



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE PROCESO DE PRETRATAMIENTO Y SACARIFICACIÓN  
EN RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ILSE MARIANA GUERRERO GONZÁLEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Agustín Reyó Herrera  
**VOCAL:** Profesor: Bertha Julieta Sandoval Guillen  
**SECRETARIO:** Profesor: Jorge Arturo Aburto Anell  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Inés Miranda Martínez  
**2° SUPLENTE:** Profesor: Hiram Ramírez Cahero

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO**

**ASESOR DEL TEMA:**

**JORGE ARTURO ABURTO ANELL**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**RICARDO CERÓN CAMACHO**

**SUSTENTANTE:**

**ILSE MARIANA GUERRERO GONZÁLEZ**

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
1. ANTECEDENTES .....	3
1.1 Biocombustibles .....	5
1.1.2 Bioetanol .....	6
1.2 Biomasa .....	9
1.2.1 Fuentes de biomasa .....	9
1.2.1 Partes de la biomasa y estructura .....	10
1.2.2 Organización del material lignocelulósico .....	15
1.3 Pretratamiento aplicados en la biomasa .....	18
1.3.1 Pretratamiento biológico .....	19
1.3.2 Pretratamientos físicos .....	19
1.3.3 Pretratamientos químicos .....	20
1.3.4 Pretratamientos físicoquímicos .....	23
1.4 Hidrólisis enzimática en el material lignocelulósico .....	25
1.5 Biomasa agroindustrial .....	27
1.5.1 Corona de la piña .....	27
1.5.2 Residuo del nopal .....	29
1.6 Perspectiva del bioetanol en el mundo y en México .....	32
2. HIPÓTESIS .....	35
3. OBJETIVO .....	36
3.1 Objetivos parciales .....	36
4. METODOLOGÍA .....	37
4.1 Diagrama General .....	37
4.2 Obtención de la corona de la piña y el residuo del nopal .....	38
4.3 Digestión ácida .....	39
4.4.1 Determinación de lignina insoluble en ácido .....	40
4.4.2 Determinación de lignina soluble en ácido .....	40

4.4.3 Determinación de lignina total.....	42
4.4 Azúcares solubles presentes en material lignocelulósico .....	42
4.5 Determinación de azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico .....	43
4.6 Neutralización de muestra .....	44
4.7 Determinación de los azúcares reductores por el método de DNS.....	44
4.8 Corrección anhidra en azúcares .....	45
4.9 Perfil de carbohidratos en HPLC.....	46
4.10 Hidrólisis Enzimática .....	49
4.10.1 Caracterización de los cocteles enzimáticos .....	50
4.11 Diseño de experimentos y pretratamiento hidrotérmico/alcalino con NaOH .....	51
4.11.1 Pretratamiento hidrotérmico/alcalino.....	55
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	57
5.1 Obtención del material .....	57
5.2 Caracterización del material lignocelulósico .....	59
5.2.1 Azúcares solubles.....	59
5.2.2 Determinación de lignina insoluble en ácido.....	59
5.2.3 Determinación de lignina soluble en ácido.....	60
5.2.4 Determinación de lignina total.....	62
5.2.5 Determinación de azúcares totales y reductores .....	63
5.2.6 Perfil de carbohidratos .....	63
5.2.7 Resumen de la caracterización de la corona de la piña y el residuo del nopal.....	64
5.3 Sacarificación del material lignocelulósico sin pretratamiento .....	66
5.4 Diseño de experimentos en el residuo lignocelulósico.....	70
5.4.1 Pretratamiento hidrotérmico/alcalino.....	70
5.4.2 Hidrólisis enzimática en el material lignocelulósico pretratado .....	85
5.5 Eficiencia del pretratamiento en el residuo agroindustrial .....	101

6. CONCLUSIONES.....	105
BIBLIOGRAFÍA .....	107
ÍNDICE DE TABLAS .....	114
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	115
ÍNDICE DE FIGURAS .....	118
ANEXO A .....	120
ANEXO A.1 .....	127
ANEXO B .....	129

## RESUMEN

La obtención de combustibles es un tema de suma importancia para cualquier país. Hoy en día, su obtención sigue siendo de residuos fósiles, sin embargo las reservas han ido en decremento además de causar diversos problemas ambientales, como las emisiones de gases de efecto invernadero. A causa de estos problemas se ha recurrido a la investigación para generar otro tipo de energía, como es el caso del biocombustible, los cuales pueden obtenerse a partir de biomasa. Esta se considera como la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. Estos recursos biomásicos pueden agruparse de forma general en agrícolas y forestales. También se considera biomasa a la materia orgánica de las aguas residuales y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos.

