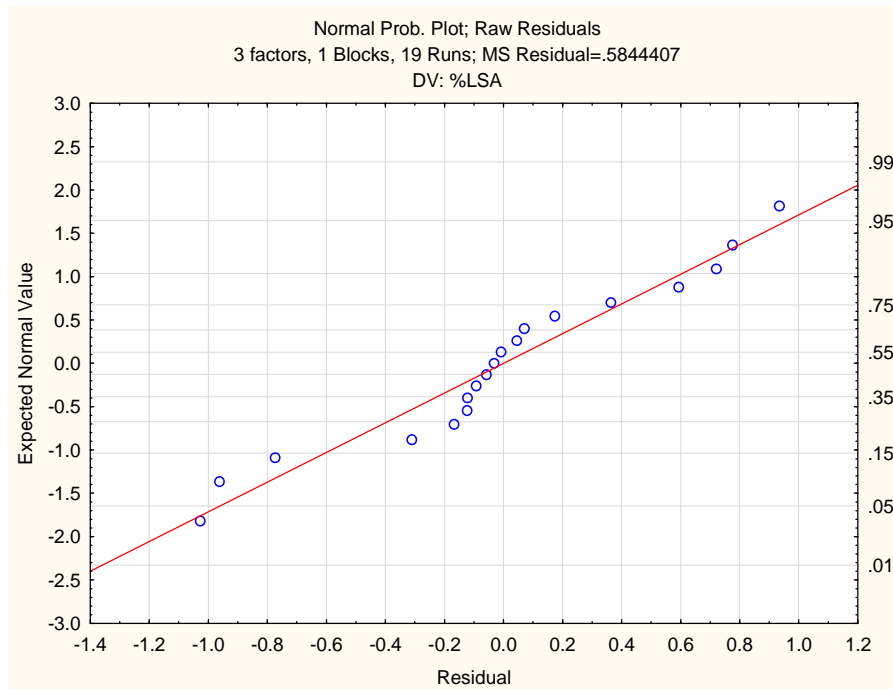


Figura B5. Distribución normal de residuos del modelo %LSA.

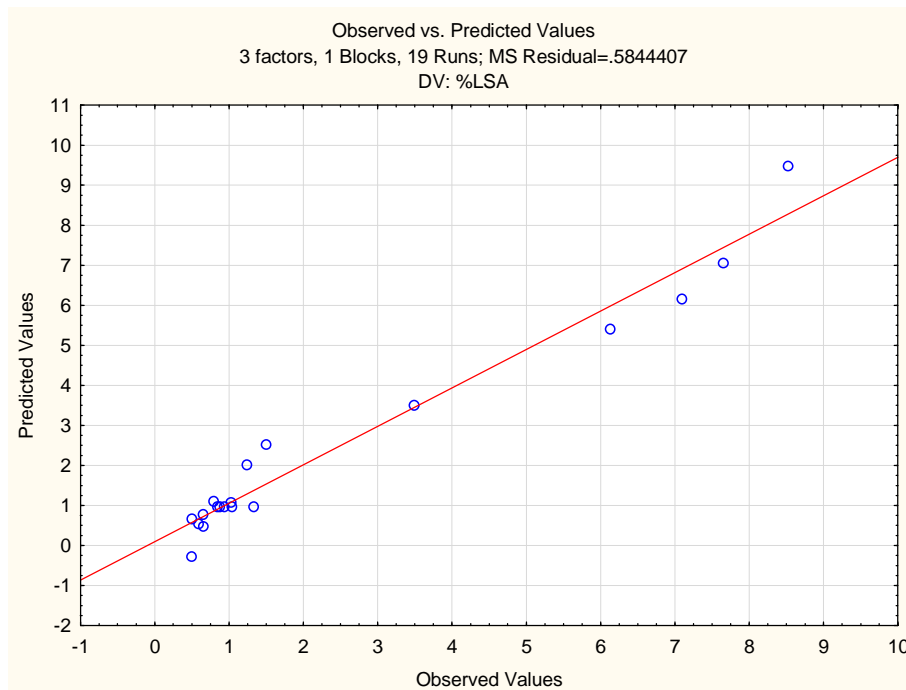


Figura B6. Valores predichos por el modelo vs valores observados del %LSA.

