



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**SACARIFICACIÓN BIOCATALÍTICA DE BIOMASA
LIGNOCELULÓSICA PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES
SUSCEPTIBLES DE FERMENTACIÓN A BIOETANOL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

KAREN JANET PÉREZ SALGADO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2014



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: ARTURO NAVARRO OCAÑA

VOCAL: Profesor: JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO

SECRETARIO: Profesor: JORGE ARTURO ABURTO ANELL

1er. SUPLENTE: Profesor: HIRAM FERNANDO RAMÍREZ CAHERO

2° SUPLENTE: Profesor: ÓSCAR HERNÁNDEZ MELENDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO

ASESOR DEL TEMA:

DR. JORGE ARTURO ABURTO ANELL

SUSTENTANTE:

KAREN JANET PÉREZ SALGADO

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	3
Antecedentes.....	3
Bioetanol	3
Clasificación de bioetanol.....	5
Producción mundial de bioetanol.....	6
Proyección futura para el bioetanol en México.....	6
Fuentes de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol	7
Composición de la biomasa lignocelulósica	9
Celulosa	9
Hemicelulosa	10
Lignina.....	11
Producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica	12
Pretratamiento.....	13
Sacarificación enzimática	17
CAPITULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
Hipótesis.....	19
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	21

Diagrama general	21
Materiales	21
Equipo	22
Procedimiento.....	23
Caracterización de materiales	24
Cuantificación de azúcares	25
Sacarificación enzimática sin pretratamiento	27
Pretratamiento	28
Sacarificación enzimática con pretratamiento	29
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS	30
Caracterización de materiales lignocelulósicos (Digestión ácida)	30
Hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos sin pretratamiento	33
Pretratamiento	46
Sacarificación enzimática con pretratamiento	50
Identificación de azúcares por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	54
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	57
Recomendaciones	58
ANEXO A	59
Curvas de calibración de azúcares para los métodos Fenol-sulfúrico y ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS)	59
ANEXO B.....	60

Curvas de calibración de azúcares para HPLC con estándar interno	60
ANEXO C	64
Datos de cuantificaciones de azúcares	64
BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE GRÀFICOS

Gráfico 1. Producción mundial de etanol en el 2013 [9].....	6
Gráfico 2. Porcentaje de azúcares generados en la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el Complejo E6.....	37
Gráfico 3. Eficiencia de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E6.	38
Gráfico 4. Porcentaje de azúcares generados de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E7.....	40
Gráfico 5. Eficiencia de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E7.	40
Gráfico 6. Azúcares generados de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E9.	42
Gráfico 7. Eficiencia de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E9.	42
Gráfico 8. Porcentaje de azúcares generados de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E10.....	44
Gráfico 9. Eficiencia de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E10.	44

Gráfico 10. Contenido de AT y LS del jarabe resultante del pretratamiento básico de los subproductos lignocelulósicos.	47
Gráfico 11. Eficiencia del pretratamiento básico con cal determinada por la lignina soluble. .	49
Gráfico 12. Porcentaje de azúcares generados en la sacarificación enzimática con pretratamiento alcalino y con el complejo E7.....	50
Gráfico 13. Eficiencia de la sacarificación enzimática con y sin pretratamiento y con E7	51
Gráfico 14. Azúcares generados de la sacarificación enzimática con pretratamiento alcalino y con el complejo E9.	52
Gráfico 15. Eficiencia de la sacarificación enzimática con el complejo E9.	53
Gráfico 16. Curva de calibración para determinar azúcares totales por el método Fenol-sulfúrico de Dubois.	59
Gráfico 17. Curva de Calibración para determinar azúcares reductores por el método ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).....	59
Gráfico 18. Curva de calibración de Glucosa.....	60
Gráfico 19. Curva de calibración de Xilosa.	60
Gráfico 20. Curva de calibración de Celobiosa.....	61
Gráfico 21. Curva de calibración de Fructosa.....	61
Gráfico 22. Curva de calibración de Manosa.	62
Gráfico 23. Curva de Calibración de Galactosa.	62
Gráfico 24. Curva de Calibración de Maltosa.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición general de la biomasa lignocelulósica [16].....	9
Figura 2. Estructura de la celulosa [17].....	10

Figura 3. Esquema de la celulosa amorfa y cristalina.....	10
Figura 4. Principales monómeros en la hemicelulosa.....	11
Figura 5. Principales monómeros de la lignina	12
Figura 6. Estructura general de la lignina.	12
Figura 7. Etapas de la producción de bioetanol a partir de biomasa.	13
Figura 8. Efecto del pretratamiento sobre el material lignocelulósico [19].	15
Figura 9. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa [24].	18
Figura 10. Diagrama general de las actividades experimentales.....	21
Figura 11. Bagazos de caña M1, M2 y M5.	35
Figura 12. Espectro de infrarrojo de la cal.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones del Pretratamiento con Cal [18].	28
Tabla 2. Resultados de la caracterización de los materiales lignocelulósicos.	32
Tabla 3. Grado de polimerización y relación AT/LT de los materiales lignocelulósicos.	32
Tabla 4. *Valores de AT y AR provenientes del lavado de los materiales.	33
Tabla 5. Grado de polimerización con el complejo E6.....	38
Tabla 6 Grado de Polimerización con el Complejo E7	41
Tabla 7. Grado de Polimerización con el Complejo E9.....	43
Tabla 8 Grado de polimerización con el complejo E10.....	45
Tabla 9. Grado de polimerización de los materiales pretratados.	53
Tabla 10. Identificación de azúcares por HPLC.....	54
Tabla 11. Resultados de la Sacarificación enzimática sin pretratamiento de Bagazos de caña.	64
Tabla 12. Resultados de la Sacarificación enzimática sin pretratamiento de pastos.	64

Tabla 13. Resultados de la Sacarificación enzimática sin pretratamiento de Maderas.	65
Tabla 14 Resultados de la Sacarificación enzimática con pretratamiento	65

RESUMEN

El presente trabajo es parte de los resultados del proyecto de investigación: Y.6001 “Desarrollo y adaptación de tecnología para la conversión de subproductos lignocelulósicos en etanol carburante”, se está llevando a cabo en el Instituto Mexicano del Petróleo.

La primera etapa consistió en la selección y caracterización de materiales lignocelulósicos, seguido de la evaluación de un pretratamiento y la sacarificación de los mismos. Se utilizaron 9 materiales lignocelulósicos; 3 bagazos de caña, 3 cultivos energéticos y 3 maderas, éstos a su vez fueron denominados como: bagazo de caña M1, bagazo de caña M2, bagazo de caña M5, pasto privilegio, pasto Taiwán, pasto zacate cadillo, madera costeras Ixtlán, madera costeras de Apapaxco y madera ailé. En primer lugar se llevó a cabo la caracterización de tres materiales (bagazos de caña M1, M2 y M5), debido a que en trabajos anteriores el resto de los materiales fueron caracterizados. Después los nueve materiales lignocelulósicos fueron sacarificados con cuatro complejos enzimáticos, denominados como: E6, E7, E9 y E10. Una vez llevada a cabo la sacarificación, se cuantificaron los azúcares totales (AT) y azúcares reductores (AR) a partir del hidrolizado obtenido. En base a la concentración obtenida de AT y AR, se calculó la eficiencia de éstos para cada material, y posteriormente se eligió un material de cada grupo (bagazo de caña M5, pasto Taiwán y maderas costeras Ixtlán) y los complejos enzimáticos (E7 y E9) con los cuales se obtuvo una mayor eficiencia de hidrólisis. Los tres materiales elegidos fueron pretratados con una solución de cal al 1% a 121°C durante 1 hora, este pretratamiento se llevó a cabo basándose en el principio de la *Nixtamalización*, debido a que la solución alcalina que se utiliza en este proceso degrada y solubiliza los componentes de la pared celular [1], es por eso que el pretratamiento fue aplicado con la intención de modificar la estructura de los materiales lignocelulósicos haciendo más accesible a la celulosa y hemicelulosa para la sacarificación enzimática. Una

vez llevado a cabo el pretratamiento se cuantificó la lignina soluble para cada material observándose una eficiencia mayor al 50% de lignina removida de los materiales en todos los casos. Después se efectuó la sacarificación utilizando los complejos enzimáticos E7 y E9, encontrando una concentración de azúcares comparados con los materiales sin pretratamiento. Con el pasto Taiwán se obtienen los mejores resultados (26.21% de AR) empleando el complejo enzimático E9, lo que implica que sería el material que produce más azúcares susceptibles de fermentación a bioetanol.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Antecedentes

Los combustibles de origen fósil han sido muy útiles en el desarrollo de la sociedad; el petróleo, el gas natural y sus derivados representan el 55% del consumo mundial de energía, además, son éstos los que permiten la existencia de los medios de transporte rápidos y eficientes que existen hoy en día, así como gran parte de las actividades industriales. La desventaja que presentan los combustibles fósiles es que sus reservas son finitas, por lo cual la seguridad de abastecimiento de energéticos es una problemática para muchos países que los importan y su uso es la principal fuente de los gases como el monóxido de carbono dióxido de azufre y el óxido de plomo, que están provocando cambios climáticos y el calentamiento global. Es preciso, entonces, incorporar nuevas alternativas de energía como lo son los biocombustibles, los cuales permitirán alargar la vida de los combustibles fósiles y al combinarlos con éstos se verán reducidos los gases contaminantes. Una de las opciones es el etanol, un excelente agente oxigenante y que puede ser mezclado con la gasolina, además puede ser producido a partir de biomasa, entendiéndose como biomasa toda la materia orgánica de origen vegetal o animal [2], al etanol producido a partir de biomasa se le denomina bioetanol.

Bioetanol

El etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) es un líquido incoloro derivado del alcohol [3] y tiene un peso molecular de 46.07 g/mol. El $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ es un combustible, es decir, libera significativas cantidades de calor al quemarse. Sin embargo, presenta algunas diferencias importantes con relación a los combustibles convencionales derivados del petróleo. La principal es el elevado contenido de oxígeno, que constituye cerca del 35% en masa del etanol [2]. Sin embargo, esto puede hacer que actúe como oxigenante en sustitución del aditivo MTBE (Metil tert-butil

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

éter), ya que este último ha sido considerado responsable de una gran contaminación. A pesar de que el MTBE fue introducido hace más de 20 años, como un aditivo de las gasolinas que ayudó a mejorar de manera importante la calidad del aire, actualmente se tiende a eliminar su uso debido a los problemas de contaminación de acuíferos que se han detectado. Las características del MTBE hacen que se incorpore rápidamente a los acuíferos y que migre prácticamente a la misma velocidad que el agua subterránea. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos ha llegado a la conclusión de que los datos disponibles son insuficientes para cuantificar los riesgos a la salud causados por el MTBE a niveles bajos de exposición en el agua potable, pero se sabe que el MTBE es un posible carcinógeno humano en altas dosis [4].

El etanol puede mezclarse con gasolina o quemarse puro en motores de encendido por chispa ligeramente modificados. Un litro de etanol contiene aproximadamente el 66 por ciento de la energía suministrada por un litro de petróleo, pero posee un índice de octano más elevado y, mezclado con gasolina para el transporte mejorando el rendimiento de esta última. Además aporta mejoras en el consumo de combustible de los vehículos, con lo que se reduce la emisión de monóxido de carbono, hidrocarburos sin quemar y carcinógenos. En comparación con la gasolina, el etanol está exento de azufre, por tanto, la mezcla de etanol con gasolina ayuda a reducir el contenido de azufre del combustible y por consiguiente se reducen también las emisiones de óxido de azufre el cual es un carcinógeno así como componente de la lluvia ácida [5].

El bioetanol permite disminuir las emisiones de efecto invernadero, ya que en la combustión del etanol solo se desprende CO₂, por lo que no habrían emisiones adicionales. La Agencia Internacional de Energía (IAE) estima que un litro de gasolina convencional genera 2.3 kg de CO₂ por cada litro de gasolina generado y quemado. Sin embargo, las operaciones de

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

siembra, fertilización y transporte generan un incremento positivo de emisiones de 0.2 kg de CO₂ por litro de etanol producido, por lo cual la reducción neta sería de 2.1 kg de CO₂. [6]

En el 2013, el uso de bioetanol en Estados Unidos redujo las emisiones de gases de efecto invernadero de los vehículos de carretera en 37.9 millones de toneladas métricas. Eso es equivalente a retirar 7.9 millones de automóviles de las calles durante un año [7].

Clasificación de bioetanol

Dependiendo del tipo de fuente a partir de la cual es producido, el bioetanol se clasifica en tres generaciones:

- Bioetanol de primera generación: Proviene de cultivos que pueden ser empleados también para la alimentación humana o animal. Los cultivos adecuados son los que tienen altas concentraciones de azúcares, como el azúcar de caña, el sorgo dulce o la remolacha; o altas concentraciones de almidón, como el maíz, la yuca o la papa.
- Bioetanol de segunda generación: Se produce a partir de materias primas con alto contenido de celulosa, como son los residuos agrícolas o forestales, por lo cual este bioetanol no compite con la industria alimentaria. Su procesamiento requiere de tecnologías avanzadas, pero ya se encuentran en construcción plantas de producción comercial de etanol lignocelulósico.
- Bioetanol de tercera generación: Proviene de fuentes específicamente cultivadas para producir biocombustibles, como las algas marinas. Ésta producción aún se encuentra en fase experimental y no está lista para producir bioetanol en cantidades industriales de una manera rentable [3].

El etanol que se produce hoy en día es de primera generación pero se espera que los de segunda generación dominen el mercado en los próximos años [8].

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Producción mundial de bioetanol

El etanol es producido a partir de sacarosa derivada de la caña de azúcar en Brasil y a partir de almidón de maíz en los Estados Unidos. En ambos casos se encuentra en expansión y en el implemento de nuevas tecnologías y se espera que para el 2015 se requieran de 100 millones de galones de etanol para abastecer su uso en vehículos de transporte [9].

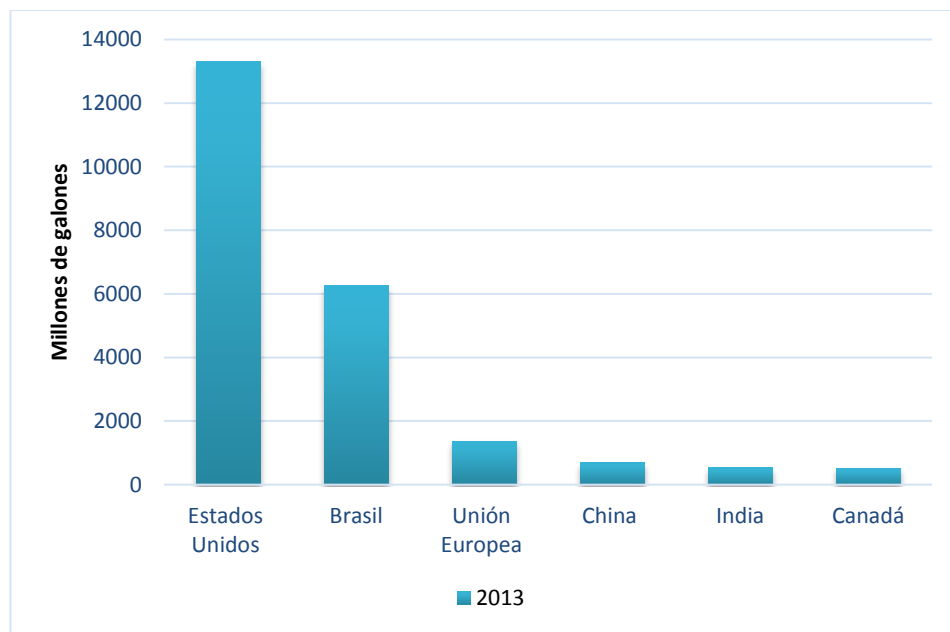


Gráfico 1. Producción mundial de etanol en el 2013 [9].

El etanol contribuye en pequeña escala, pero de manera creciente, al mercado de combustible en algunos países, y en otros casos tiene una contribución muy importante como en Brasil, donde sustituye en un 50% a la gasolina como combustible para el transporte.

Proyección futura para el bioetanol en México

Existe una oportunidad importante para que México emprenda la producción de bioetanol a gran escala. Basándose en la experiencia internacional, el etanol como combustible puede ser ideado como parte de la transición hacia sistemas de transporte sustentables. No se espera que el etanol desplace completamente a la gasolina del mercado en ningún momento.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Por el contrario, el etanol puede alargar los recursos petrolíferos logrando una moderada cuota de mercado ahorrando gasolina para el futuro [8].

El mercado nacional está representado por las necesidades de PEMEX que como lo mandatan las políticas públicas para los biocombustibles, debe agregar un 10% de etanol a la mezcla de las gasolinas de las zonas metropolitanas de Guadalajara, Monterrey y del Valle de México a partir del 2012. Ello equivale a una demanda total de 986 millones de litros de bioetanol. Si a todas las gasolinas del país se les agrega un 10% de bioetanol, como lo indican los Programas de bioenergéticos, entonces la demanda total de bioetanol sería de 4,406 millones de litros. Conforme a lo anterior se puede afirmar que Petróleos Mexicanos representa el principal mercado potencial para el desarrollo de una industria nacional de etanol anhidro en el país [8], por lo cual se puede aprovechar que México cuenta con una gran cantidad de biomasa lignocelulósica, como son los residuos agrícolas, forestales, etc., que proporcionan una materia prima de bajo costo para la producción de éste biocombustible. Además su conversión en bioetanol ofrece una ventaja tanto económica como ambiental ante los combustibles fósiles y el etanol de primera generación [10].

Fuentes de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol

Las fuentes de biomasa para la obtención de etanol son muy diversas, por mencionar algunas tenemos las siguientes: bagazo de caña, residuos forestales y cultivos energéticos.

El bagazo de caña se considera como una buena fuente de biomasa para la obtención de etanol debido a que México ocupa el séptimo lugar a nivel mundial tanto en la producción (8.8 ton/ha) como en consumo de azúcar (44 kg/habitante por año) y en cuarto lugar en la producción de campo de caña por hectárea, por esto la producción de caña de azúcar en el país en el 2013 ascendió a 47,293,529 toneladas, de las cuales se obtuvieron 17,552,630

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

toneladas de bagazo. En el país se cuenta con 18 ingenios que tienen una destilería para la producción de etanol, cuya producción se destina a satisfacer la demanda de bebidas alcohólicas y de la industria química [11]. Se puede considerar que teniendo las destilerías se puede adaptar una tecnología en los ingenios para la producción de bioetanol a partir del bagazo de caña.

Los residuos forestales son otra fuente de biomasa con la cual cuenta México, pues la industria forestal está constituida en su mayor parte por aserraderos en donde se procesan 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 y 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* [12].

Otra fuente de materia lignocelulósica en México pueden ser los cultivos energéticos lo cuales que pueden implantarse en terrenos de baja o nula rentabilidad, es decir, aquellos que por sus condiciones difícilmente pueden ser destinados para cultivar alimentos y que además

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

tienen la ventaja de no competir con la producción de alimentos, en este caso se consideran cultivos energéticos a diversos tipos de pastos o zacates [13].

Composición de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de tres diferentes polímeros los cuales son: celulosa (30-50%), hemicelulosa (15-35%) y lignina (10-20%) [14]. La celulosa y hemicelulosa representan aproximadamente el 70% de toda la biomasa y están estrechamente relacionados con la lignina a través de enlaces covalentes y puentes de hidrógeno, los cuales hacen que la estructura sea muy resistente a cualquier tratamiento [15].

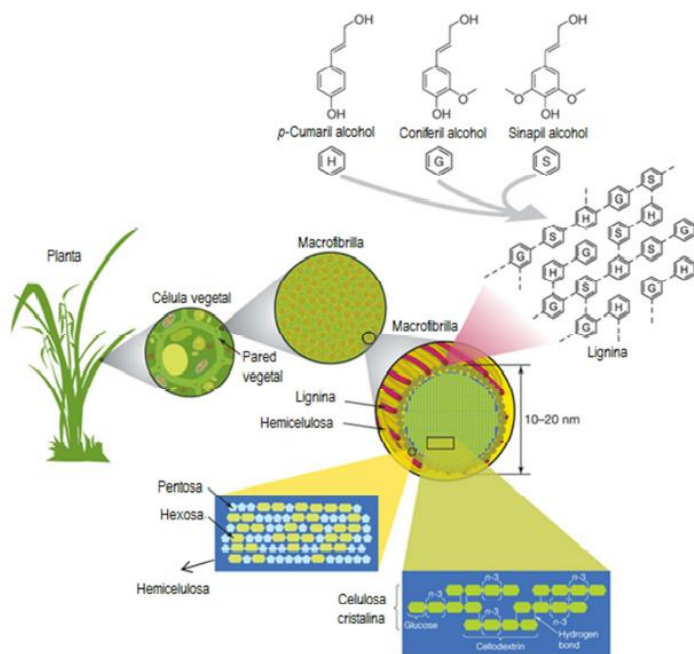


Figura 1. Composición general de la biomasa lignocelulósica [16].

Celulosa

La celulosa es un componente de estructura lineal que se encuentra en la pared celular de una planta y consiste en una cadena larga de monómeros de D-glucosa unidas por enlaces β (1 \rightarrow 4) glicosídicos que pueden alcanzar varios miles de unidades de glucosa de longitud.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Los puentes de hidrogeno entre moléculas dan lugar a una estructura de matriz cristalina y fuerte [15]. La celulosa en una planta consta de una parte con una estructura cristalina (organizada), y otra con estructura amorfa [14].