ANEXO B.

TABLAS ANOVA.

Tabla B1. ANOVA para el modelo: Azúcares totales.

ANOVA; Var.:%AT (mg/100mg m.s.); R-sqr=.86575; Adj.:.73151 (DATOS (Pret. ácido).sta) 3 factors, 1 Blocks, 19 Runs; MS Residual=5.138919 DV: %AT (mg/100mg m.s.)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) Temperatura (L)	14.2076	1	14.20762	2.76471	0.130727
Temperatura (Q)	232.7969	1	232.7969	45.30075	0.000086
(2) [H2SO4](L)	7.9597	1	7.9597	1.54891	0.244730
[H2SO4](Q)	0.0998	1	0.0998	0.01943	0.892221
(3) tiempo (L)	0.0428	1	0.0428	0.00833	0.929276
tiempo (Q)	1.3346	1	1.3346	0.25970	0.622587
1L by 2L	16.4440	1	16.4440	3.19990	0.107270
1L by 3L	19.2172	1	19.2172	3.73955	0.085153
2L by 3L	0.3241	1	0.3241	0.06307	0.807355
Error	46.2503	9	5.1389		
Total SS	344.5208	18			

F= 5.12 $\alpha=0.05$. SS: sum of squares. df: degrees of freedom. MS: mean square
*Valores en rojo: Factores preponderantes

Tabla B2. ANOVA para el modelo: Azúcares reductores.

ANOVA; Var.:%A.Reductores (mg/100mg m.s.); R-sqr=.89212; Adj.:.78425 (DATOS (Pret. ácido).sta) 3 factors, 1 Blocks, 19 Runs; MS Residual=2.966745 DV: %A.Reductores (mg/100mg m.s.)					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) Temperatura (L)	43.5863	1	43.5863	14.69164	0.004009
Temperatura (Q)	154.1741	1	154.1741	51.96742	0.000050
(2) [H2SO4](L)	4.0705	1	4.0705	1.37203	0.271539
[H2SO4](Q)	10.1153	1	10.1153	3.40957	0.097894
(3) tiempo (L)	0.6552	1	0.6552	0.22085	0.649571
tiempo (Q)	4.9624	1	4.9624	1.67268	0.228108
1L by 2L	5.9626	1	5.9626	2.00983	0.189962
1L by 3L	9.4600	1	9.4600	3.18867	0.107804
2L by 3L	0.9671	1	0.9671	0.32598	0.582010
Error	26.7007	9	2.9667		
Total SS	247.5134	18			

F=5.12 $\alpha=0.05$. SS: sum of squares. df: degrees of freedom. MS: mean square
*Valores en rojo: Factores preponderantes

ANEXO B.

Tabla B3. ANOVA para el modelo: LSA.

ANOVA; Var.:%LSA; R-sqr=.96113; Adj:.92225 (DATOS (Pret. ácido).sta) 3 factors, 1 Blocks, 19 Runs; MS Residual=.5844407 DV: %LSA					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1) Temperatura (L)	91.5542	1	91.5542	156.65266	0.000001
Temperatura (Q)	29.5204	1	29.5204	50.51054	0.000056
(2) [H2SO4](L)	1.0058	1	1.0058	1.72093	0.222046
[H2SO4](Q)	0.5936	1	0.5936	1.01565	0.339878
(3) tiempo (L)	2.5083	1	2.5083	4.29176	0.068181
tiempo (Q)	1.1932	1	1.1932	2.04156	0.186826
1L by 2L	1.4817	1	1.4817	2.53528	0.145791
1L by 3L	3.3734	1	3.3734	5.77205	0.039734
2L by 3L	0.5087	1	0.5087	0.87043	0.375189
Error	5.2600	9	0.5844		
Total SS	135.3055	18			

F= 5.12 $\alpha=0.05$. SS: sum of squares. df: degrees of freedom. MS: mean square

* Valores en rojo: Factores preponderantes

ANEXO C.

ANEXO C.HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.

Tabla C1. Cuantificación de azúcares totales y reductores del coctel enzimático E6 y E7.

#Tubo	ENZIMA	Vol. buffer agregado (μL)	Vol. Enzima agregada (μL)	Absorbancia a 490 nm	Promedio A. Totales (mg/mL)	σ	Absorbancia a 540 nm	Promedio A. Reductores (mg/mL)	σ
1	E6	1820	180	0.312	178.48	6.43	0.434	9.48	0.14
2		1820	180	0.294			0.425		
1	E7	1820	180	0.195	126.97	4.29	1.19	26.31	0.52
2		1820	180	0.207			1.224		

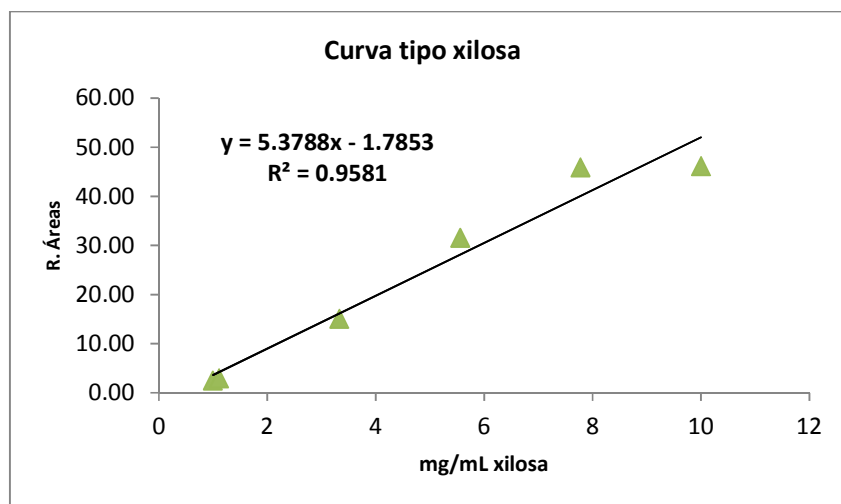
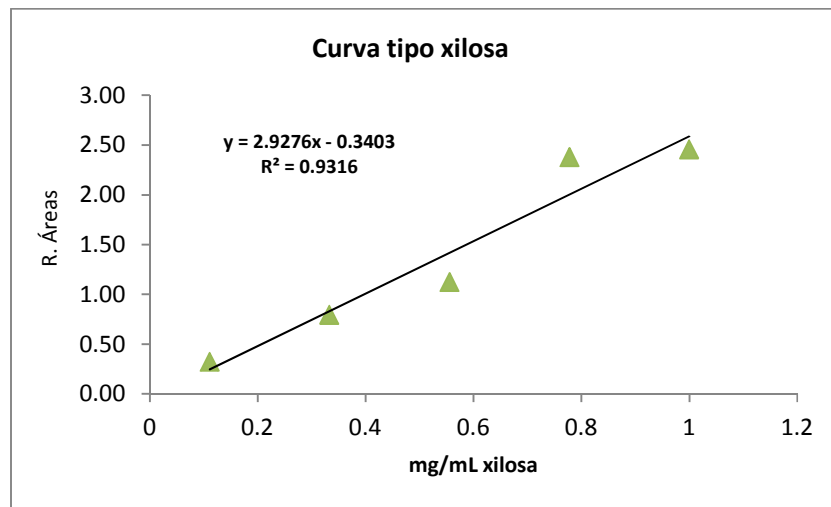
Tabla C2. Tiempos de retención de los azúcares mediante HPLC.