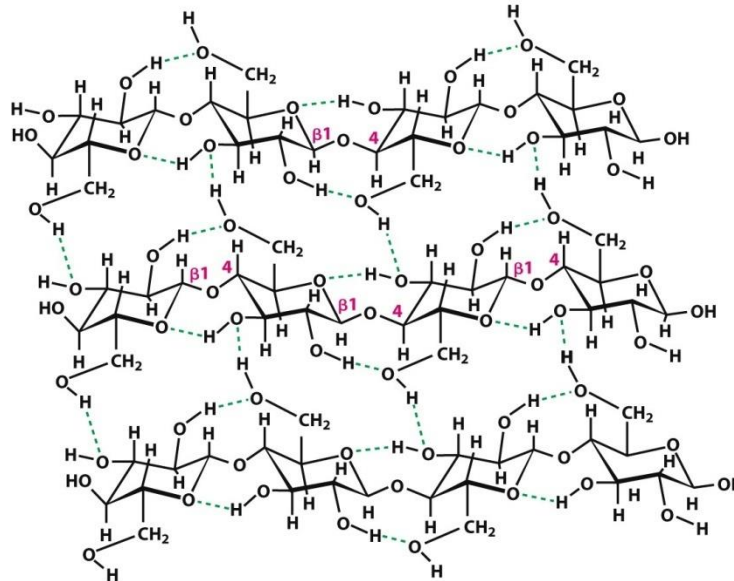


Figura 2. Estructura de la celulosa [17].

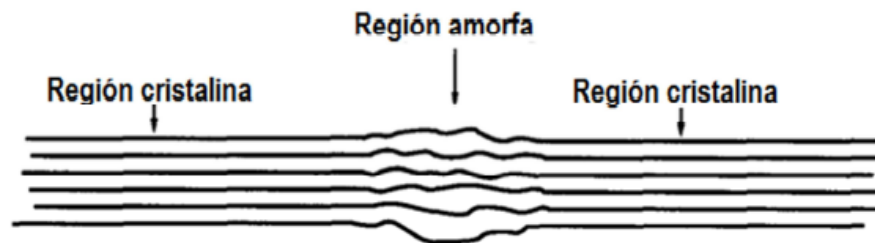


Figura 3. Esquema de la celulosa amorfa y cristalina.

Hemicelulosa

La hemicelulosa es el más complejo de todos los carbohidratos estructurales, es una mezcla de polisacáridos con un factor común de enlaces β 1-4 de xilanos en el polímero, aún cuando hay ramificaciones formando otros enlaces glicosídicos. El grado de polimerización es de

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

150 a 200 unidades y es casi completamente amorfa, además de la xilosa hay otros carbohidratos que conforman la hemicelulosa como la manosa, la galactosa, la glucosa, la arabinosa y el ácido glucurónico. La hemicelulosa de hojas y tallos de los pastos parece ser principalmente arabinoxilano, con enlaces al ácido glucurónico y la lignina, a través de enlaces ester para formar glucuronidos [15].

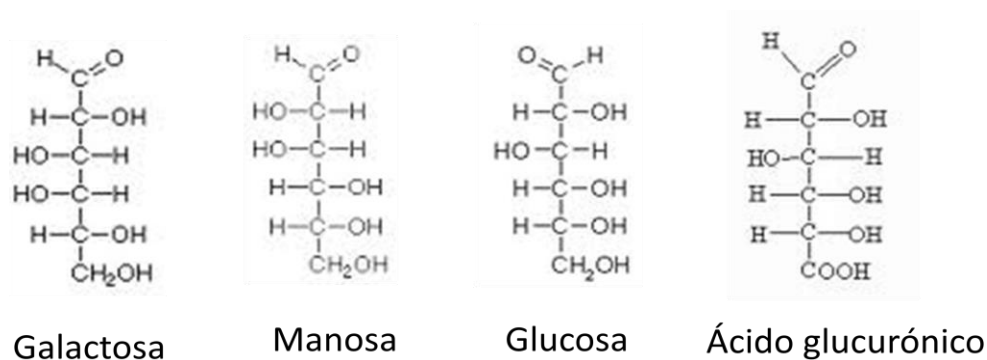


Figura 4. Principales monómeros en la hemicelulosa

Lignina

La lignina es un biopolímero que junto con la celulosa y hemicelulosa, son los polímeros más abundantes en la naturaleza. La lignina es una macromolécula polifenólica que presenta un elevado peso molecular, es rígida y está unida a través de enlaces covalentes a xilanos (hemicelulosa) por lo tanto, protege a la celulosa y hemicelulosa de los ataques microbianos. Es por esto que los materiales lignocelulósicos requieren de un tratamiento previo para la deslignificación y es necesario para liberar celulosa y hemicelulosa antes de la hidrólisis para producir azúcares fermentables. La lignina se compone de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos, principalmente cumarílico, coniferílico y sinapílico.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

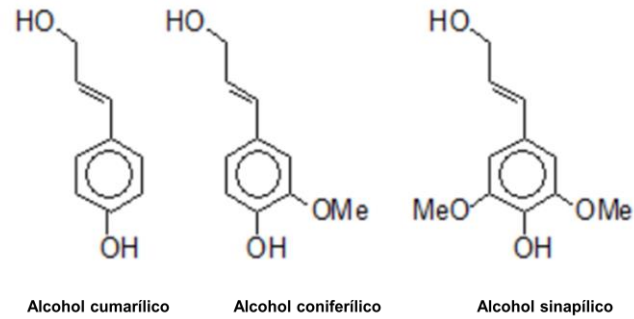


Figura 5. Principales monómeros de la lignina

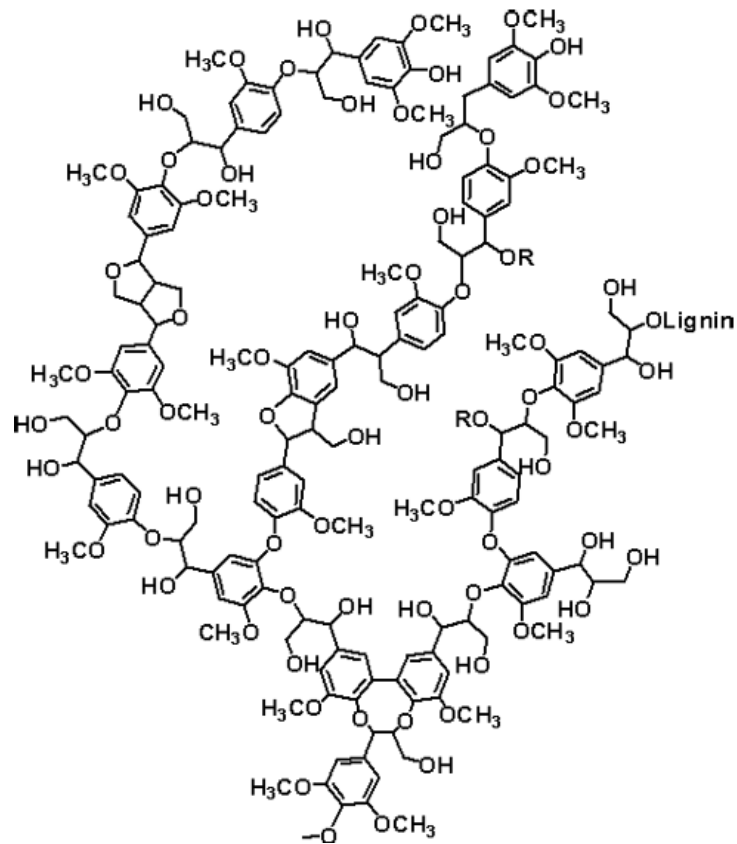


Figura 6. Estructura general de la lignina.

Producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

Para llevar a cabo la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica son necesarias dos etapas más de pretratamiento que en los procesos convencionales a partir de sacarosa o almidón, siendo estas el pretratamiento y la hidrólisis las cuales se describen más adelante.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

En el siguiente esquema se muestran las etapas para la producción de etanol a partir de azúcar y biomasa.

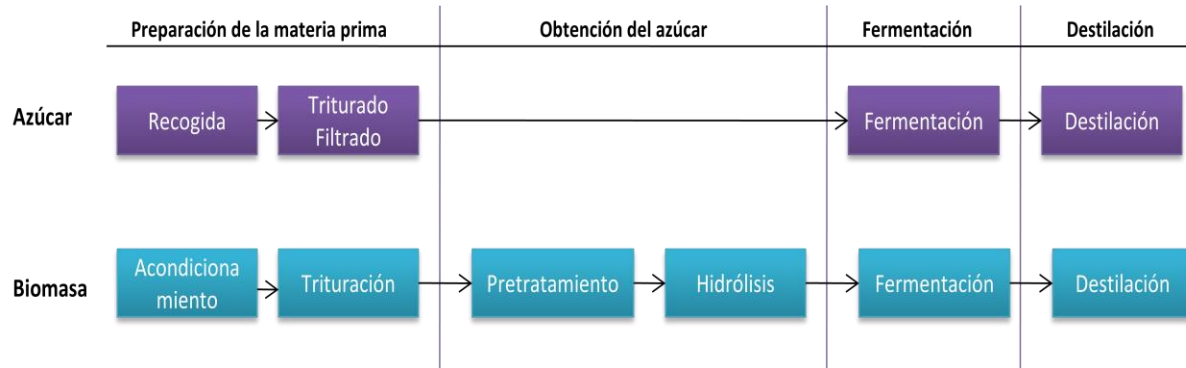


Figura 7. Etapas de la producción de bioetanol a partir de biomasa.

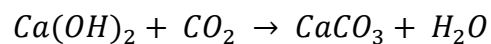
Pretratamiento

Se requiere de un pretratamiento para mejorar la digestibilidad de la biomasa para los procesos de conversión a bioetanol [18]. La acción del pretratamiento es romper la estructura de la lignina y modificar la estructura cristalina de la celulosa, haciéndola más accesible para las enzimas (figura 8), las cuales tienen la capacidad de hidrolizar a los polímeros de hidratos de carbono en azúcares fermentables. El pretratamiento se ha considerado como una de las etapas de procesamiento más caras de la conversión de biomasa en azúcares susceptibles de fermentación [19], por este motivo no solo se requiere de un pretratamiento eficaz sino también económicamente viable.

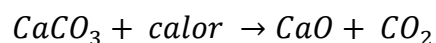
Se han desarrollado y estudiado varios procesos para la conversión de biomasa lignocelulósica a etanol. Los pretratamientos pueden ser clasificados como biológicos, físicos, químicos y físico-químicos [20]. En este trabajo se hará énfasis en un pretratamiento químico.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

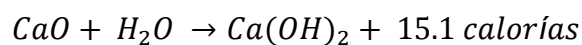
Muchos productos químicos se han estudiado para llevar a cabo un pretratamiento químico tales como ácidos, álcalis, gases, disolventes de celulosa, alcoholes, agentes oxidantes y agentes reductores. El hidróxido de sodio (NaOH), cal (óxido de calcio), amoníaco y urea son los álcalis comunes que se han utilizado para llevar a cabo un pretratamiento. Aunque el hidróxido de sodio aumenta la digestibilidad de la biomasa de manera significativa, es difícil de reciclar, así como relativamente caro (\$3.99/Kg) y peligroso de manejar. El amoníaco debido a que es volátil, puede ser reciclado fácilmente, pero su precio de adquisición es alto (\$11.50/Kg) y requiere de un manejo cuidadoso. La urea es seguro de manipular, pero también es moderadamente caro (\$0.31/Kg) en comparación con la cal (CaO) y es menos eficaz en la digestibilidad de la biomasa. Por el contrario la cal muestra algunas ventajas. Es seguro y muy barato (\$0.19/Kg), además puede ser recuperada carbonatando el agua de lavado con CO₂. Se ha demostrado que el 86% del calcio añadido al pretratamiento puede ser recuperado de las aguas de lavado [18], dicha reacción se muestra en la siguiente ecuación [21].



Además cuando el CaCO₃ se somete a temperaturas entre 900-1000°C se obtiene nuevamente CaO [22].



La ventaja que representa el utilizar cal viva u óxido de calcio para un pretratamiento es que al mezclarlo con agua se tiene una reacción exotérmica, obteniéndose cal apagada también conocida como hidróxido de calcio [22].



CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

La cal remueve sustancias amorfas como la lignina aumentando la accesibilidad de la celulosa y la efectividad de las enzimas debido a la reducción de los sitios de adsorción no productivos. Además remueve los grupos acetil hemicelulosa reduciendo el impedimento estérico de las enzimas mejorando la digestibilidad de la celulosa [20]; este efecto depende del contenido de lignina de los materiales. Cuando se utilizan bajas temperaturas (50-65°C), el tiempo del pretratamiento puede ser de varios días o incluso semanas, durante el uso de altas temperaturas (85-135°C) reduce el tiempo para llevar a cabo el pretratamiento a la orden de horas. La carga de cal recomendada es de 0.1 g de cal/ g de biomasa seca. Un método para romper la estructura de la biomasa es hacerlo mediante un proceso térmico, pues calentar a altas temperaturas y someter la biomasa a altas presiones rompe las estructuras celulares [18].

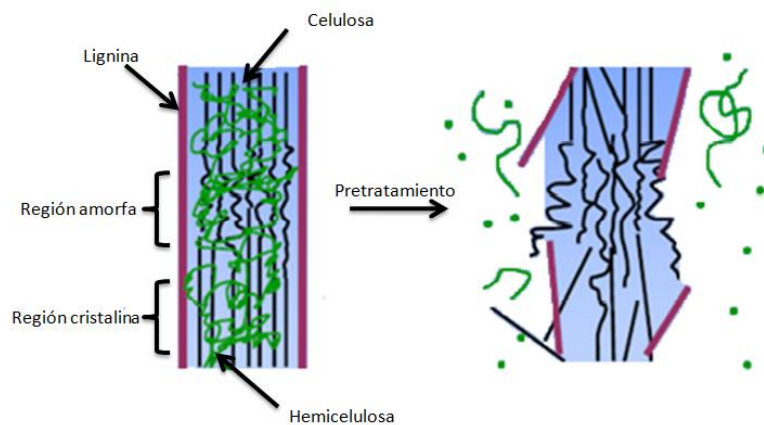


Figura 8. Efecto del pretratamiento sobre el material lignocelulósico [19].

El pretratamiento utilizando cal viva se asemeja al proceso de *nixtamalización* el cual es proceso antiguo desarrollado por los aztecas, mediante el cual se obtiene el maíz nixtamalizado o nixtamal para la producción de masa, que es utilizada para la elaboración de

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

tortillas tradicionales que son la fuente principal de calcio en la alimentación de los mexicanos.

El proceso de *nixtamalización* consiste en el cocimiento del grano de maíz con agua, adicionando hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) en relación 1:3 y sometiéndolo a una temperatura menor a la de ebullición, durante un tiempo de 30 a 40 minutos, dependiendo de la dureza del grano. Después se deja reposar de 12 a 14 horas en el caldo de cocción llamado nejayote. Se lava eliminando los componentes orgánicos (pericarpio, germen y fracciones de endospermo), y el exceso de calcio. La masa obtenida es una mezcla constituida por los polímeros de almidón (amilosa y amilopectina) mezclados con gránulos de almidón parcialmente gelatinizados, gránulos intactos, partes de endospermo y lípidos. Todos estos componentes forman una malla compleja heterogénea dentro de una fase acuosa continua. Además la reasociación de la amilosa y amilopectina, que depende del tiempo y la temperatura, modifica el contenido total de agua y su distribución. Este proceso tiene la mayor repercusión en las propiedades reológicas y de textura de los productos elaborados a partir de masa y que además permite tener mayor calidad nutricional, pues durante el proceso de cocimiento, la zeína, que es una proteína deficiente en lisina y triptófano, disminuye su solubilidad, mientras que la glutelina, que tiene un mayor valor nutricional, aumenta su solubilidad y con ello la disponibilidad de los aminoácidos esenciales [23], además durante el cocimiento del grano se llevan a cabo reacciones bioquímicas, entrecruzamientos e interacciones moleculares que modifican tanto las características fisicoquímicas, estructurales y reológicas de la masa, así como también las propiedades estructurales y de textura de la tortilla producida [1]. Es por esto que la cal se ha utilizado para la aplicación en un pretratamiento en la biomasa lignocelulósica, pues en estudios que

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

se han llevado a cabo este pretratamiento ha solubilizado hasta un 14% de lignina en bagazo de caña [18].

Sacarificación enzimática

Los polímeros de carbohidratos en la biomasa lignocelulósica necesitan ser convertidos a azúcares simples antes de la fermentación, a través de una hidrólisis, la cual puede ser química o enzimática. En la hidrólisis química (utilizando ácido) se forman sustancias como el furfural y el HMF (hidroximetilfurfural), éstos furanos usualmente encontrados en cantidades significativas en los hidrolizados, pueden condensarse y formar polímeros insolubles los cuales precipitan y pueden causar problemas en los reactores y reducir el tiempo de etanol, así como ser un factor de inhibición enzimática [24].

Sin embargo la hidrólisis enzimática con celulasas las cuales son específicas para la celulosa y forman solo glucosa en condiciones de 50°C y pH 4.8, no da productos de degradación indeseables. El termino celulasa se refiere a una familia de enzimas que actúan de forma sinérgica para degradar el polímero de celulosa. Los componentes separados pueden ser agrupados dentro de tres clases: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas o celobiasas [25]. Las exoglucanasas o exo- β -1,4-glucanasas, catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos para liberar celobiosa y finalmente las β -glucosidasas o celobiasas, como su nombre lo indica rompen el enlace β -1,4-glucosídico de la celobiosa para forman moléculas de glucosa [24].

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

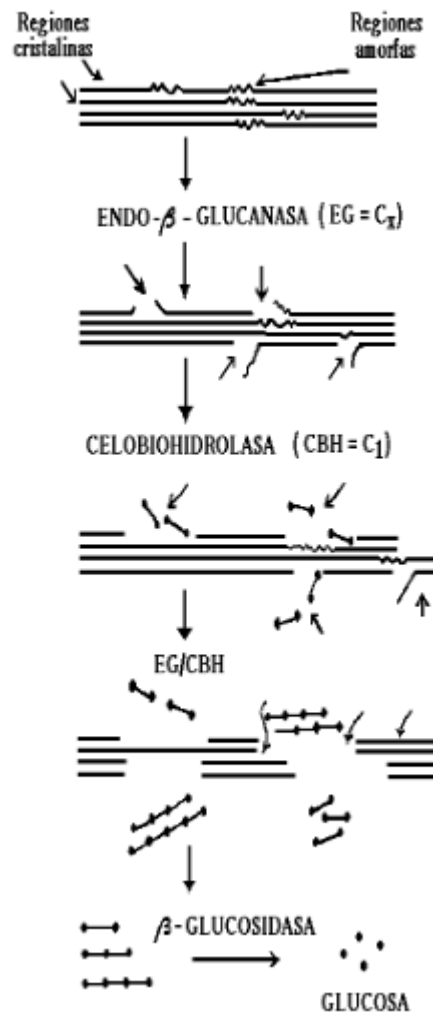


Figura 9. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa [24].

CAPITULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Evaluar la sacarificación enzimática de diversos materiales lignocelulósicos provenientes de un pretratamiento alcalino basado en la *nixtamalización*.

Objetivos particulares

Caracterizar la biomasa lignocelulósica mediante el contenido de lignina, azúcares totales y azúcares reductores.

Llevar a cabo la sacarificación de 9 materiales lignocelulósicos (3 bagazos de caña, 3 cultivos energéticos y 3 maderas) sin pretratamiento con cuatro complejos enzimáticos.

Determinar la cantidad de azúcares obtenidos a partir de la biomasa lignocelulósica sin pretratamiento, así como obtener el grado de polimerización y la eficiencia de sacarificación con los cuatro complejos enzimáticos empleados.

Llevar a cabo la sacarificación de 3 subproductos lignocelulósicos (bagazo de caña, cultivo energético y madera) pretratados, empleando dos complejos enzimáticos.

Determinar la cantidad de azúcares obtenidos a partir de los subproductos lignocelulósicos pretratados y sacarificados. Identificarlos y determinar su concentración en los hidrolizados mediante HPLC.

Analizar el efecto del pretratamiento sobre los materiales lignocelulósicos comparado con los materiales sin pretratar.

Hipótesis

Al aplicar un pretratamiento alcalino basado en la *nixtamalización*, se espera que la estructura de la biomasa lignocelulósica se modifique dejando a la celulosa con un

CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

mayor grado de exposición a la sacarificación, lo cual podría permitir obtener una mayor concentración de azúcares susceptibles de fermentación a bioetanol.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Diagrama general

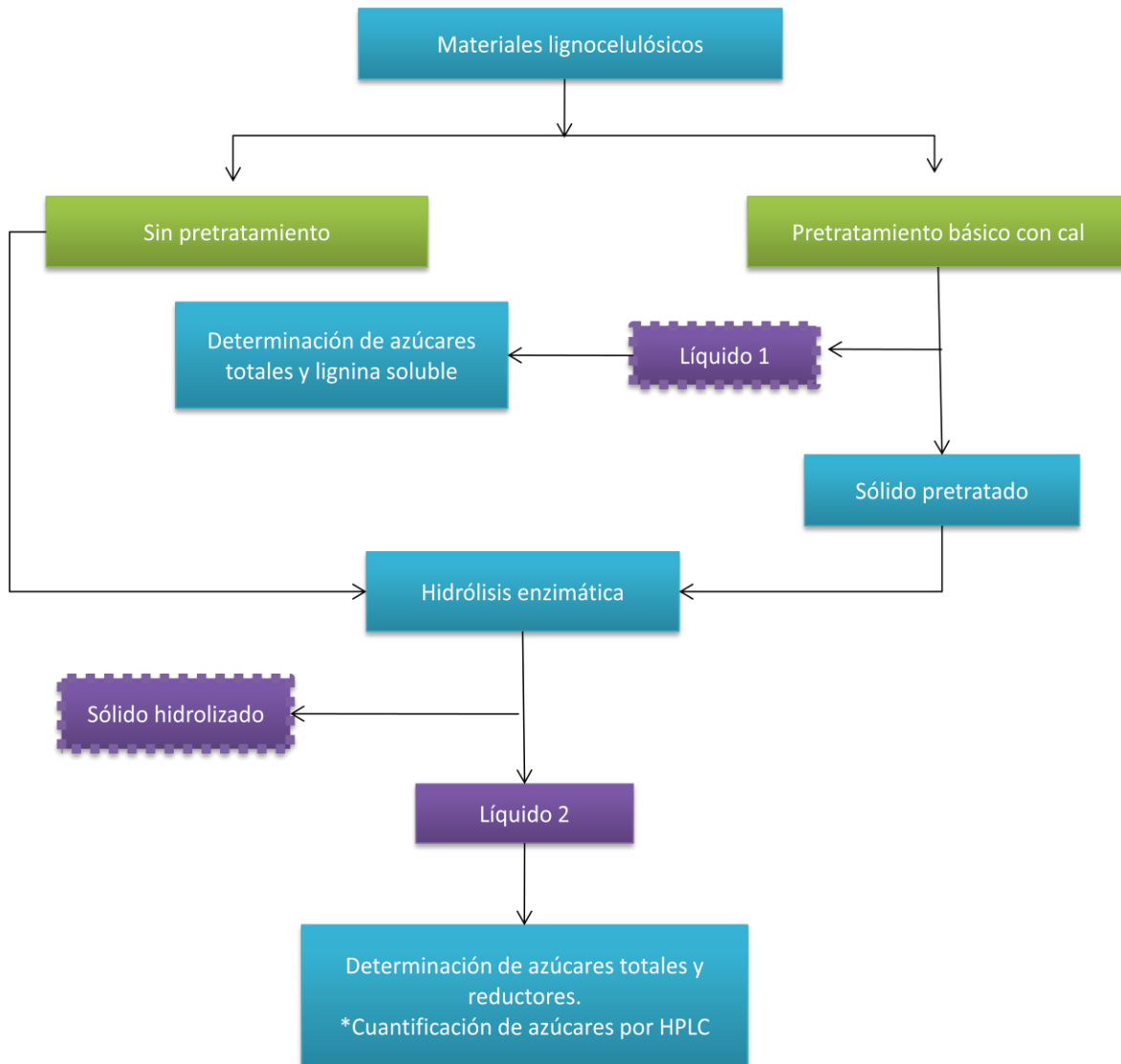


Figura 10. Diagrama general de las actividades experimentales

*La cuantificación de azúcares por HPLC se llevó a cabo sólo en materiales pretratados.

Materiales

Los bagazos de caña utilizados en este trabajo provienen del Ingenio “La Gloria”, éstos fueron denominados como: bagazo de caña M1, bagazo de caña M2 y bagazo de caña M5, dichos materiales fueron recolectados en diferentes fases del proceso en la obtención de azúcar y su descripción detallada se da más adelante, éstos materiales se recibieron sin

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

tamizar. Los tres lotes de maderas fueron proporcionados por el Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), con tamaño de malla 40, los cuales fueron nombrados como: madera costeras Ixtlán, madera costeras de Apapaxco y árbol ailé. Así mismo los tres lotes de pastos fueron proporcionados por la institución anteriormente mencionada, éstos se recibieron con tamaño de malla 40 y fueron denominados como: pasto Taiwán, pasto zacate Cadillo y pasto privilegio.

Los azúcares totales se midieron utilizando H_2SO_4 grado analítico y una solución de fenol al 5% (p/v), los azúcares reductores se cuantificaron utilizando el reactivo de DNS. Para el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos se ocupó óxido de calcio (cal viva) comprada al proveedor Ameripol Chemical.

Equipo

Para llevar a cabo la hidrólisis ácida así como el pretratamiento se requirió de un autoclave marca YAMATO modelo SE510. En la sacarificación con y sin pretratamiento se utilizó un evaporador marca BÜCHI modelo Syncore P-101y una microcentrífuga marca LAB-NET modelo 2233-M2 Hermle. La medición de azúcares totales (AT) y azúcares reductores (AR) se realizó con un espectrofotómetro UV-vis marca THERMO SPECTRONIC modelo HELIOS, mientras que el perfil de azúcares se efectuó con un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) marca HEWLETT-PACKARD modelo 1100 con Detector Evaporativo de Dispersión de Luz marca AGILENT TECHNOLOGIES modelo 1260ELSD. Para el análisis de la cal se ocupó un espectrofotómetro Infrarrojo marca NICOLET modelo NEXUS 40 FT-IR. La determinación de humedad se realizó empleando una termobalanza marca OHAUS modelo MB45.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Procedimiento

En la primera parte de este trabajo se llevó a cabo la caracterización de tres materiales (bagazos de caña M1, M2 y M5), debido a que en trabajos anteriores se realizó esta operación para el resto de los materiales con los cuales se trabajó

Para caracterizar las muestras se tamizaron, se determinó humedad y cenizas [26]. Después se realizó una digestión ácida, la cual sirvió para cuantificar la lignina soluble en ácido (LSA), lignina insoluble en ácido (LIA), azúcares totales (AT) y azúcares reductores (AR). Del jarabe obtenido en la hidrólisis ácida se realizó un perfil de carbohidratos por HPLC, previo a ello se hicieron las curvas de calibración de los azúcares que pudieran estar presentes en el jarabe y por medio de éstas se obtuvo la concentración de los hidratos de carbono presentes en el hidrolizado, más adelante se describen las técnicas empleadas.

Posteriormente se sacarificaron los nueve materiales (bagazo de caña M1, bagazo de caña M2, bagazo de caña M5, pasto privilegio, pasto Taiwán, pasto zacate cadillo, madera costeras Ixtlán, madera costeras de Apapaxco y madera ailé) sin pretratamiento, empleando cuatro complejos enzimáticos los cuales fueron denominados como E6, E7, E9 y E10. Una vez obtenidos los hidrolizados se determinó la concentración de AT y AR. La técnica para llevar a cabo la sacarificación se describe más adelante.

Por último se aplicó un pretratamiento alcalino a los materiales con los cuales se obtuvo una mayor concentración de azúcares, llevado a cabo el pretratamiento se sacarificaron los materiales con los complejos enzimáticos E7 y E9. La técnica empleada para el pretratamiento se muestra más adelante.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Caracterización de materiales

Los tres lotes de bagazos de caña se tamizaron por malla 10, 20, 40 y 50. La fracción de la malla 40 fue utilizada para la caracterización mientras que la fracción correspondiente a la malla 10 se utilizó para la sacarificación con y sin pretratamiento. Después el material se secó a 40°C durante 24 horas y se determinó el contenido de humedad de los materiales por termobalanza.

La composición de los bagazos se determinó usando los procedimientos de análisis estándar publicados por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable.

Para determinar cenizas se pesaron 2.5 g aproximadamente de material en crisoles de porcelana a peso constante, las muestras se calcinaron primeramente en un mechero en la campana hasta que no desprendieron humos y después se colocaron en una mufla a 575 ± 25 °C durante 24 horas. El contenido de cenizas se determinó como el peso del residuo después de la ignición.

Para la digestión ácida se pesaron 300 mg de material lignocelulósico en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, El material se trató con ácido sulfúrico al 72% a 30°C durante una hora en agitación a 300 rpm y en la segunda etapa se agregó agua para tener una concentración de 4% de ácido sulfúrico, para llevarlo al autoclave a 121°C durante una hora. Se filtra usando un filtro de crisol y la fracción soluble se utilizó para determinar la lignina soluble en ácido (LSA) en el UV-vis, en donde el valor de absorbancia se encontró en un intervalo de 0.7-1.0 a una longitud de onda de 240 nm, mientras que el residuo sólido correspondió a la lignina insoluble en ácido (LIA). El contenido de lignina total se determinó como la suma de LIA y LSA. Las ecuaciones utilizadas para realizar los cálculos se muestran a continuación.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

$$\% LSA = \frac{UV_{abs} \times V_{filtrado} \times Dilución}{\epsilon \times g_{biomasa\ base\ seca}} \times 100$$

En donde: UV_{abs} corresponde a la absorbancia del bagazo de caña a longitud de onda de 240 nm, $V_{filtrado}$ es igual al volumen de líquido obtenido (L), ϵ equivale a la constante de absorptividad que para el material es de 25 ($L \cdot g \cdot cm^{-1}$) y $g_{biomasa\ seca}$ equivale a la cantidad de material hidrolizado en peso seco.

$$\% LIA = \frac{g_{sólido} - g_{cenizas}}{g_{biomasa\ base\ seca}} \times 100$$

En donde: $g_{sólido}$ corresponde al residuo que queda en el filtro de crisol después de la digestión ácida, $g_{cenizas}$ es igual a al residuo después de la ignición y $g_{biomasa\ seca}$ equivale a la cantidad de material hidrolizado en peso seco.

$$\% Lignina\ total = \% LSA + \% LIA$$

Cuantificación de azúcares

Para llevar a cabo la cuantificación de azúcares el jarabe obtenido de la digestión ácida, éste fue neutralizado con $CaCO_3$ necesario para llegar a un pH de 5-6, después se pasó por filtros de 0.45 μm .

Los azúcares totales se midieron utilizando el método de fenol-sulfúrico, por lo cual se empleó una solución estándar de glucosa de 100 $\mu g/mL$ para realizar una curva de calibración (anexo A). Para la muestra proveniente de la digestión ácida, en tubos de ensaye etiquetados se colocó 1 mL del jarabe diluido en agua y a cada tubo se le adicionó 1 mL de solución de fenol al 5%, se mezcló y se agregaron cuidadosamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente (aproximadamente 30 min) y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 480 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua destilada.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Los azúcares reductores se midieron utilizando el reactivo de DNS*, para lo cual se empleó una solución estándar de glucosa de 1 mg/mL (anexo A). En tubos de ensaye etiquetados se colocó 1 mL del jarabe obtenido de la digestión diluido en agua y a cada tubo se le adicionó 1 mL del reactivo de DNS, se mezcló y posteriormente se calentó por 5 min en un baño de agua a ebullición, los tubos se enfriaron en agua fría y se agregaron 8 mL de agua destilada. Se determinó la absorbancia a 540 nm frente a un blanco de reactivos y agua destilada tratado de la misma manera que la muestra.

*El reactivo de DNS se prepara disolviendo 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 50 mL de agua destilada, se añaden 20 mL de una solución de NaOH 2N, una vez disuelto lo anterior se adicionan 30 g de tartrato de sodio y potasio hasta lograr una mezcla homogénea y se afora a un volumen de 100 mL con agua destilada.

Para el perfil de carbohidratos por HPLC, se hicieron curvas de calibración empleando soluciones stock de glucosa, xilosa, manosa, fructosa, sacarosa, celobiosa, galactosa y maltosa, filtradas con filtros de 0.45 µm. Para la determinación de azúcares se tomaron 900 µL de muestra y se agregaron 100 µL de estándar interno (alanina) con una concentración de 3 mg/mL. Se mezclaron perfectamente y se prosiguió a inyectar la muestra. Una columna de HPLC Pinnacle II Amino Columns marca RESTEK se utilizó para la separación de hidratos de carbono, utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-agua en una proporción de 80:20, tanto el acetonitrilo como el agua se filtraron a través de una membrana de nylon de 45 micras. La temperatura del funcionamiento de la columna fue de 30°C y la tasa de flujo del eluyente fue de 1 mL/min. Para disminuir el tiempo de análisis se utilizó el ensayo de DNS para detectar rápidamente los azúcares obtenidos de la sacarificación en la primera

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

etapa de este estudio Los materiales más prometedores se verificaron usando HPLC, debido a que produce resultados más precisos [18].

El contenido de azúcar de las enzimas y de los materiales se restó de los rendimientos, para así determinar la cantidad real de carbohidratos producidos a partir de la biomasa, la resta se realizó tanto para AT, AR y HPLC.

Sacarificación enzimática sin pretratamiento

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica sin pretratar. Se utilizaron 9 materiales, los cuales fueron: bagazos de caña M1, M2 y M5, madera costeras ixtlán, madera costeras Apapaxco, madera ailé, pasto Taiwán, pasto zacate cadillo y pasto privilegio. Estos materiales fueron hidrolizados con 4 complejos enzimáticos los cuales fueron denominados como: E6, E7, E9 y E10. Las hidrólisis de cada material se realizaron por triplicado.

En tubos de vidrio con taparosca de 30 mL se pesaron 50 mg en peso seco de biomasa y se adicionó el buffer de citratos (0.5 mM pH 4.8) necesario para tener 10% de sólidos, se atemperaron los tubos en el Syncore durante 5 minutos a 50°C y 180 rpm, éstos se retiraron del evaporador y se les agrego 0.045 mL de complejo enzimático, nuevamente se colocaron en el evaporador y se hidrolizó el material durante 1 hora a 50°C y 180 rpm [27]. Posteriormente, la inactivación de la enzima se realizó colocando los tubos en un baño de agua a ebullición por 5 minutos y el sólido se lavó con 4.5 mL de agua destilada. La mezcla se trasvasó a tubos Eppendorff, éstos se colocaron en una microcentrífuga a 20°C y 12000 rpm durante 10 minutos para separar el sólido, el sobrenadante obtenido se filtró con jeringa utilizando filtros de nylon de 0.45 µm. Una vez que se tuvo el líquido filtrado se le determinó azúcares totales y azúcares reductores.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Pretratamiento

El pretratamiento se aplicó a las siguientes muestras: bagazo de caña M5, madera costeras Ixtlán y pasto Taiwán, debido a que son los que obtuvieron mejores rendimientos en la sacarificación sin pretratamiento. Los datos se muestran en la sección de discusión de resultados.

El pretratamiento aplicado fue con cal viva (CaO) comercial, por lo cual se analizó la composición realizando un espectro de infrarrojo, una vez obtenido el espectro de CaO se prosiguió a realizar el pretratamiento.

En tubos de vidrio con taparrosca de 30 mL se pesó 1 g de biomasa y se agregaron 10 mL de solución de cal al 1% (p/v) para tener un 10% de sólidos. Las muestra se introdujeron en un autoclave a 121°C durante 1 hora, una vez que se retiraron los tubos del autoclave se dejaron enfriar y se realizó un lavado con 10 mL de agua, la muestra de transvasó a tubos para centrífuga y se centrifugo a 20°C y 12000 rpm durante 10 min, se separó el sobrenadante y se filtró empleando filtros de porcelana. Una vez obtenido el filtrado se realizó la metodología de lignina soluble a 240 nm (página 20). El sólido obtenido del pretratamiento se lavó con 20 mL de buffer de citratos pH 4.80 y se almacenó en congelación para su uso posterior.

Tabla 1. Condiciones del Pretratamiento con Cal [18].

Parámetro	Condición
Temperatura	121°C
Tiempo	1 hora
% Sólidos (% p/v)	10
Concentración de CaO (% p/v)	1

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Sacarificación enzimática con pretratamiento

El sólido congelado del pretratamiento se puso a secar en estufa a 40°C durante 24°C, se retiró de la estufa y se colocó en un desecador, posteriormente se determinó humedad por el método de secado en Termobalanza.

En tubos de vidrio de 30 mL con taparrosca se pesaron 50 mg en peso seco de biomasa y se adicionó buffer de citratos pH 4.80 necesario para tener 10% de sólidos, los tubos se atemperaron en el evaporador durante 5 minutos a 50°C y 180 rpm. Los tubos fueron retirados del Syncore y se les agregó 0.045 mL de complejo enzimático, nuevamente se colocaron en el evaporador y se hidrolizó el material durante 1 hora a 50°C y 180 rpm. La inactivación de la enzima se realizó colocando los tubos en un baño de agua a ebullición por 5 minutos y el sólido se lavó con 4.5 mL de agua destilada. La mezcla se trasvasó a tubos Eppendorff, éstos se colocaron en una microcentrífuga a 20°C y 12000 rpm durante 10 minutos para separar el sólido, el sobrenadante obtenido se filtró con jeringa utilizando filtros de nylon de 0.45 µm. Una vez que se tuvo el líquido filtrado se le determinó azúcares totales y azúcares reductores, y se realizó un perfil de carbohidratos por HPLC.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Caracterización de materiales lignocelulósicos (Digestión ácida)

Se realizó la caracterización de los materiales lignocelulósicos mediante el método de digestión ácida, con la cual se obtuvo el contenido de azúcares totales (AT), azúcares reductores (AR), lignina total (LT), lignina soluble en ácido (LSA), lignina insoluble (LI), así como el contenido de humedad y cenizas.

En la tabla 2, se observa que el contenido de AT y AR varía entre los materiales, en el caso de los bagazos se tiene 57.5-66.8% AT y 42.8-48.7% AR, para los pastos se obtuvieron concentraciones de 66.5-75.8% AT y 53.2-60.1% AR, mientras que para las maderas fue de 65.8-71.0% AT y 43.0-66.6% AR.

Éstos materiales contienen un porcentaje importante tanto de azúcares totales como reductores y representan el 100% teórico que puede alcanzarse durante la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con pretratamiento, mientras que el porcentaje de lignina soluble se utilizará para calcular la eficiencia del pretratamiento que se lleve a cabo.

En términos de composición química, los bagazos y los pastos ofrecen los mayores contenidos de azúcares con un contenido bajo de lignina, como el pasto privilegio 75.88 y 22.48% respectivamente. Por lo que se considera que la resistencia de estos materiales lignocelulósicos a la sacarificación y a la liberación de azúcares fermentables sería reducida. Por otra parte, la biomasa maderable con respecto a los otros materiales presentarían dificultades técnicas, pues a pesar de que tienen una gran cantidad de azúcares presentan mayor cantidad de lignina (46.40%), lo cual dificulta acceder a estos azúcares.

Se calculó la relación AT/LT (tabla 3) lo cual da un indicio de la accesibilidad de la celulosa y hemicelulosa a la hidrólisis a azúcares fermentables. Un material con baja relación AT/LT

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

será más difícil de sacarificarlo mientras que un subproducto con un valor alto de la relación AT/LT nos indica que los carbohidratos están más accesibles a la sacarificación.

El bagazo de caña M1 es el material con el cual se obtienen más azúcares totales (AT) y azúcares reductores (AR) siendo 66.81% y 44.29% respectivamente, mientras que el pasto privilegio es el que presenta una mayor cantidad de azúcares siendo 75.88% AT y 60.12 % AR, por otra parte, la madera de la cual se podría obtener mayor cantidad es la madera ailé con 71.0% AT y 66.6 % AR (tabla 2).

Es importante tomar en cuenta el Grado de Polimerización (GP) de los azúcares hidrolizados, el cual se define como el número de unidades monoméricas en una macromolécula o una molécula oligomérica, un bloque o una cadena [27]. Una forma de clasificar a los carbohidratos es en función de su GP, agrupándolos en azúcares con valor de 1 para monosacáridos y 2 para disacáridos, oligosacáridos de 3 a 9 moléculas y polisacáridos con más de 10 moléculas [27]. De acuerdo a lo anterior, se determinó el GP de los materiales lignocelulósicos mediante la relación de la concentración de azúcares totales en base a los azúcares reductores obtenidos en cada material. En el presente trabajo, el GP es un valor promedio de todos los oligosacáridos y polisacáridos solubles presentes en el jarabe en estudio y no refleja la distribución de la masa molecular. En la tabla 3, se observa que los 9 materiales lignocelulósicos tiene un GP cercano a 1 lo cual indica que se los azúcares presentes en el jarabe podrían ser en su mayoría monosacáridos. Dentro de los materiales utilizados que presentan menor grado de polimerización se pueden mencionar el bagazo de caña M5 (1.34), al pasto zacate Cadillo (1.25) y la madera costeras Ixtlán (1.01).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Tabla 2. Resultados de la caracterización de los materiales lignocelulósicos.

Material	*AT (%)	SD	*AR (%)	SD	Lignina soluble (%)	SD	Lignina Insoluble (%)	SD	Lignina total (%)	Cenizas (%)	SD	Humedad (%)	SD
Bagazo de caña M1	66.81	0.00	44.29	0.88	6.00	0.44	19.64	0.42	25.62	4.67	0.18	3.08	0.15
Bagazo de caña M2	66.70	1.41	48.74	1.17	10.05	1.05	19.23	0.19	29.28	4.28	0.06	2.98	0.11
Bagazo de caña M5	57.52	1.38	42.89	1.79	4.99	0.09	28.24	0.93	33.23	6.25	0.19	2.99	0.11
Pasto privilegio	75.88	4.17	60.12	3.58	6.85	0.04	15.63	0.62	22.48	10.51	0.76	2.94	0.006
Pasto Taiwán	66.58	2.29	53.28	2.06	5.72	0.004	21.53	3.57	27.25	8.96	0.19	3.66	0.09
Pasto zacate cadillo	68.15	5.94	56.78	2.89	6.20	0.02	20.73	8.84	26.93	6.16	0.25	3.46	0.09
Madera ailé	71.00	0.01	66.6	0.00	2.80	0.29	32.80	3.22	35.60	0.96	0.09	0.89	0.15
Madera costeras de Apapaxco	66.00	0.01	43.00	0.01	1.80	0.005	44.60	0.38	46.40	0.72	0.64	6.70	0.13
Maderas costeras Ixtlán	65.87	2.93	66.57	0.63	2.48	0.07	29.78	0.96	32.26	0.20	0.02	6.35	0.04

*AT = Azúcares totales y AR = Azúcares reductores

Tabla 3. Grado de polimerización y relación *AT/LT de los materiales lignocelulósicos.

	Bagazo de caña M1	Bagazo de caña M2	Bagazo de caña M5	Pasto privilegio	Pasto Taiwán	Pasto zacate cadillo	Madera ailé	Madera costeras de Apapaxco	Madera costeras Ixtlán
*GP	1.51	1.37	1.34	1.26	1.25	1.20	1.06	1.53	1.01
Relación *AT/LT	2.61	2.28	1.73	3.37	2.44	2.53	1.99	1.41	2.04

*GP = Grado de polimerización y AT/LT = Azúcares totales/ Lignina total

Hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos sin pretratamiento

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos sin pretratamiento fue necesario primeramente realizar lavados a los materiales, esto con el fin de cuantificar los azúcares provenientes de dichos materiales (tabla 4).

Tabla 4. *Valores de AT y AR provenientes del lavado de los materiales.

Material lignocelulósico	% Azúcares totales (p/p)	% Azúcares reductores (p/p)
Bagazo de caña M1	1.96	0.96
Bagazo de caña M2	1.06	0.77
Bagazo de caña M5	4.95	2.98
Pasto privilegio	6.10	6.00
Pasto Taiwán	2.00	2.00
Pasto zacate cadillo	4.00	4.00
Madera ailé	0.00	0.00
Costeras de Apapaxco	0.00	0.00
Costeras Ixtlán	0.00	0.00

*Incluyen la resta de los azúcares de la enzima y el factor de corrección anhidra.