Componente	Tiempo retención (min)
Xilosa	4 a 6
Glucosa	7 a 9
Sacarosa	17 a 20
Celobiosa	23 a 24
Analina	29 a 32

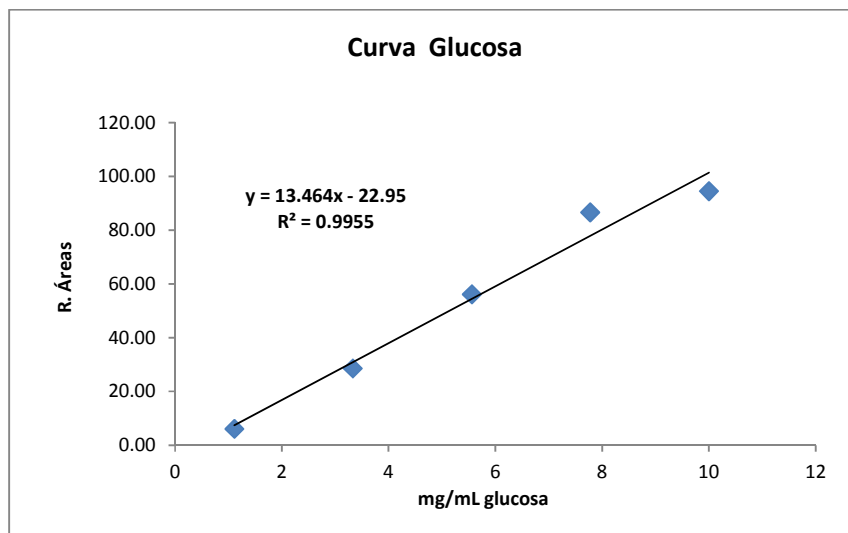
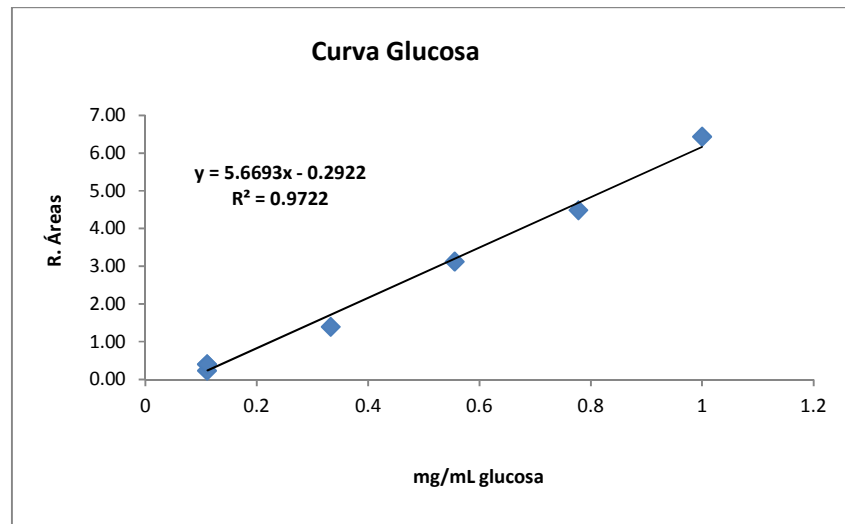
*Los tiempos de retención mostrados en la tabla C2 se obtuvieron por determinaciones realizadas anteriormente por el equipo de trabajo del laboratorio del IMP.

ANEXO C.