Con estos datos se observa que algunos materiales contienen cantidades significativas de azúcares como es el caso del bagazo de caña M5, pasto privilegio y pasto zacate cadillo. Cuantificar éstos azúcares es importante ya que éstos pueden ser fuente de azúcares susceptibles de fermentación a etanol, aunque no está claro aún la factibilidad de recuperar esos azúcares para su fermentación.

Aunque se esperaba que el bagazo de caña M1 “salida molino” presentara mayor concentración de azúcares, no fue así. Ya que éste material es resultado de la etapa de obtención de azúcar, en esta fase es donde la caña se descarga en las mesas transportadoras y pasa a través de las desfibradoras, para disminuir su tamaño y facilitar la extracción del jugo en los molinos, después comienza la molienda a través de un tándem de molinos que extraen el jugo de la caña. En el recorrido de la caña se agrega agua,

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

generalmente caliente para extraer al máximo la cantidad de sacarosa que contiene el material fibroso [29], el bagazo que sale de la última molienda es conducido a una bagacera para que se seque y luego se va a las calderas como combustible, produciendo el calor y el vapor de alta presión que se emplea en las turbinas de los molinos o bien en la producción de bioetanol de segunda generación. Toda la manipulación por la cual pasa este material explica que tenga menos del 2% de AT, este valor muestra lo exhausto de la extracción de la sacarosa, las estadísticas de la Unión Nacional de Cañeros de México 2013 mencionan un porcentaje de extracción del 95.19% [11].

El bagazo que no se ocupa en las calderas es recolectado en un patio, y es a éste al que denominamos con bagazo de caña M2 “caída patio”, con el paso del tiempo este bagazo que es almacenado sufre un cambio debido a que en el ambiente se encuentran hongos que son capaces de degradar la celulosa dejando a la lignina casi intacta y causan un color pardo, a esto se le llama podredumbre parda, esto explica que los AT y AR también sean muy bajos. También existen hongos de podredumbre blanca, éstos degradan la lignina dejando un tono blanquecino. Este bagazo que ya ha sufrido modificaciones es al que se le denomino como bagazo de caña M5 “pitiquito fermentado”, es por esto que como se observa en la siguiente figura este bagazo muestra diferencias en color en comparación con los otros dos, es probable que por eso este bagazo presente una concentración de azúcares mayor en comparación con los otros dos, pues al degradar la celulosa los microorganismo la dejaron una parte disponible y es la que está siendo cuantificada.



Figura 11. Bagazos de caña M1, M2 y M5.

Una vez realizados los lavados en los materiales se continuó con la hidrólisis enzimática sin pretratamiento, para la cual se utilizaron cuatro preparaciones enzimáticas (E6, E7, E9 y E10). Las preparaciones presentan actividad de celulasa, endocelulasa, exocelulasa, xilanasas y β -glucosidasa. El valor de la actividad en unidades de papel filtro (FPU) son: E6 194.73, E7 264.28, E9 445.78 y E10 185.0 FPU/mL. Dichas actividades fueron determinadas anteriormente en otro estudio utilizando un método para determinar la actividad de la celulasa, en términos de las unidades de papel filtro por mililitro de enzima. Éste método cuantifica la obtención de 2 mg de azúcares reductores, en este caso glucosa, a partir de 50 mg de papel filtro y que corresponde a una conversión del 4% en 60 minutos [26].

Después de la sacarificación a los resultados obtenidos se les restaron los azúcares del coctel enzimático y los contenidos en el material para conocer la cantidad real de azúcares producidos a partir de la biomasa. Después se realizó una corrección anhidra con un factor de 0.9, debido a que durante la hidrólisis, la conversión de carbohidratos poliméricos en monómeros resulta con la adición de un átomo de hidrogeno y un grupo hidroxil para cada monómero (mediante una molécula de agua), esta corrección anhidra es utilizada para

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

convertir matemáticamente los valores monoméricos a los valores de la estructura polimérica [28].

Se realizó la sacarificación enzimática de los materiales sin ningún pretratamiento, para que posteriormente se puede evaluar la eficiencia de la hidrólisis con pretratamiento.

En el gráfico 2 se muestra la cantidad de AT y AR generados en la sacarificación enzimática utilizando el complejo enzimático E6 sin pretratamiento.

El porcentaje de AT es mayor para el M2 (13.08%) en el caso de los bagazos, el pasto Taiwán presenta un 14.06% y costeras de Apapaxco 3.90%. mientras que los azúcares reductores son mayores en bagazo de caña M5 (4.87%), pasto Taiwán (14.54%) y árbol ailé (2.29%), recordemos que lo que importa es la generación de azúcares reductores ya que en caso de ser glucosa ésta puede ser fermentada para la producción de bioetanol. El Bagazo de caña M5 alcanza la mayor eficiencia tanto para AT y AR siendo 21.26% y 11.36% respectivamente (gráfico 2), además presenta un grado de polimerización de 2.5 (tabla 5) y se espera que con el pretratamiento este se disminuya cercano a 1. En el caso de los pastos la mayor eficiencia se alcanza con el pasto Taiwán 21.93% AT y 27.29% AR, y presenta un grado de polimerización de 1, esto nos indica que los azúcares que se están generando son monosacáridos por lo cual éstos pueden ser susceptibles de fermentación a bioetanol, además de que con un pretratamiento es posible aumentar este rendimiento. En el caso de las maderas costeras, la de Apapaxco presenta la mayor eficiencia (13.89% AT y 3.36% AR), sin embargo la de Ixtlán es la que presenta un menor GP y su eficiencia podría ser mejorada con la aplicación de un pretratamiento. En general, los rendimientos de estas sacarificaciones sin pretratamiento tienden a ser bajos con E6, lo cual podría mejorarse con un pretratamiento; ya que en otros estudios se ha logrado aumentar hasta 4 veces la

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

concentración de glucosa (153 a 659 mg de glucosa/g de biomasa seca) y hasta 10 veces la concentración de xilosa (20 a 197 mg de xilosa/g de biomasa seca), estos drásticos incrementos en la concentración de xilosa se ha observado en estudios sobre el pasto varilla y la madera de alamo [18].

$$\% \text{ Eficiencia en AT} = \frac{\% \text{ AT con hidrólisis enzimática}}{\% \text{ AT con hidrólisis ácida}} \times 100$$

$$\% \text{ Eficiencia en AR} = \frac{\% \text{ AR con hidrólisis enzimática}}{\% \text{ AR con hidrólisis ácida}} \times 100$$

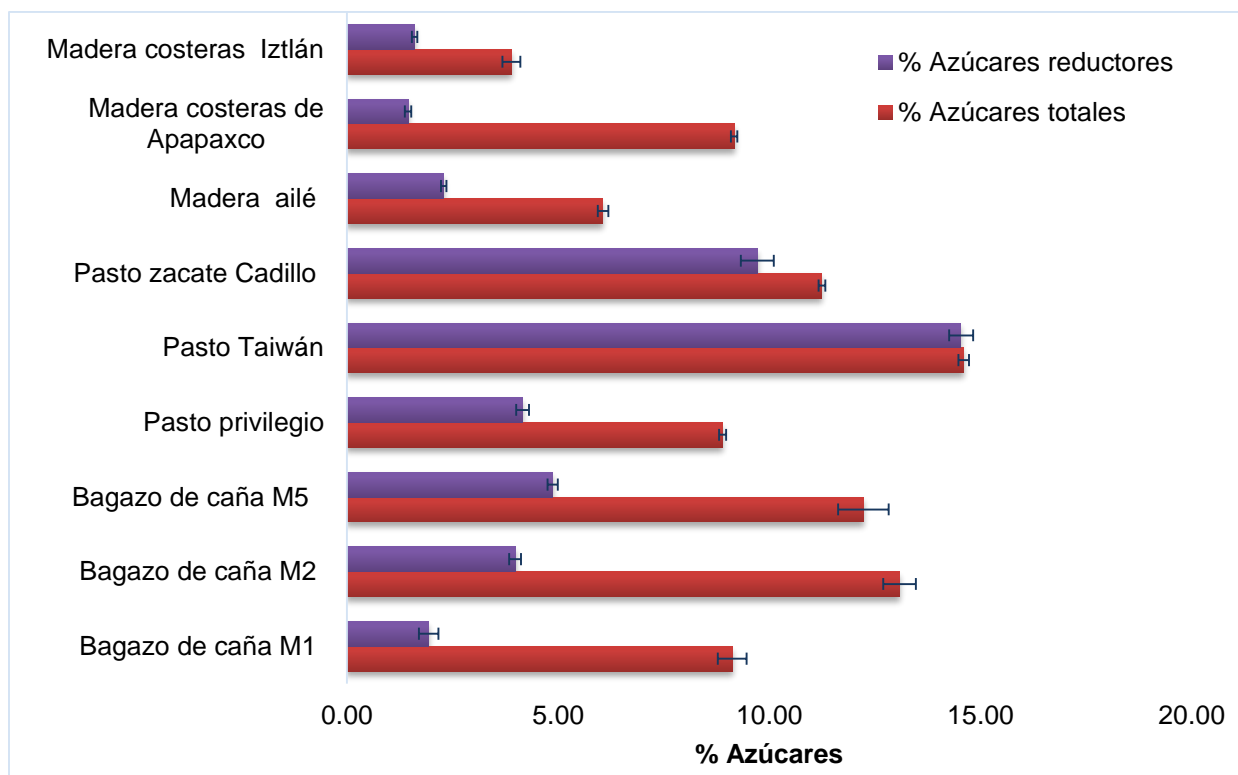


Gráfico 2. Porcentaje de azúcares generados en la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E6.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

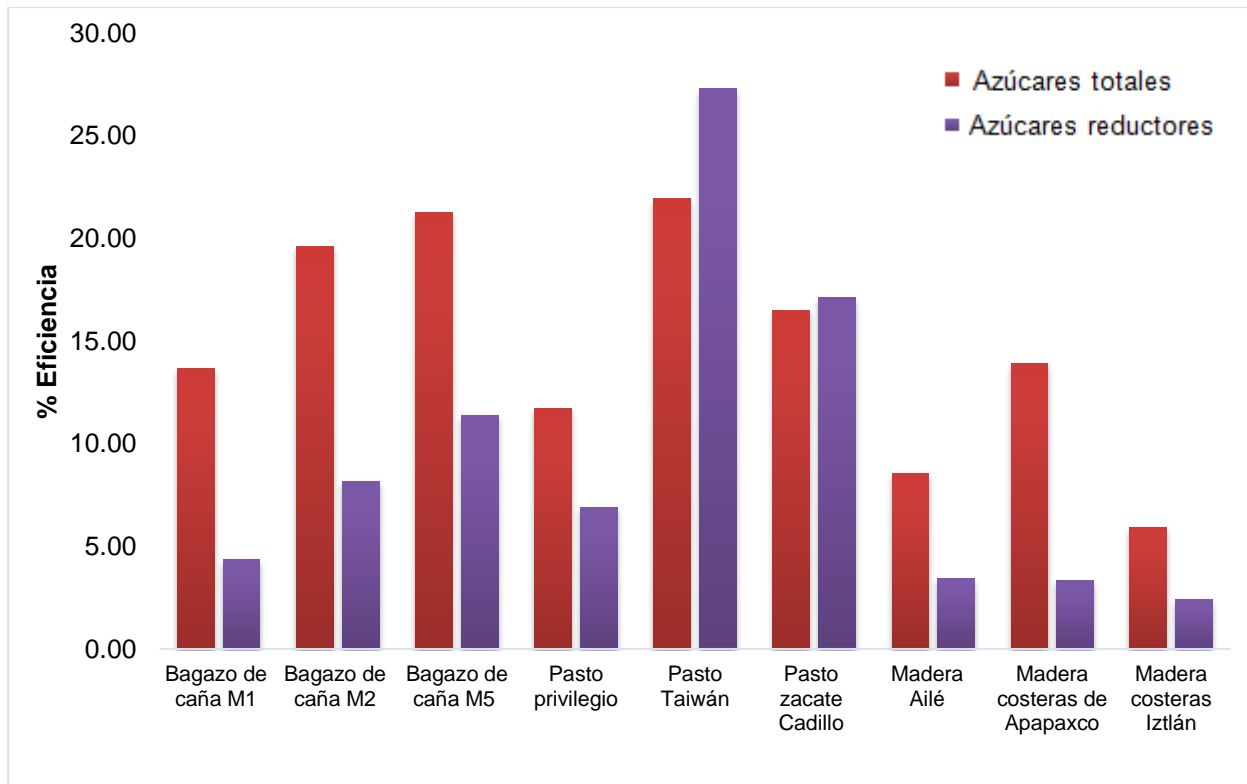


Gráfico 3. Eficiencia de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E6.

Tabla 5. Grado de polimerización con el complejo E6.

Material	GP
Bagazo de caña M1	4.7
Bagazo de caña M2	3.3
Bagazo de caña M5	2.5
Pasto privilegio	2.9
Pasto Taiwán	1
Pasto zacate Cadillo	1.2
Madera ailé	2.6
Madera costeras de Apapaxco	6.4
Madera costeras Iztlán	2.4

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En el gráfico 4 se muestra la cantidad de AT y AR generados en la sacarificación enzimática utilizando el complejo enzimático E7 sin pretratamiento.

Los bagazos M1 y M2 presentan aproximadamente la misma concentración en AT siendo aproximadamente del 12% (gráfico 4), sin embargo el bagazo de caña M5 presenta la mayor concentración de AR (7.23%) con respecto a los otros dos bagazos, también presenta la mayor eficiencia tanto en AT como en AR siendo 21.13% en el primer caso y 16.85% en el segundo (gráfico 4) y presenta un GP de 1.7 al igual que el bagazo de caña M2 (tabla 6). En los pastos se observa una mayor concentración de AT para el pasto privilegio siendo de 17.07%, pero se generan 2.67% de AR, en cambio el pasto Taiwán se generan 14.99% AT y 13.99% AR (gráfico 2), lo cual indica que casi en su totalidad los azúcares que se generan son reductores, lo cual es conveniente para la producción de etanol, así mismo este material presenta la mayor eficiencia (21.51% AT y 26.26% AR) (gráfico 5), y presenta un GP de 1.1 (tabla 6) al igual que el Pasto Cadillo, sin embargo este último presenta menor eficiencia para ambos azúcares. La madera que genera más AT es costeras Ixtlán con 9.40% mientras que árbol Ailé genera más AR (4.08%), sin embargo costeras Ixtlán presenta la mayor eficiencia en AT (14.27%), lo cual se espera que aumente con el pretratamiento.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

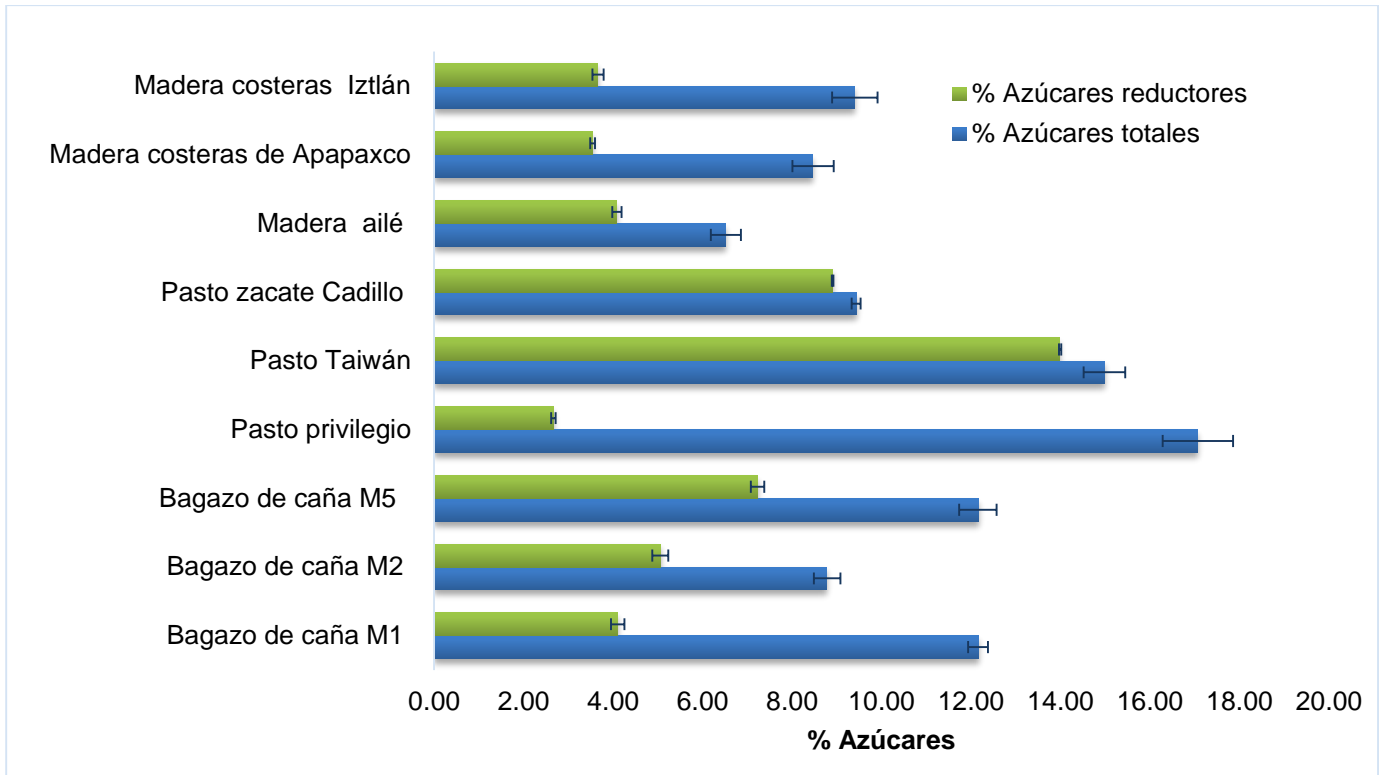


Gráfico 4. Porcentaje de azúcares generados de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E7.

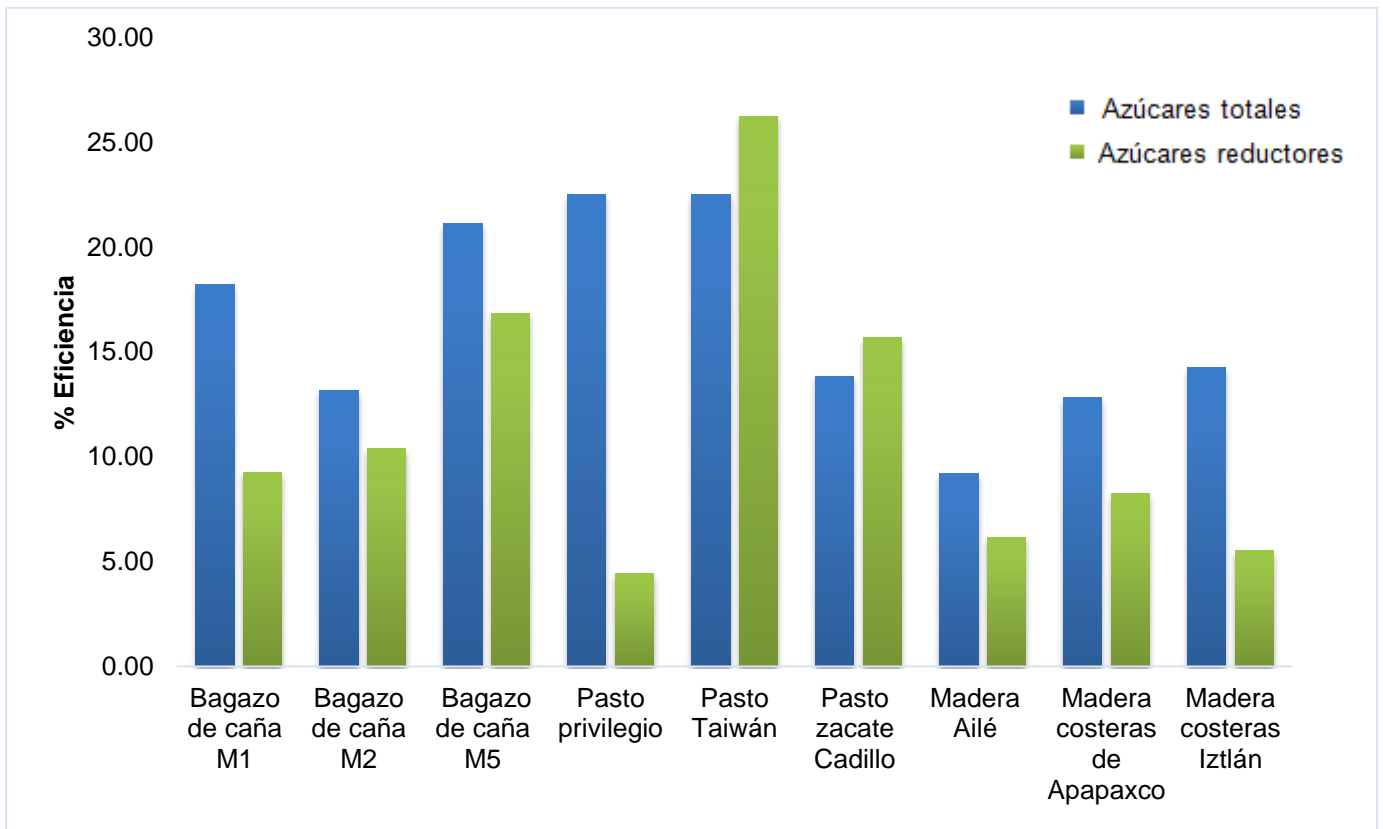


Gráfico 5. Eficiencia de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E7.

Tabla 6 Grado de Polimerización con el Complejo E7

Material	GP
Bagazo de caña M1	3
Bagazo de caña M2	1.7
Bagazo de caña M5	1.7
Pasto privilegio	10.8
Pasto Taiwán	1.1
Pasto zacate cadillo	1.1
Madera ailé	1.6
Madera costeras de Apapaxco	2.4
Madera costeras Ixtlán	2.6

En el gráfico 6 se muestra la cantidad de AT y AR generados en la sacarificación enzimática utilizando el complejo enzimático E9 sin pretratamiento.

En este caso el bagazo de caña M5 presenta la mayor concentración de AT y AR con respecto a M1 y M2 siendo 18.62% AT y 9.47 % AR (gráfico 6), además presenta la mayor eficiencia para ambos azúcares siendo 32.37% AT y 22.08% AR (gráfico 7) y un GP de 2 (tabla 7). A pesar de que el pasto privilegio presenta la mayor concentración de AT (21.30%), su concentración de AR (10.04%) es dos terceras partes de las que se producen con el pasto Taiwán (15.76%), además con éste último se produce la mayor eficiencia en AT y AR (31.23% y 29.59%), así como el menor GP (1.3). Con respecto a las maderas costeras, Ixtlán presenta la mayor concentración de AT (20.13%) y su eficiencia es de 30.56%, a pesar de que el menor GP se obtiene con árbol ailé (3.3). Se espera que con el pretratamiento se obtenga una mayor eficiencia en AR con maderas costeras Ixtlán ya que éste presenta una mayor concentración de AT.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

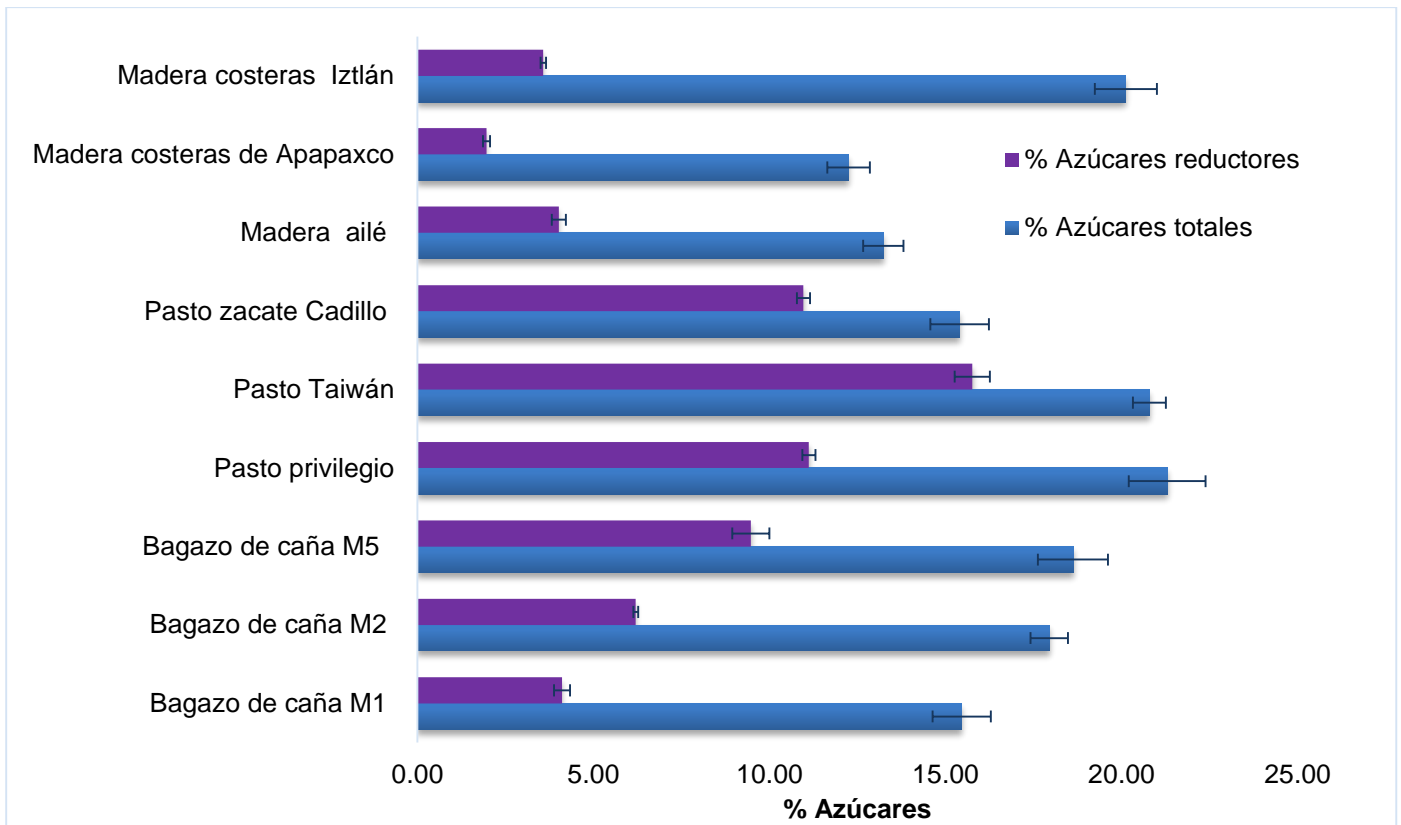


Gráfico 6. Azúcares generados de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E9.

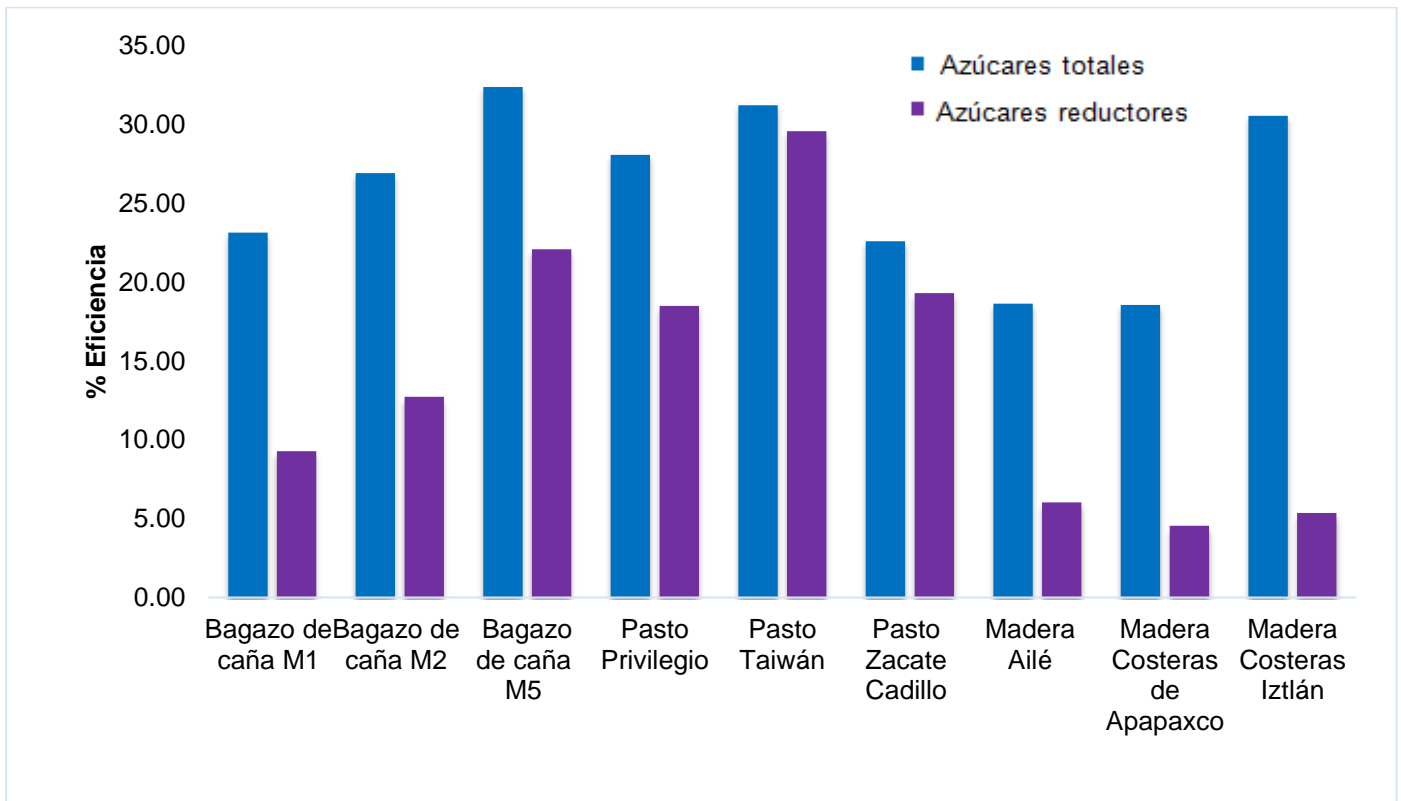


Gráfico 7. Eficiencia de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E9.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Tabla 7. Grado de Polimerización con el Complejo E9

Material	GP
Bagazo de Caña M1	3.8
Bagazo de Caña M2	2.9
Bagazo de Caña M5	2
Pasto Privilegio	2.1
Pasto Taiwán	1.3
Pasto Zacate Cadillo	1.4
Madera Ailé	3.3
Madera Costeras de Apapaxco	6.3
Madera Costeras Ixtlán	5.6

En el gráfico 8 se muestra los datos obtenidos en la sacarificación enzimática con el complejo E10 sin pretratamiento.

Aquí, el bagazo de caña M5 presenta la mayor concentración en AT y AR (14.92% y 8.97%) (gráfico 8) con respecto a los bagazos M1 y M2, así mismo presenta la mayor eficiencia para ambos azúcares siendo 25.94% AT y 20.91% AR (gráfico 8) y el menor GP (1.7) (tabla 8). Por otra parte el pasto Taiwán presenta la mayor concentración de AT y AR (16.14% y 14.69%) (gráfico 8), así como la mayor eficiencia para éstos (24.24% AT y 27.58% AR) (gráfico 9) y tiene un GP de 1.1 (tabla 8). En el caso de las maderas la que presenta mayor concentración de AT y AR es costeras Ixtlán (7.20% y 6.18%) (grafico 8), así como la mayor eficiencia en AT la cual presenta un valor de 10.93% (gráfico 9), a pesar de que con árbol ailé se obtiene un GP de 1 (tabla 8), se espera que con el pretratamiento no sólo se generen más AT con costeras Ixtlán sino que también estos azúcares que se produzcan sean reductores.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

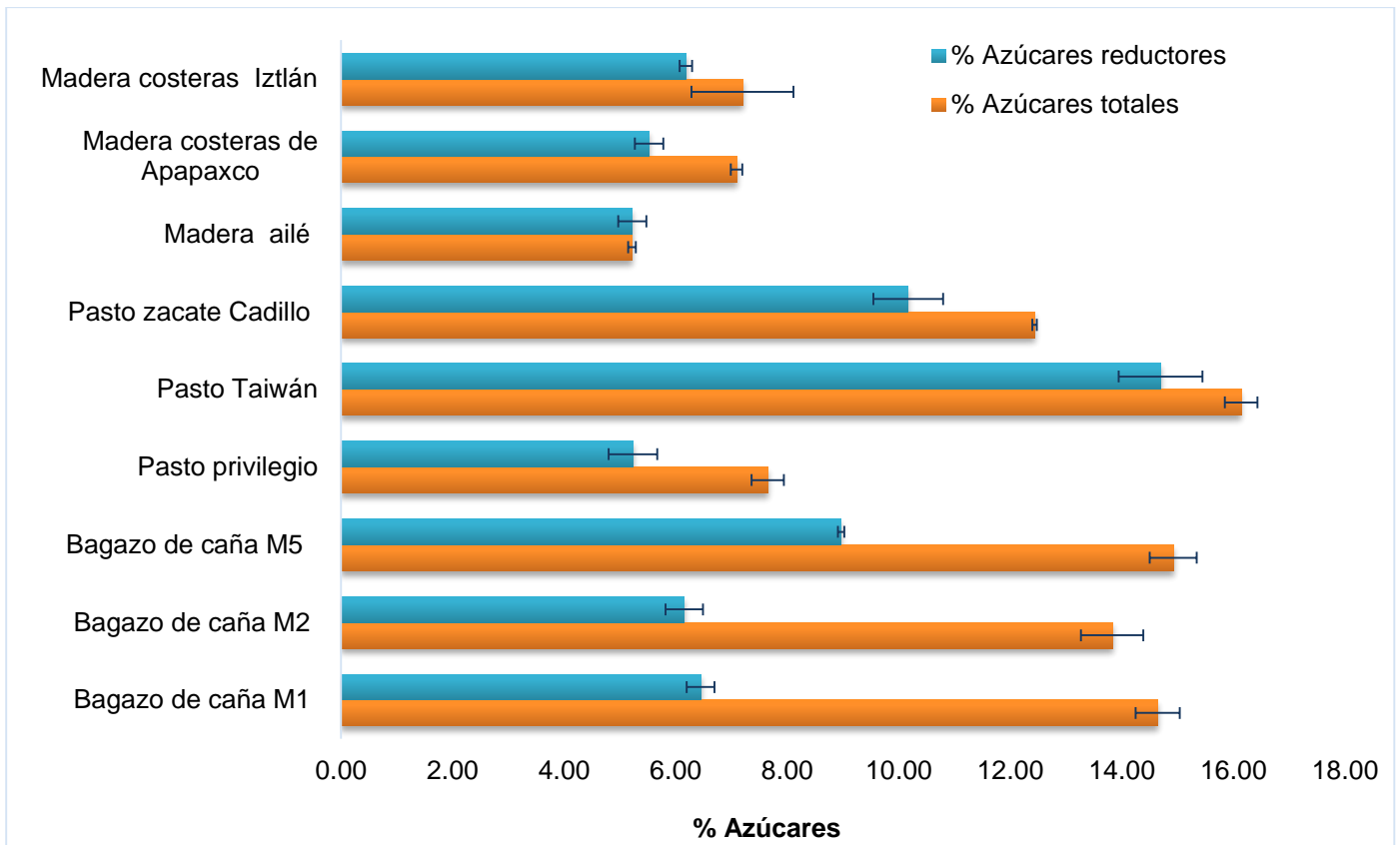


Gráfico 8. Porcentaje de azúcares generados de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E10.

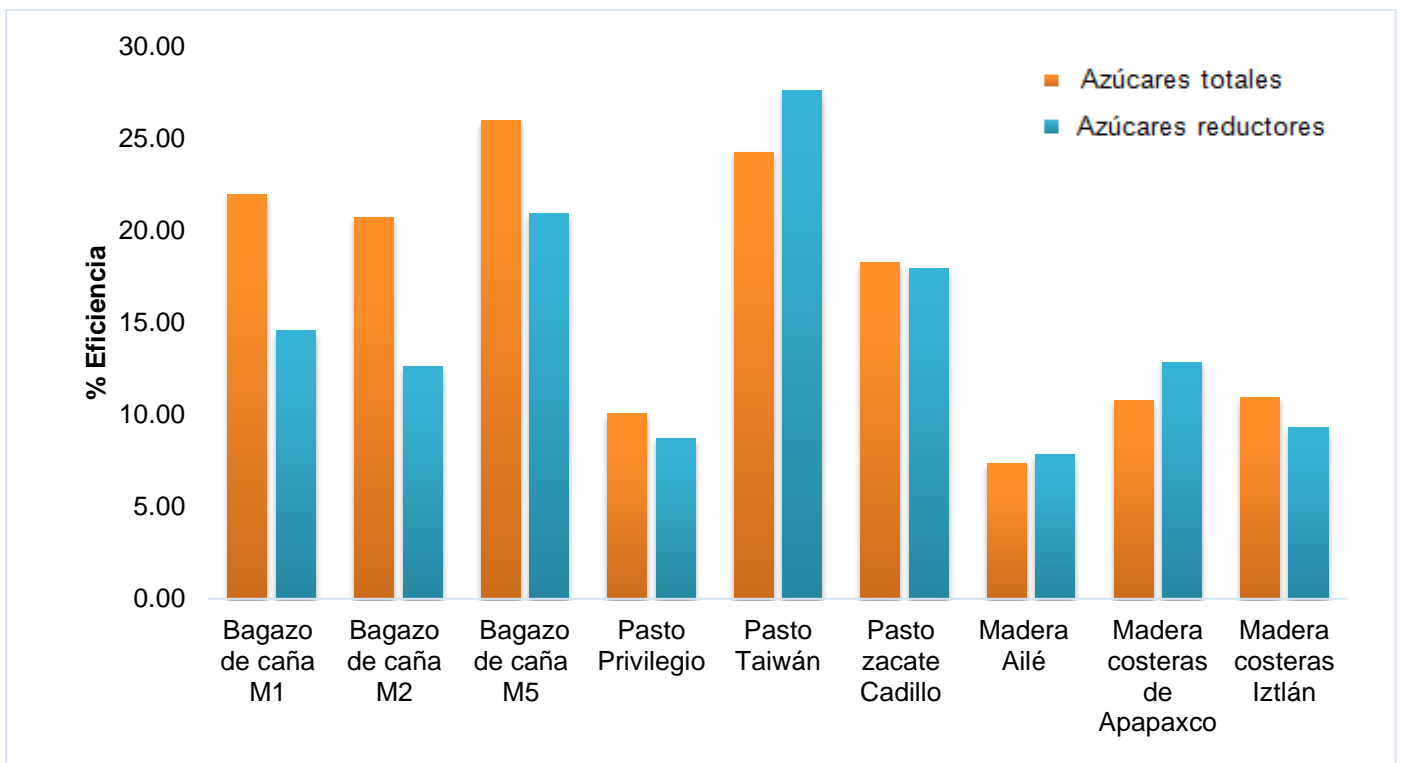


Gráfico 9. Eficiencia de la sacarificación enzimática sin pretratamiento y con el complejo E10.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Tabla 8 Grado de polimerización con el complejo E10

Material	GP
Bagazo de caña M1	2.3
Bagazo de caña M2	2.2
Bagazo de caña M5	1.7
Pasto privilegio	1.8
Pasto Taiwán	1.1
Pasto zacate Cadillo	1.2
Madera áilé	1
Madera costeras de Apapaxco	1.3
Madera costeras Ixtlán	1.2

De acuerdo a los resultados anteriores, se observa que la mayor concentración de azúcares se tiene con los complejos enzimáticos E7 y E9, y es acorde a lo esperado debido a que estos complejos presentan mayor actividad FPU en comparación con los complejos E6 y E10, además se obtienen eficiencias hasta de 22% AT y 26% AR, esto para E7. Mientras que con E9 se obtienen eficiencias hasta de 32% AT y 29% AR. Así mismo los materiales con los que se obtuvo una mayor concentración ya sea en AT y AR así como mayores eficiencias en alguno de estos azúcares y menor grado de polimerización con estos complejos enzimáticos fueron los siguientes: bagazo de caña M5, pasto Taiwán y costeras Ixtlán. Por lo cual se decidió que el pretratamiento sería aplicado sólo a estos materiales empleando los complejos enzimáticos E7 y E9.

Pretratamiento básico

Antes de llevar a cabo el pretratamiento, se realizó un espectro de infrarrojo (IR) a la cal viva que se adquirió y uno a cal común de tlalalería, esto con el fin de comparar y asegurarse que se tenía CaO (cal viva), en la siguiente figura se muestra el espectro obtenido.

En el espectro IR (figura 12) en ambos espectros se observan bandas en 600 y 1500 cm^{-1} corresponden a impurezas de CaCO_3 [30].

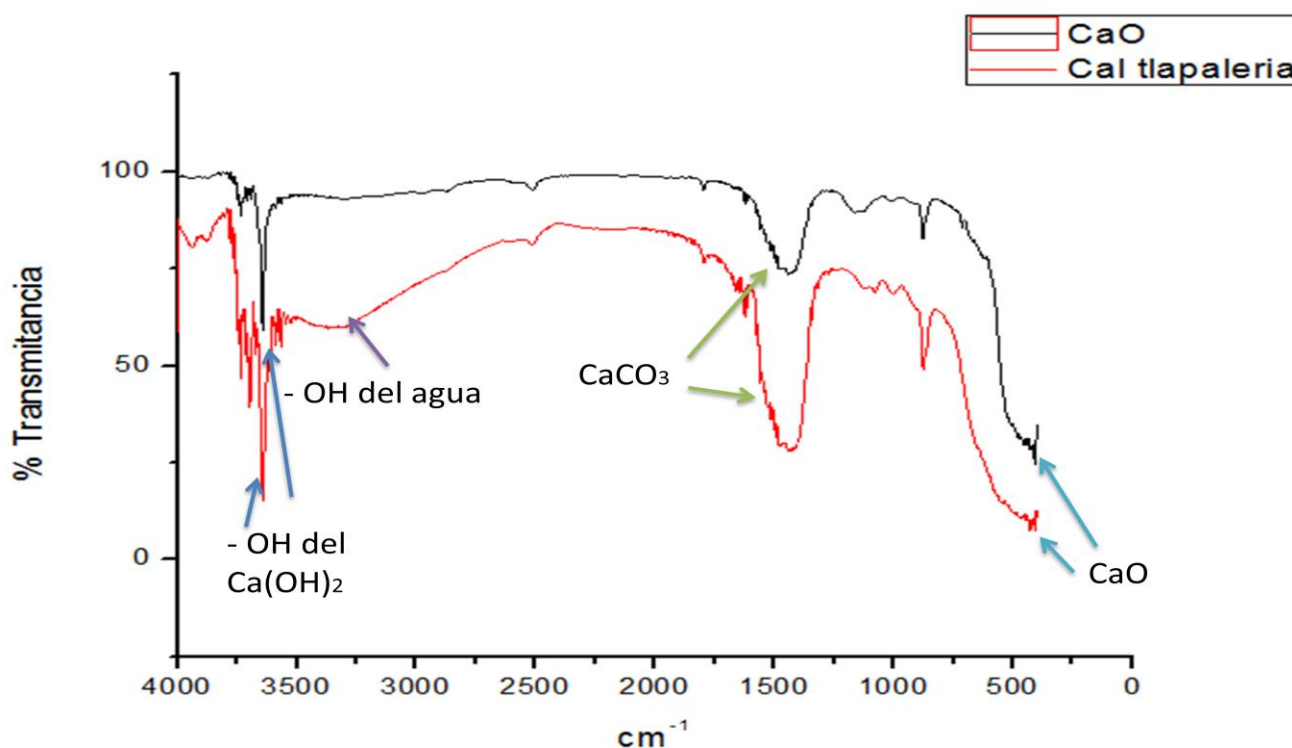


Figura 12. Espectro de infrarrojo de la cal.