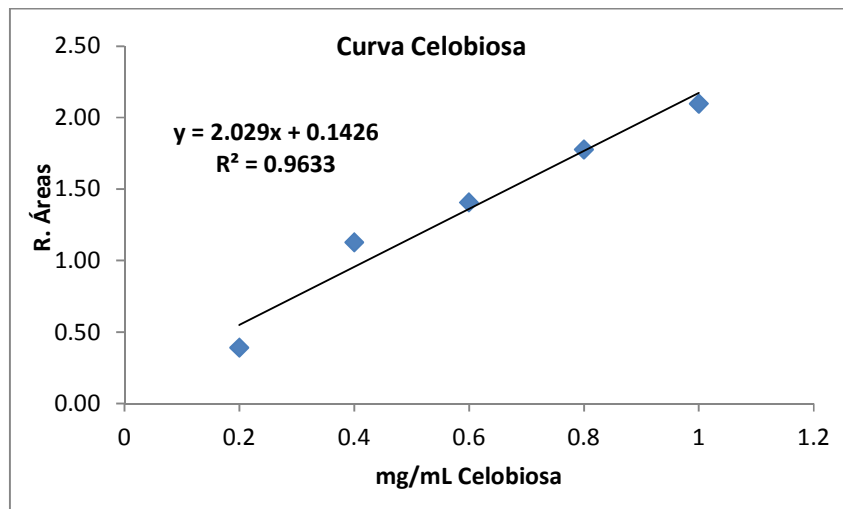
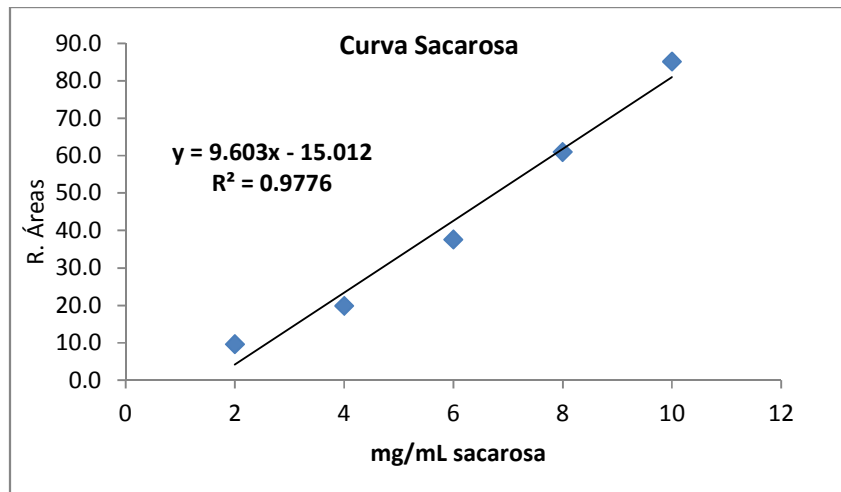
CURVAS PATRÓN PARA CUANTIFICACIÓN MEDIANTE HPLC (R. Áreas: Relación de áreas del azúcar correspondiente/Área de Alanina)



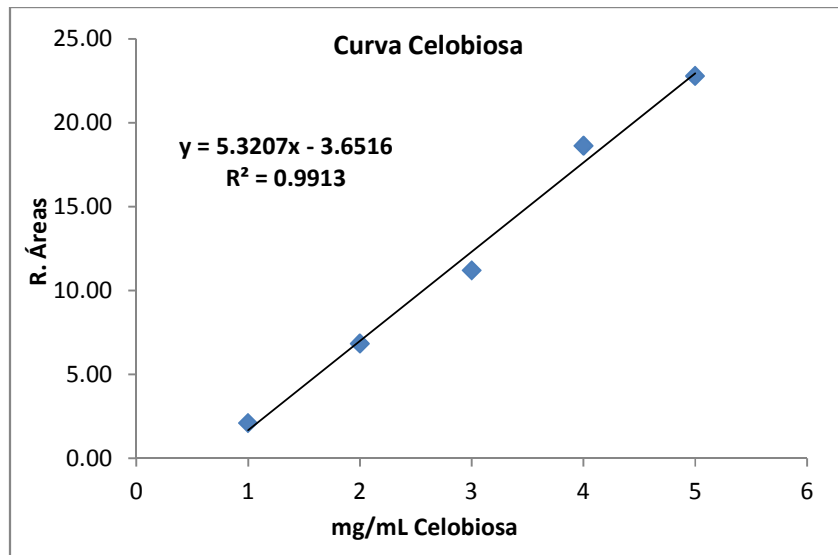
ANEXO C.



ANEXO C.



ANEXO C.



ANEXO D.

ANEXO D. SISTEMAS DE REACTORES (A) y HPLC (B).



(A)



(B)