En 400 cm^{-1} se observa la banda correspondiente al CaO para los dos tipos de cal que con las que se contaba, para la cal de tlalalería se observa una banda ancha aproximadamente en 3300 cm^{-1} la cual corresponde al grupo -OH del agua, por lo cual se puede asegurar que esta cal ya estaba hidratada (apagada) y es por eso que en el espectro de la cal viva esta banda está ausente, sin embargo ambas muestran la presencia del Ca(OH)_2 , pues la banda

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

que está en 3600 cm^{-1} aproximadamente es la correspondiente al grupo $-\text{OH}$ del hidróxido de calcio. Sin embargo la intensidad de esta banda es mucho menor en el espectro correspondiente a la cal viva (CaO). Por lo tanto como esta banda de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es menor y está ausente la de agua, usaremos la cal viva [30].

Para corroborar que la cal que se adquirió era cal viva se realizó una solución al 1% (p/v) a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y se observó un incremento de temperatura obteniendo un ΔT de $7\text{ }^\circ\text{C}$, lo cual nos da un indicio que la cal presentaba $\text{Ca}(\text{OH})_2$, probablemente esto se debió a la manipulación que se tuvo con el reactivo, pues la cal viva es un producto inestable, por tener gran avidez para el agua y genera un ΔT de $15\text{ }^\circ\text{C}$ [22].

El pretratamiento se realizó con esta cal viva, CaO (1% p/v) a $121\text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora [18] y las muestras fueron analizadas por las técnicas de fenol-sulfúrico y lignina soluble mencionadas anteriormente mostrando los siguientes resultados.

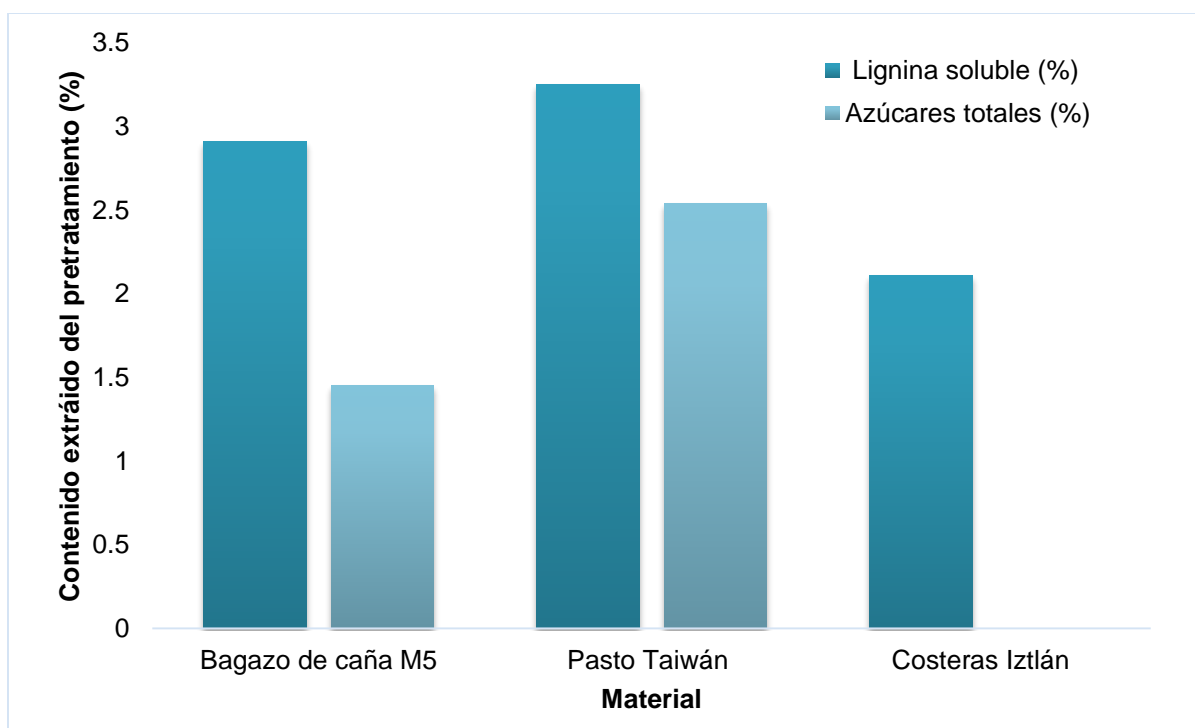


Gráfico 10. Contenido de AT y LS del jarabe resultante del pretratamiento básico de los subproductos lignocelulósicos.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En el gráfico anterior se presenta el contenido de lignina soluble y azúcares totales cuantificados en el jarabe obtenido del pretratamiento, en éste se observa que el pretratamiento básico permitió remover una fracción de la lignina de los subproductos lignocelulósicos, solubilizando también una parte de carbohidratos provenientes de la hemicelulosa [31], esto se sabe debido a que en el jarabe de estudio se lograron cuantificar azúcares, que en el grafico son mostrados como %AT. También se observa que el pretratamiento tuvo mejor efecto para el bagazo de caña M5 y pasto Taiwán. El nivel de lignina soluble para maderas costeras Ixtlán resultó ser el más bajo de los tres subproductos lignocelulósicos pretratados, debido a que las maderas, en general son materiales más difíciles de pretratar.

Estos resultados muestran que la cal fue capaz de remover una fracción de lignina y hemicelulosa, lo cual permitirá aumentar la accesibilidad a la celulosa y la efectividad de las enzimas [20].

Se calculó la eficiencia de los materiales lignocelulósicos pretratados mostrándose los resultados el gráfico 11. Esta eficiencia se calculó en base a la lignina soluble obtenida de la caracterización de los materiales, debido a que se considera que es la cantidad máxima a ser removida, por lo cual en este trabajo se define la eficiencia del pretratamiento con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Eficiencia LS} = \frac{\% \text{ Lignina soluble con pretratamiento}}{\% \text{ Lignina soluble de la caracterización}} \times 100$$

El grado de deslignificación refleja la efectividad del pretratamiento, determinado por el aumento del contenido de lignina soluble en la fase líquida resultante [32]. A pesar de que con Costeras Ixtlán se obtiene una eficiencia de 85.12% su valor de lignina soluble es la

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

mitad comparado con los otros dos materiales (Tabla 2), por lo cual probablemente no sea lo suficiente para obtener altas concentraciones de AT y AR en la sacarificación. Sin embargo el pretratamiento parece ser prometedor para el bagazo de caña y el pasto Taiwán debido a que se está removiendo más del 50% de la lignina soluble y se remueve una pequeña cantidad de azúcares provenientes de la hemicelulosa [31], lo cual permitirá que las enzimas puedan acceder más fácilmente a la celulosa y así producir una mayor cantidad de azúcares que lo obtenido sin pretratamiento, pues uno de los efectos del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica es incrementar la solubilidad de la lignina para liberar la celulosa y dejarla disponible para mejorar la hidrólisis enzimática [20].

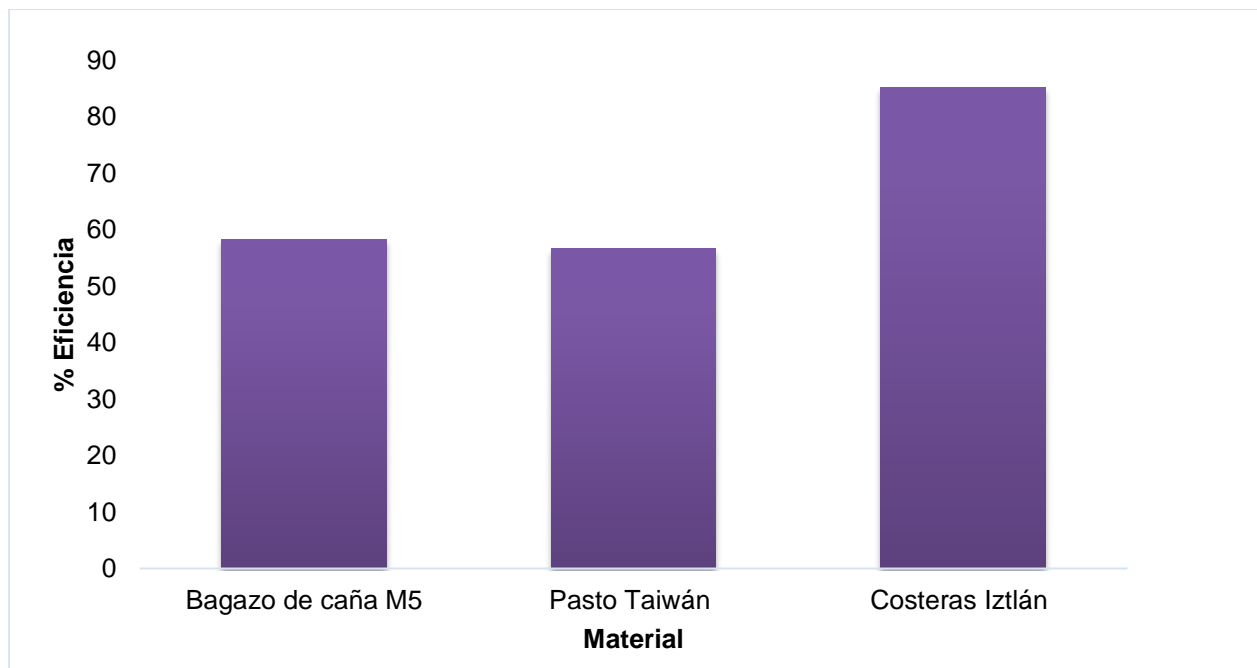


Gráfico 11. Eficiencia del pretratamiento básico con cal determinada por la lignina soluble.

Sacarificación enzimática con pretratamiento

Como se mencionó anteriormente con los complejos enzimáticos E7 y E9 se obtuvieron las mejores eficiencias, por lo cual dichos complejos fueron elegidos para llevar a cabo la sacarificación enzimática a los materiales pretratados.

En el gráfico 12 se muestra la cantidad generada de AT y AR determinadas para los materiales lignocelulósicos pretratados, en dicho grafico se observa que se obtiene una mayor concentración de AT y AR (25.57% y 19.07%) para pasto Taiwán, en comparación con los resultados que se obtuvieron sin pretratar (14.99% AT y 13.99% AR) (gráfico 5), por lo tanto este material también presenta una mayor eficiencia para ambos azúcares (gráfico 13) y presenta el menor grado de polimerización (tabla 10).

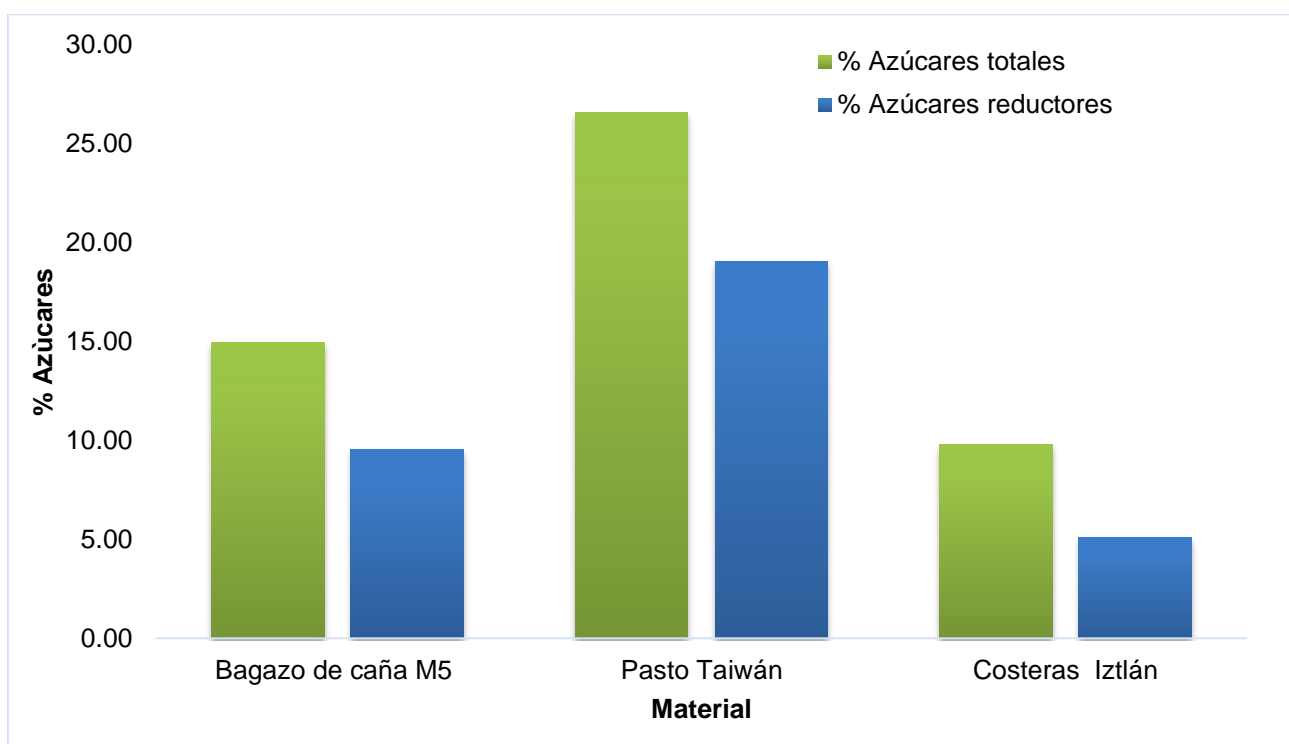


Gráfico 12. Porcentaje de azúcares generados en la sacarificación enzimática con pretratamiento alcalino y con el complejo E7.

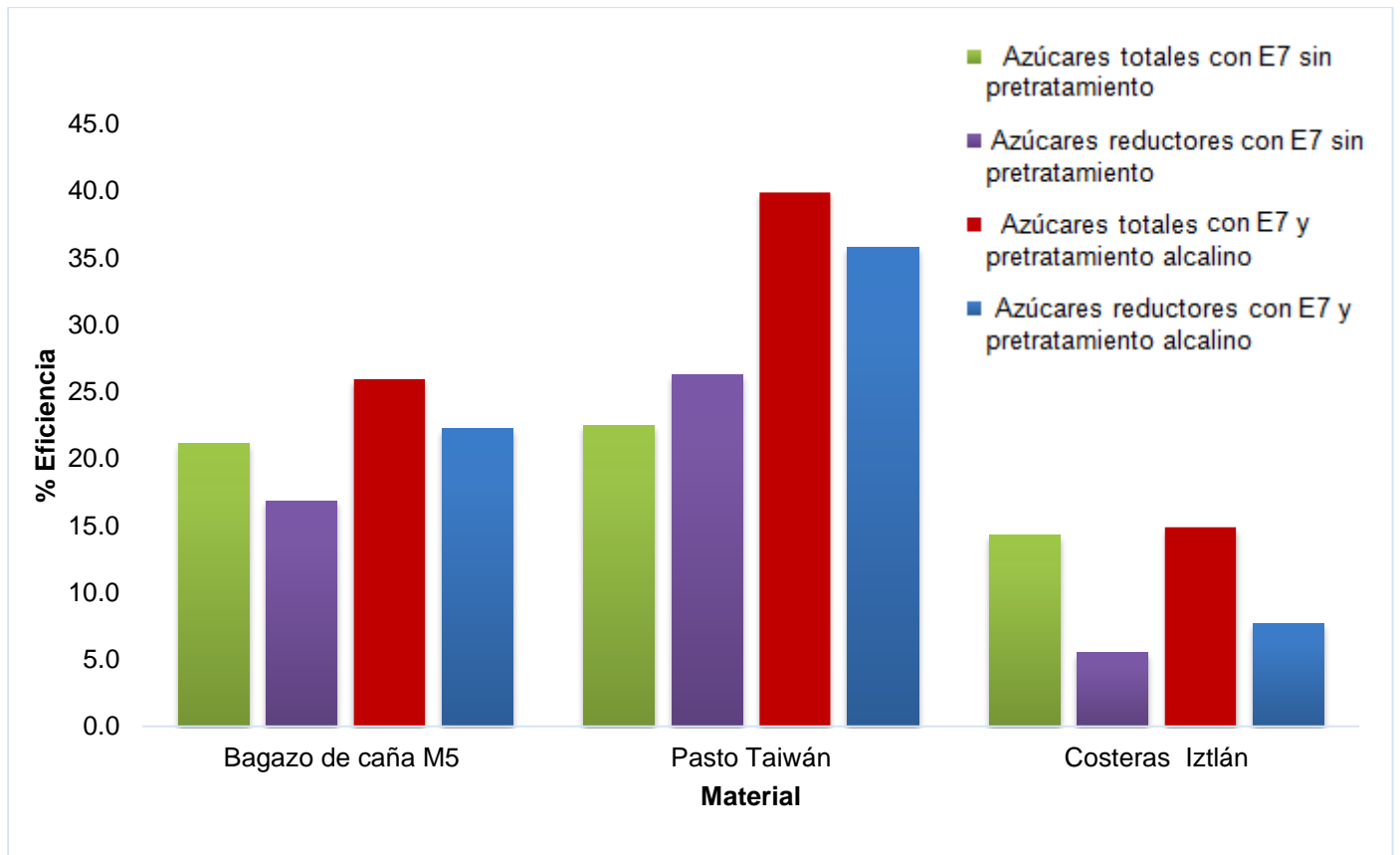


Gráfico 13. Eficiencia de la sacarificación enzimática con y sin pretratamiento y con E7

Respecto a los resultados con E9, se observa que la cantidad de AT y AR generados en la sacarificación de todos los materiales es mayor respecto al de E7, que es de acuerdo con lo que se esperaba debido a que el complejo enzimático porque es el que presenta la mayor actividad.

Si se compara el contenido de azúcares que se obtiene después del pretratamiento y la sacarificación enzimática con E9, se observa que el pasto Taiwán permite alcanzar un contenido de azúcares reductores de 26.21% (grafico 14) mientras que sin pretratamiento es de 15.76% (gráfico 6). Esta diferencia en la concentración puede deberse a la modificación del estado cristalino de la celulosa durante el pretratamiento alcalino y que causa el decremento de los efectos positivos en la remoción de la lignina y en la hinchazón de la celulosa. Así mismo el pasto Taiwán es el que presenta la mayor eficiencia (79.2% AT y

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

49.2% AR) (gráfico 15) y el menor grado de polimerización (tabla 9), esto puede deberse a que éste presenta un porcentaje relativamente bajo de lignina total (27.2%) si lo comparamos con una madera (46.4%) (tabla 2), además este subproducto lignocelulósico fue en el que más lignina se solubilizó durante el pretratamiento, lo cual permitió aumentar la efectividad de las enzimas.

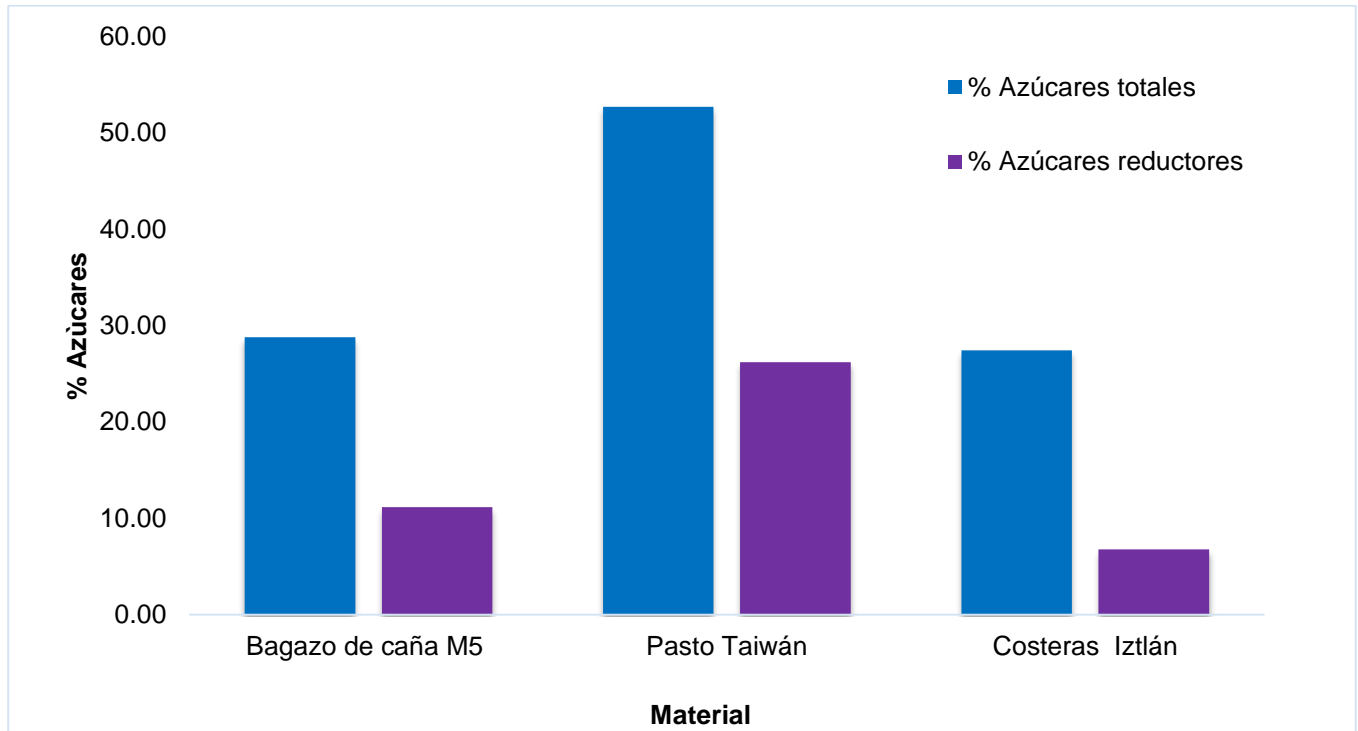


Gráfico 14. Azúcares generados de la sacarificación enzimática con pretratamiento alcalino y con el complejo E9.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

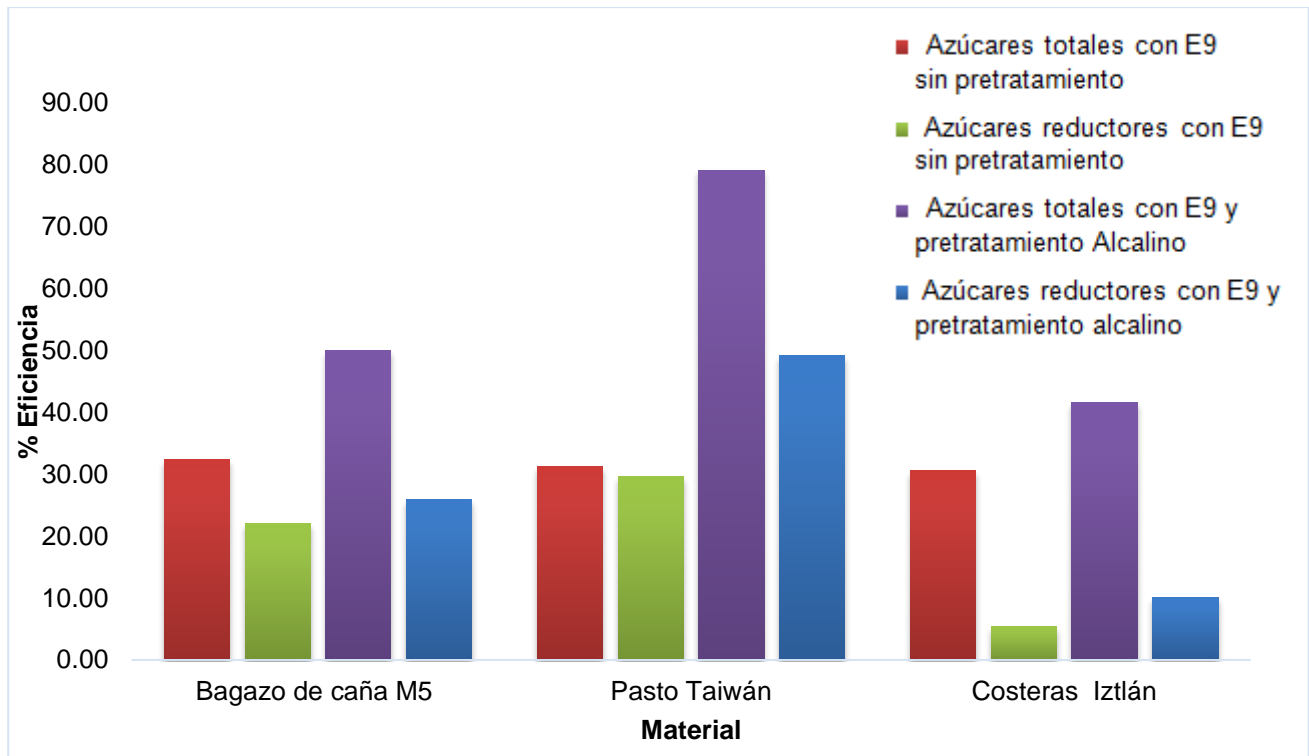


Gráfico 15. Eficiencia de la sacarificación enzimática con el complejo E9.

Tabla 9. Grado de polimerización de los materiales pretratados.

Materiales	GP con E7	GP con E9
Bagazo de caña M5	1.6	2.6
Pasto Taiwán	1.4	2.0
Costeras Ixtlán	1.9	4.1

Identificación de azúcares por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)**Tabla 10. Identificación de azúcares por HPLC.**

Tratamiento	Material	% Glucosa	% Xilosa	% Celobiosa	Relación Hexosa/pentosa
Digestión ácida	Bagazo de caña M5	51.64	6.28	ND	8.22
	Pasto Taiwán	36.97	12.85	ND	2.88
	Madera costeras Ixtlán	55.20	ND	ND	-
Pretratamiento alcalino y sacarificación enzimática con el Complejo E7	Bagazo de caña M5	6.49	1.20	ND	5.40
	Pasto Taiwán	12.32	2.34	1.86	5.26
	Madera costeras Ixtlán	2.50	ND	ND	-
Pretratamiento alcalino y sacarificación enzimática con el Complejo E9	Bagazo de caña M5	7.31	2.48	ND	2.94
	Pasto Taiwán	22.68	5.63	ND	4.02
	Madera costeras Ixtlán	4.26	ND	ND	-

*ND – No detectable

La composición y contenido de azúcares en los jarabes resultantes de cada sacarificación enzimática de los tres materiales pretratados fueron determinadas mediante HPLC. Las señales detectadas con el ELSD fueron identificadas y cuantificadas comparándolas con los tiempos de retención y curvas estándar de glucosa, xilosa, fructosa, sacarosa y celobiosa, empleando como estándar interno D-alanina (anexo B).

La efectividad del pretratamiento se observa no solo en el contenido de lignina soluble, sino también en la concentración de azúcares obtenidos en la sacarificación. Después de realizar la hidrólisis enzimática, se observa que la concentración de glucosa y xilosa es mayor con el complejo E9 (tabla 10). Sin embargo la hidrólisis de la celulosa produce celobiosa y en último término glucosa, la celobiosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa con enlace β -1,4 y un contenido en la muestra mayor a 3 mg/mL indica una hidrólisis incompleta [28], por lo cual las hidrólisis de los 3 subproductos lignocelulósicos pretratados se

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

consideran completas, pues a pesar de que el pasto Taiwán presenta una concentración de celobiosa de 1.86% (p/p) en términos de mg/mL representa 0.37 mg celobiosa/mL hidrolizado, lo que es inferior a lo reportado en la literatura [28] para que esta hidrólisis no se considerara completa. El contenido de azúcares determinados por HPLC en el jarabe resultante de los materiales pretratados e hidrolizados con los complejos enzimáticos E7 y E9 concuerda con los obtenidos con la técnica de DNS. En la tabla 10 se observa que el material que permite obtener una mayor concentración de glucosa es el pasto Taiwán siendo esta de 22.68%, lo cual se podría considerar un buen porcentaje, basándonos en el trabajo de T. Holtzapfle en el cual se empleó un pasto, y se realizó un pretratamiento con cal bajo las condiciones de 120°C durante 2 horas la concentración de glucosa que se reporta es de 26% [34]. La relación hexosa/pentosa (tabla 10) indica la fermentabilidad del jarabe si se utiliza una cepa de levadura común (*Saccharomyces cerevisiae*) para la conversión a etanol, debido a que las pentosas no son fermentadas por éste microorganismo. Así un valor mayor de la relación hexosa/pentosa indica que hay más glucosa y por lo tanto una mayor fermentabilidad de los azúcares presentes en el jarabe [26]. En general se puede afirmar que el pretratamiento básico mejora los rendimientos de AT y AR así como la concentración de glucosa, que en este caso es el azúcar de mayor importancia debido a que es un azúcar fermentable por *Saccharomyces cerevisiae*, siendo éstos resultados más prometedores para el pasto Taiwán, en cuanto a los materiales de la tabla 10. En general, al pretratar la muestra y su posterior sacarificación se observa que se obtienen más azúcares, lo cual podría mejorarse aumentando la temperatura del pretratamiento y la carga de cal, pues en un estudio realizado con el pasto gigante *Pennisetum Sp.* Realizado con amoníaco como álcali en condiciones de temperatura de 220°C durante 20 min y con una proporción de 2 g de

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

álcali por g de material ha sido eficiente pues se logró hidrolizar un 97.7% de la celulosa después de la sacarificación [35].

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la evaluación de la sacarificación enzimática de diversos materiales lignocelulósicos provenientes de un pretratamiento basado en la *nixtamalización*. Se observó que la concentración de azúcares que se obtiene después de la hidrólisis de los materiales pretratados es mayor a la que se obtiene con los materiales nativos, lo cual muestra que el pretratamiento tiene un efecto positivo sobre la sacarificación.

El usar CaO conlleva a tener una reacción exotérmica, por lo cual se requiere utilizar menos energía para llevar a cabo la aplicación de este pretratamiento ya que en solución al 1% se obtuvo un aumento de temperatura de 7°C, además esta reacción química puede potencialmente ayudar a romper la cristalinidad de la celulosa.

El pretratamiento resultó efectivo pues se obtuvo una concentración de azúcares mayor después de la hidrólisis enzimática. Los azúcares que se identificaron fueron: glucosa, xilosa y celobiosa. De los cuales es fermentable la glucosa por *Saccharomices cerevisiae*, lo que significa que es potencial de fermentarse a etanol.

El material con el cual se obtuvo la mayor cantidad de azúcares (22.68% p/p de glucosa) fue el pasto Taiwán empleando el complejo enzimático E9, por lo cual se puede considerar como una fuente de biomasa lignocelulósica para la producción de azúcares susceptibles a ser fermentados para la obtención de bioetanol.

Con el complejo E7 se obtienen menos azúcares respecto a E9, pero aun así su sacarificación es mayor que sin pretratamiento, lo que sugiere una hidrólisis enzimática con el coctel E7 en un intervalo de tiempo de 2 horas, para evaluar su efectividad sobre el remanente de celobiosa en el caso del pasto Taiwán.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Recomendaciones

Durante el presente estudio, sólo se evaluó el pretratamiento así como la hidrólisis enzimática de diversos materiales, para optimizar la obtención de azúcares fermentables, por lo cual se recomienda enfocar un estudio hacia la fermentación de estos azúcares y evaluar la obtención de bioetanol en futuras investigaciones.

Se recomienda realizar un estudio con los materiales pretratados pero con un tamaño de partícula en malla 10 pues esto ayudaría a visualizar la cantidad de azúcares que se obtendría al utilizar el material sin trituración, lo que llevaría por consiguiente un ahorro de energía y disminución de precio del etanol obtenido. Las condiciones de estudio que se recomiendan son 220°C, durante 20 min y aumentando la carga de cal en 2 g de álcali/ g de material.

ANEXO A

Curvas de calibración de azúcares para los métodos Fenol-sulfúrico y ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)

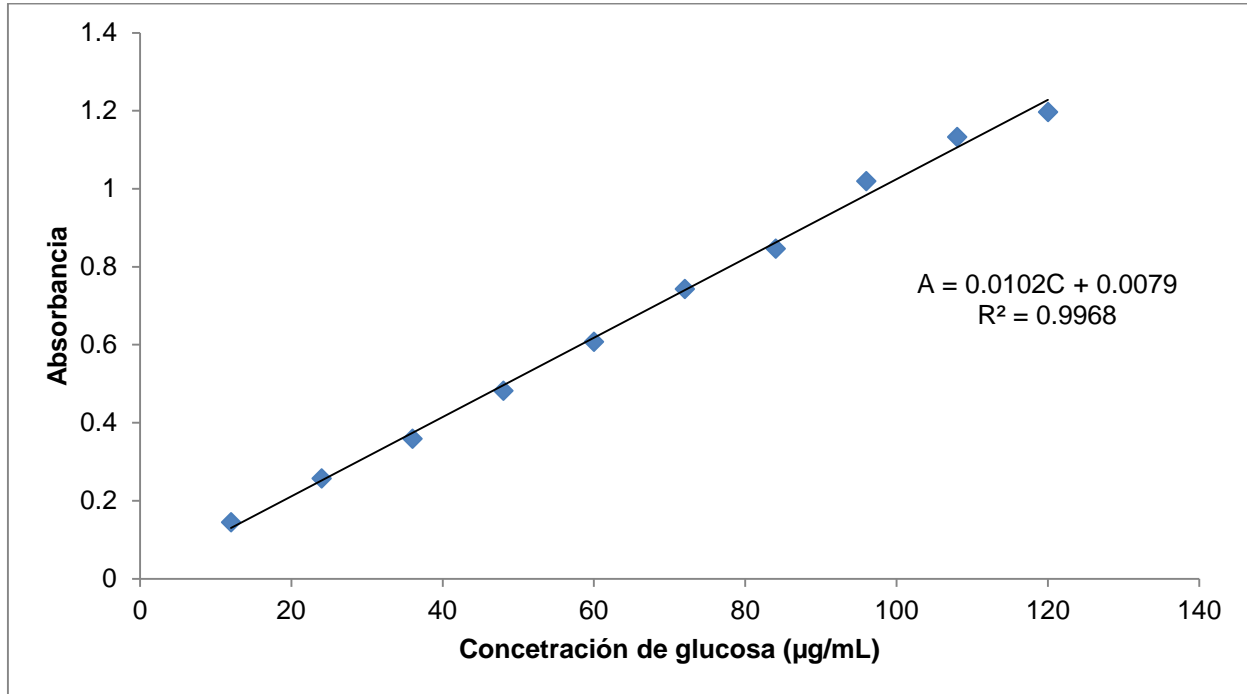


Gráfico 16. Curva de calibración para determinar azúcares totales por el método Fenol-sulfúrico de Dubois.

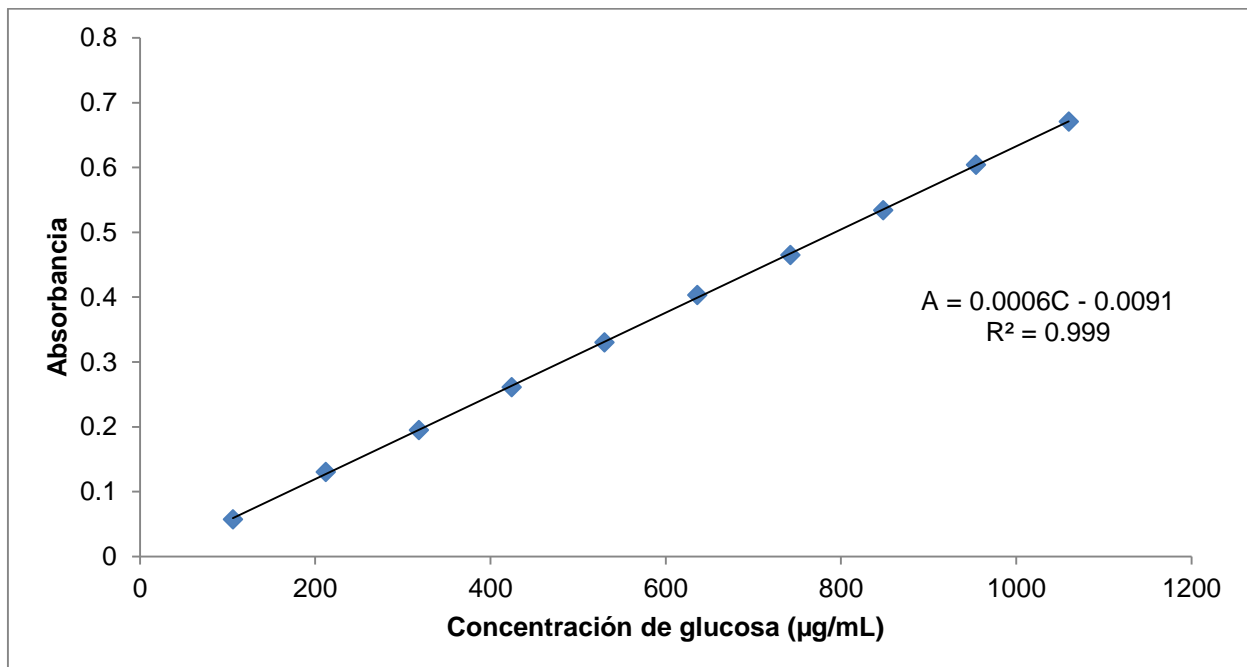


Gráfico 17. Curva de Calibración para determinar azúcares reductores por el método ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).

ANEXO B

Curvas de calibración de azúcares para HPLC con estándar interno

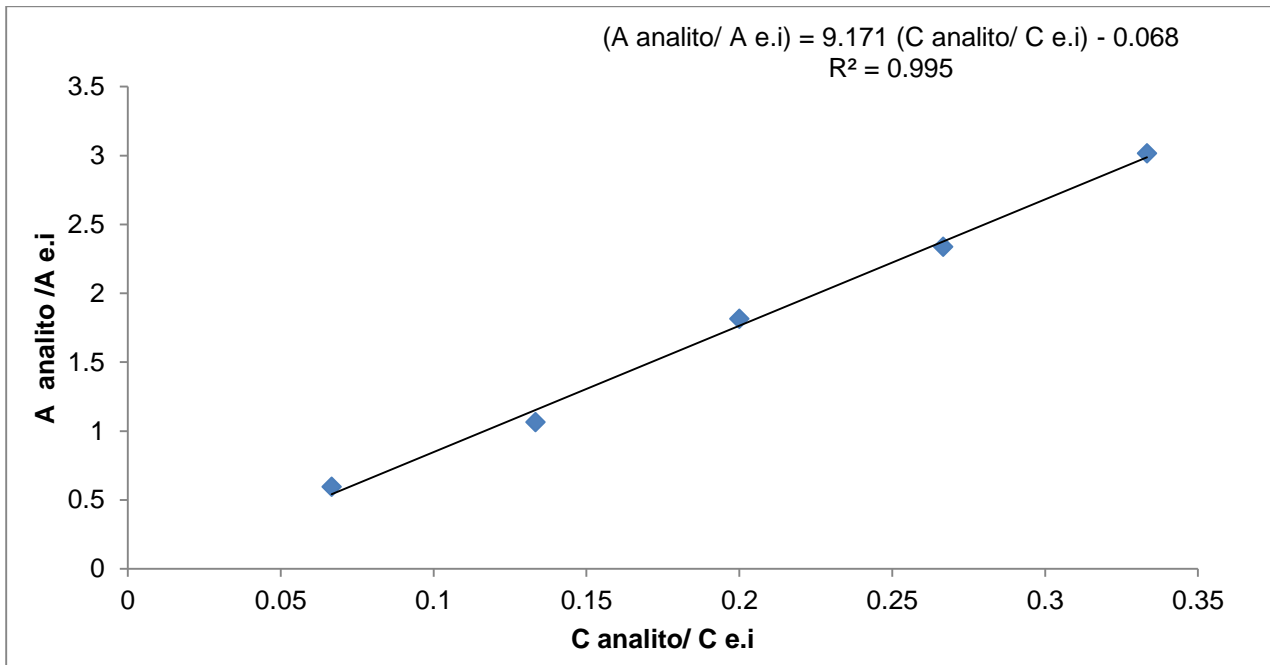


Gráfico 18. Curva de calibración de Glucosa.

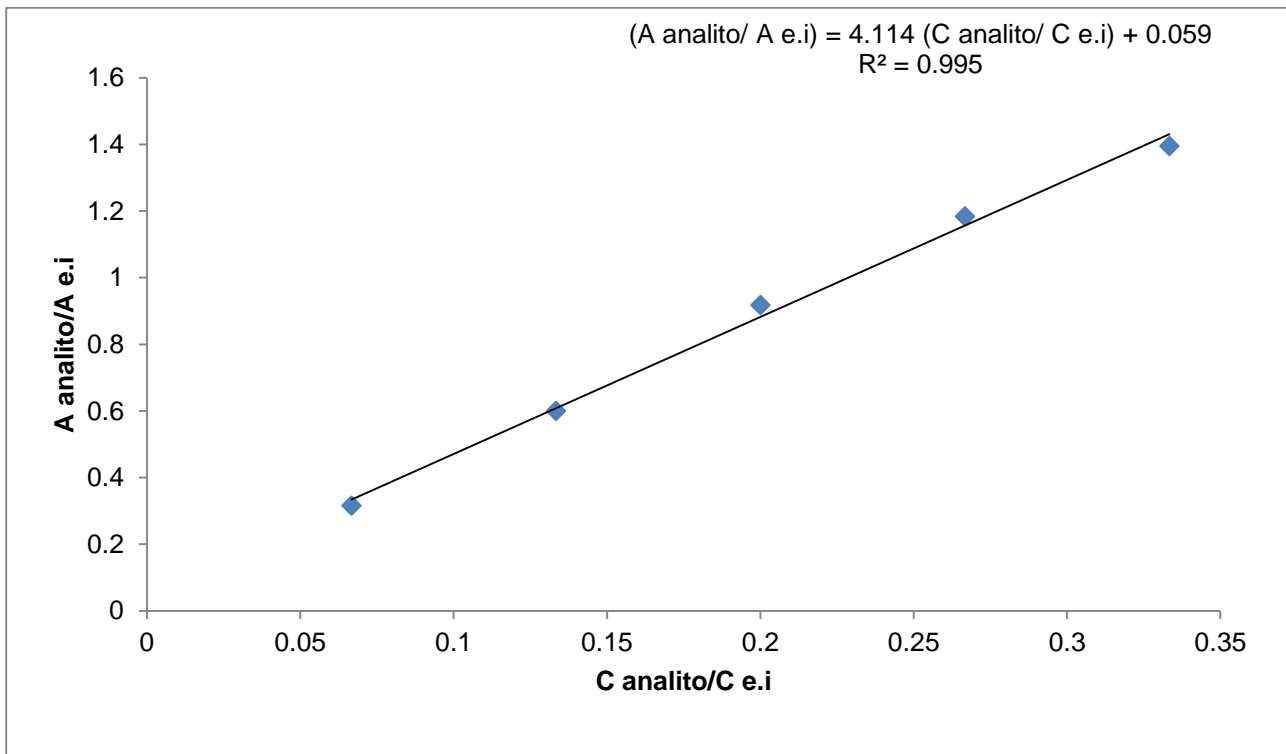


Gráfico 19. Curva de calibración de Xilosa.

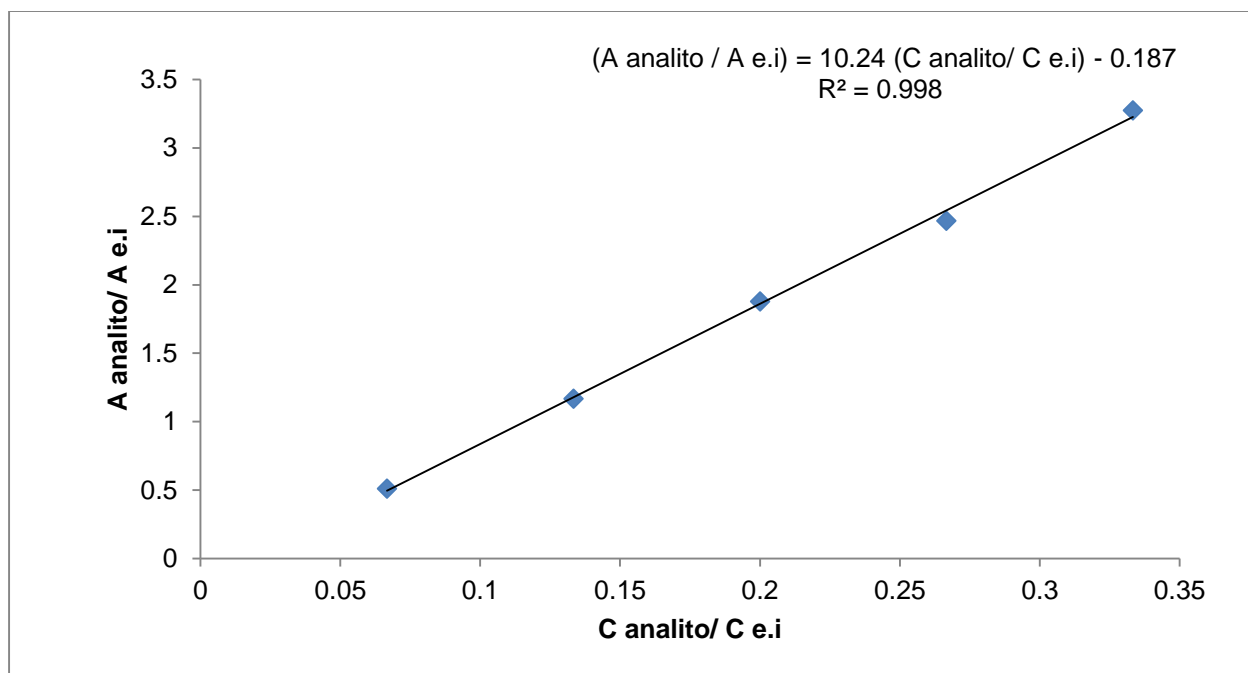


Gráfico 20. Curva de calibración de Celobiosa.

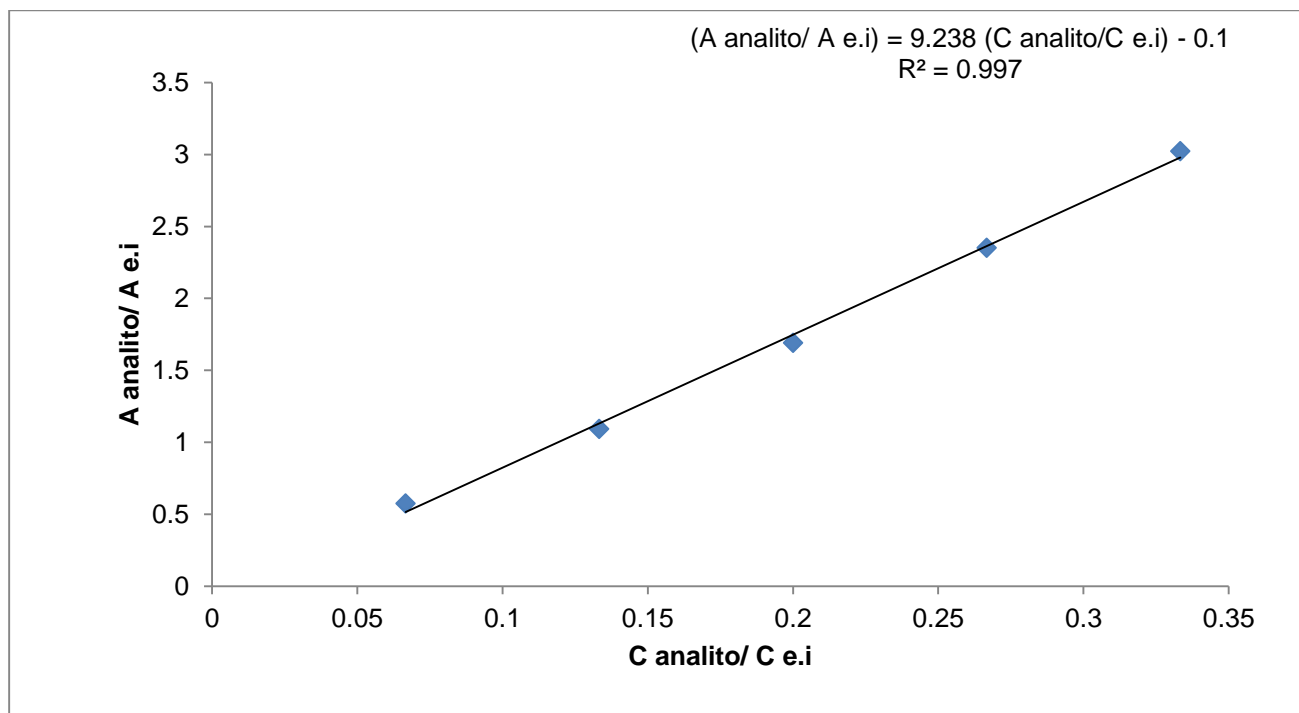


Gráfico 21. Curva de calibración de Fructosa.

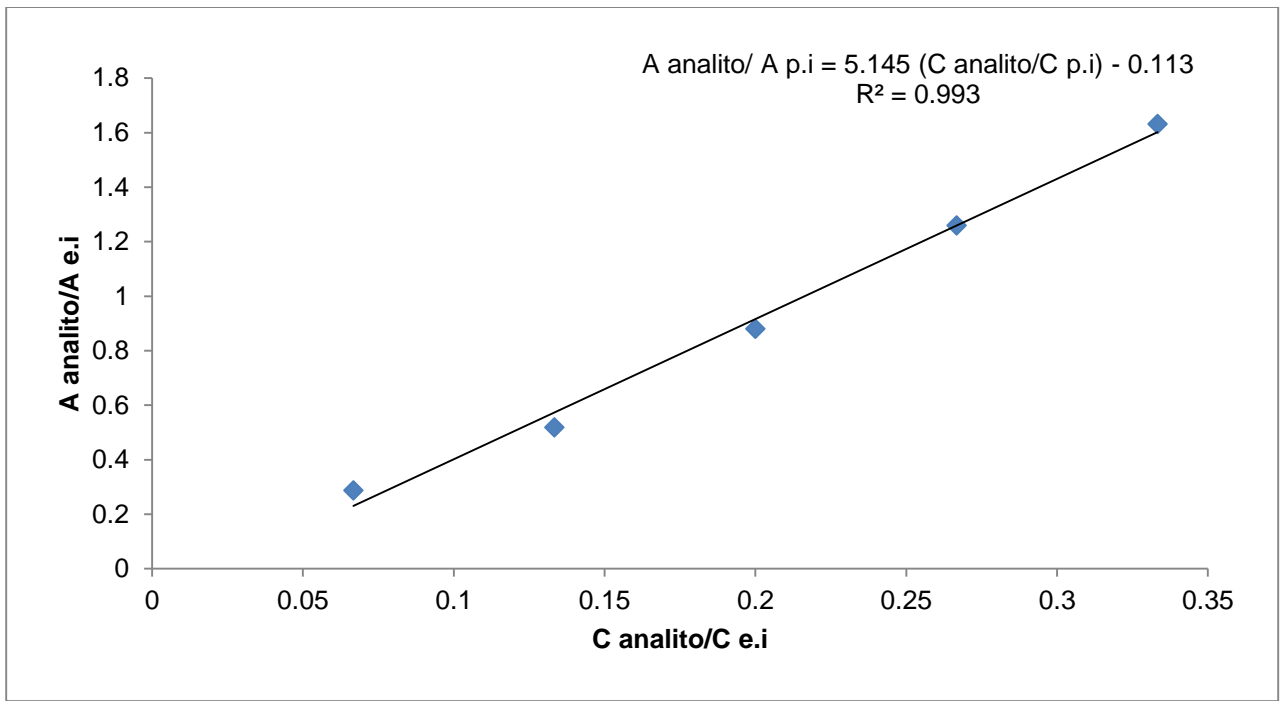


Gráfico 22. Curva de calibración de Manosa.

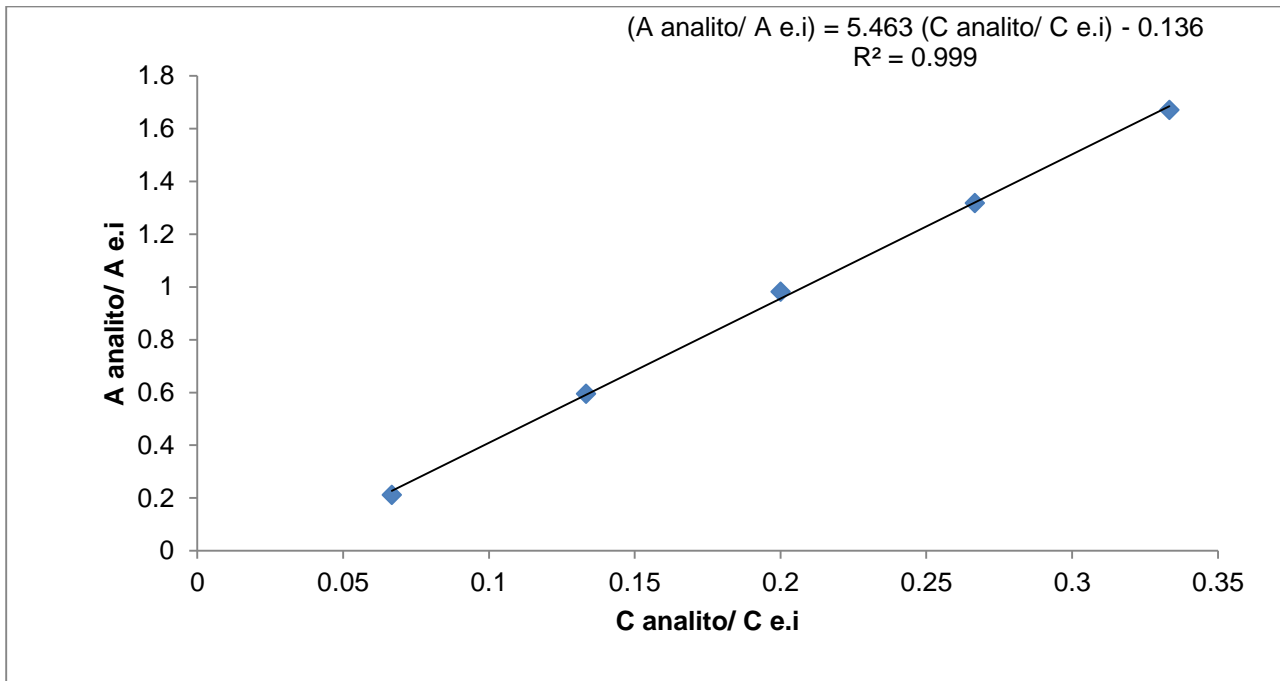


Gráfico 23. Curva de Calibración de Galactosa.

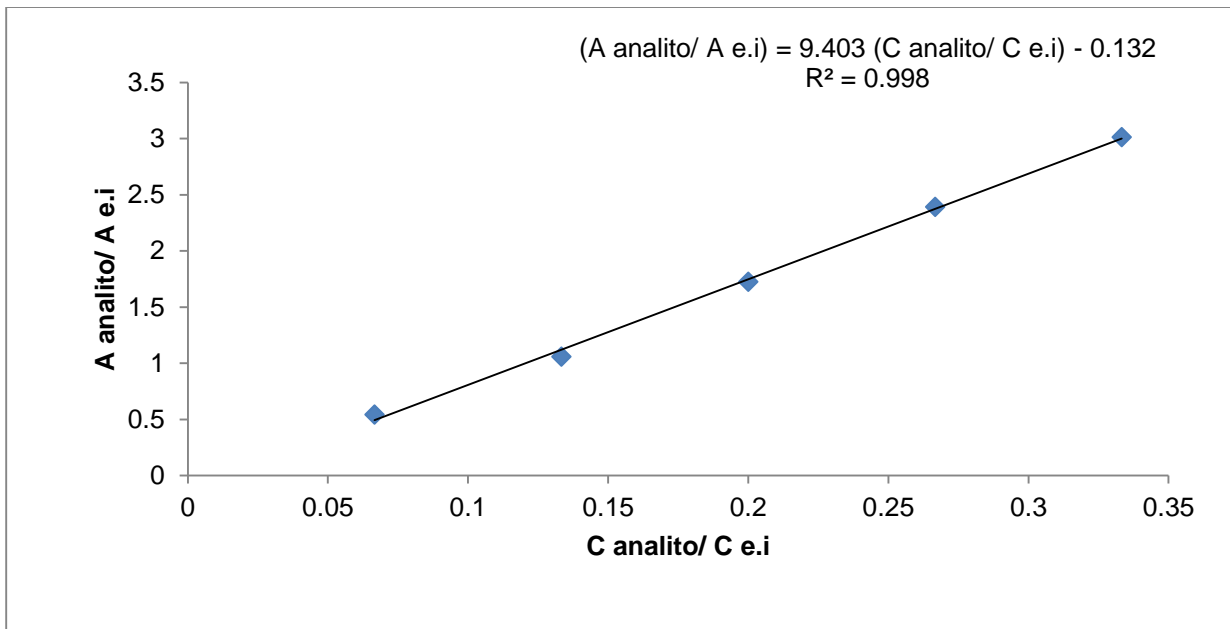


Gráfico 24. Curva de Calibración de Maltosa.

ANEXO C

Datos de cuantificaciones de azúcares

Tabla 11. Resultados de la Sacarificación enzimática sin pretratamiento de Bagazos de caña.

Material	% Azúcares (p/p)	E6	SD	E7	SD	E9	SD	E10	SD
Bagazo de caña M1	Azúcares totales	9.12	0.34	12.16	0.22	15.46	0.82	14.64	0.39
	Azúcares reductores	1.93	0.23	4.10	0.15	4.11	0.23	6.45	0.25
Bagazo de caña M2	Azúcares totales	13.08	0.38	8.78	0.30	17.95	0.53	13.83	0.56
	Azúcares reductores	3.98	0.14	5.05	0.18	6.20	0.06	6.15	0.34
Bagazo de caña M5	Azúcares totales	12.23	0.60	12.15	0.42	18.62	1.00	14.92	0.42
	Azúcares reductores	4.87	0.12	7.23	0.15	9.47	0.53	8.97	0.06

Tabla 12. Resultados de la Sacarificación enzimática sin pretratamiento de pastos.

Material	% Azúcares (p/p)	E6	SD	E7	SD	E9	SD	E10	SD
Pasto privilegio	Azúcares totales	8.90	0.08	17.07	0.79	21.30	1.09	7.65	0.29
	Azúcares reductores	4.16	0.15	2.67	0.05	11.12	0.19	5.23	0.44
Pasto Taiwán	Azúcares totales	14.60	0.12	14.99	0.47	20.79	0.47	16.14	0.29
	Azúcares reductores	14.54	0.29	13.99	0.03	15.76	0.50	14.69	0.75
Pasto aacate cadillo	Azúcares totales	11.25	0.08	9.43	0.10	15.40	0.83	12.44	0.04
	Azúcares reductores	9.72	0.39	8.91	0.02	10.97	0.19	10.17	0.63

Tabla 13. Resultados de la Sacarificación enzimática sin pretratamiento de Maderas.

Material	% Azúcares (p/p)	E6	SD	E7	SD	E9	SD	E10	SD
Madera Ailé	Azúcares totales	6.06	0.13	6.52	0.34	13.23	0.57	5.22	0.07
	Azúcares reductores	2.29	0.06	4.08	0.10	4.02	0.20	5.22	0.25
Madera Costeras de Apapaxco	Azúcares totales	9.17	0.13	8.47	0.46	12.25	0.61	7.09	0.10
	Azúcares reductores	1.44	0.08	3.54	0.05	1.96	0.10	5.53	0.25
Madera Costeras Iztlán	Azúcares totales	3.90	0.21	9.40	0.51	20.13	0.88	7.20	0.91
	Azúcares reductores	1.60	0.06	3.66	0.13	3.57	0.08	6.18	0.11

Tabla 14 Resultados de la Sacarificación enzimática con pretratamiento

Material	% Azúcares	E7	SD	E9	SD
M5 (Pitiquito fermentado)	Azúcares totales	14.93	0.47	28.78	2.39
	Azúcares reductores	9.55	0.24	11.14	0.33
Pasto Taiwan	Azúcares totales	26.57	2.44	52.71	0.59
	Azúcares reductores	19.07	0.89	26.21	1.11
Costeras Iztlán	Azúcares totales	9.80	0.23	27.43	1.40
	Azúcares reductores	5.12	0.29	6.76	0.25

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez M, Yáñez M, Alvarado J, Vargas H. Influence of Structural Changes During Alkaline Cooking on the Termal, Rheological and dielectric Properties of Corn Tortillas. *Engineerring and processing*. 1996; 73(5).
2. BNDS y CGEE (coord.). Bietanol de Caña de Azúcar. *Energía para el Desarrollo Sostenible*. Banco Nacional de Desenvolvimento Económico y Social (BNDES). Río de Janeiro, Brasil; 2008.
3. SAGARPA. Bioenergéticos. Esquema tecnológico del bioetanol. [En línea].; 2011 [Citado el: 2013 12 04]. www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/bioetanol.html.
4. Lesser J, Saval S, Lesser E. El MTBE y los acuíferos. [En línea].; 2002 [Citado el: 2014 01 15]. [lesser.com.mx/eso/pub/02-2 El MTBE y los Acuíferos 2da Parte.pdf](http://lesser.com.mx/eso/pub/02-2%20El%20MTBE%20y%20los%20Acuíferos%202da%20Parte.pdf).
5. FAO. Biocombustibles y agricultura: panorama técnico. [En línea].; 2010 [Citado el: 2014 01 23]. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao>.
6. International Energy Agency. Biofuels. [En línea].; 2014 [Citado el: 2014 02 05]. www.iaee.org/publications.
7. Renewable Fuels Association. Ethanol Facts. [En línea].; 2014 [Citado el:2014 02 07]. www.ethanolfra.org/pages/ethanol-facts.
8. SENER. Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodisel para el Transporte en México. [En línea].; 2007 [Citado el: 2014 02 08]. [www.sener.gob.mx/Biocombustibles_en Mexico](http://www.sener.gob.mx/Biocombustibles_en_Mexico).

9. Renewable Fuels Association. Historic U.S. fuel Ethanol Production. [En línea].; 2014 [Citado el: 2014 03 07]. www.ethanol.org/pages/etstatistics.
10. Raveendran S. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugar cane tops bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011;(102).
11. Unión Nacional de Cañeros A.C. Estadísticas. [En línea].; 2014 [Citado el: 2014 03 08]. www.caneros.org.mx.
12. Enciso G. Evaluación del pretratamiento y sacarificación de un cultivo energético para la optimización de generación de azúcares susceptibles de fermentación a etanol. 2014. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
13. Sepúlveda I. Producción de cultivos energéticos. *Ciencias Agrícolas*. 2012; 3(3).
14. Fengel D, Wegener G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions* New York: Walter de Gruyter; 2009.
15. Linayem A, Ricke. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Process in Energy and Combustion Science*. 2012;(38).
16. Rubin E. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008;(454).
17. Reginaldo A. Structure, organization, and functions of cellulose syntase complexes in higher plants. *Journal of plants physiology*. 2007; 19(1).
18. Chang V, Nagwani M, Holtzapple M. Lime Pretreatment of Crop Residues Bagase and

Wheat Straw. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1998; 74.

19. Mosier N, Wyman C, Dale B. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. 2005;(96).
20. Alvira P, Pejó T, Ballesteros M. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology. 2010;(101).
21. Gómez L, López P, Álvarez M, Fort R. Comportamiento cristalino de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en condiciones de alta humedad relativa. Minerología. 2010;(13).
22. Villarino A. Materiales de construcción. [En línea].; 2008 [Citado el: 2013 11 18]. <http://ingenieria-civil.pdf>.
23. Mercado E. Tecnología alternativa (extrusión) para la producción de harinas de maíz nixtamalizadas. CIENCIACIERTA. 2011;(24).
24. Engineering. Michigan State University. [Online].; 2004 [cited 2014 03 08]. http://www.inl.gov/researchers/david_Thompson.
25. Cao Y, Zhang J, Ping W. Sugarcane bagasse Mild Alkaline/Oxidative Pretreatment for Ethanol Production by Alkaline Recycle Process. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2008;(151).
26. Barrera I, Gualo N, Aburto J. Manual de técnicas analíticas para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. 2012..

27. Guzmán N. Pretratamiento de bagazo de gramíneas para el incremento de azúcares reductores fermentables a etanol. 2012. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
28. Sluiter A, Hames B, Payme D, Ruíz R. Determination of Structural Carbohydrates and lignin in biomass. 2011. National Renewable Energy Laboratory.
29. IMSA. Proceso de elaboración de azúcar. [Online].; 2003 [Citado el: 2014 03 05].
imsa.com.gt.
30. Vázquez T, Blanco M. Tabla de frecuencias y espectros de infrarrojo de compuestos relacionados con la química del cemento. 1981..
31. Luen G, Chieh H, Hua W. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009;(45).
32. Lucena M, Ribeiro E. Influence of the alkaline delignification on the simultaneous saccharification and fermentation (of sugar cane bagasse). *Bioresource Technology*. 2013;(147).
33. Mohammad J, Taherizadeh A, Keikhosro K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008;(32).
34. Holtzapfel T, Burr B, Chang V. Lime pretreatment of switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1997;(65)

35. Mateus L. Evaluación de los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante "Pennisetum Sp". 2011. Tesis de Maestría. Univerisdad Nacional de Colombia.