Los materiales lignocelulósicos forman parte de la biomasa y están compuestos por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa, y lignina. Los materiales con abundancia en celulosa suelen poseer estructuras complejas debido al grado de polimerización y cristalinidad, lo que dificulta la hidrólisis enzimática; por ello es necesario aplicar un pretratamiento y así facilitar la sacarificación, obteniendo la mayor cantidad de jarabes, que se ocuparán en la fermentación para su posterior producción de bioetanol.

En el presente trabajo se expone la evaluación del pretratamiento hidrotérmico/alcalino con NaOH, aplicado a residuos lignocelulósicos, mediante una sacarificación enzimática y así generar de azúcares fermentables. En el estudio se trabajó con dos residuos agroindustriales: el residuo de nopal y la corona de piña, los cuales fueron caracterizados (determinación del contenido de cenizas, lignina, azúcares totales, azúcares reductores y perfil de carbohidratos) y se sometieron al pretratamiento para su posterior sacarificación con cocteles enzimáticos comerciales decodificados como E7 y E9.

La evaluación del pretratamiento hidrotérmico/alcalino se realizó mediante un diseño factorial completo  $2^3$  con tres puntos centrales y se eligieron las condiciones óptimas para la obtención de azúcares reductores dentro del dominio experimental. En la corona de la piña pretratada e hidrolizada con el cóctel E7 y E9 así como en el residuo del nopal pretratado y sacarificado con el coctel E7 las condiciones seleccionadas fueron las mismas, estas se presentan a continuación:

Tiempo (min): 10

Temperatura (°C): 140

NaOH (% p/V): 1.5



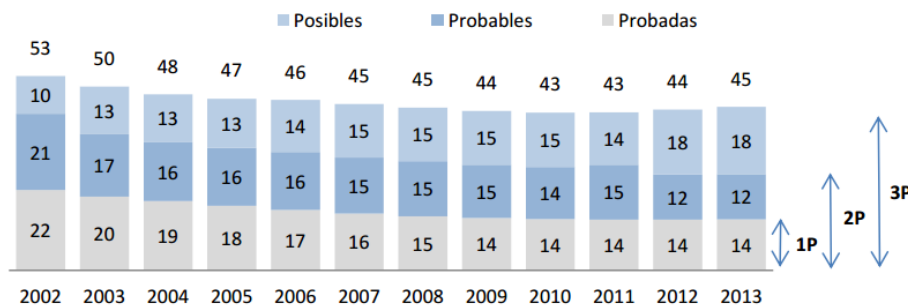
## 1. ANTECEDENTES

En la actualidad el desarrollo de un país depende de las fuentes energéticas que este posea; una de las más importantes es el petróleo y sus derivados tales como el gas y la gasolina, la cual es usada mayoritariamente para el transporte y vehículos particulares. El uso de los combustibles fósiles representa el 55 % del consumo mundial de energía [SENER 2009].

El petróleo es un recurso natural no renovable formado por hidrocarburos como alcanos, cicloalcanos y aromáticos. El petróleo debe ser refinado mediante destilación fraccionada para así ser usado [McMurry, 2008].

En México, de acuerdo al reporte de PEMEX en 2013, las reservas totales suman 44.5 miles de millones de barriles de crudo los cuales están distribuidos entre reservas probadas, probables y posibles denominadas como 1P, 2P y 3P respectivamente (Gráfica 1.1).

Gráfica 1.1: Reservas de hidrocarburos totales (MMbpc) [PEMEX, 2013].



Sin embargo, esta fuente de energía no va a ser permanente, pues las reservas de los combustibles fósiles son finitas, además la demanda energética de la población va en aumento debido al crecimiento de los países en desarrollo y el mantenimiento de los países de primer mundo. [Yang & Wyman, 2008]

Por otro lado en los últimos años se han presentado una creciente fluctuación de los precios del petróleo (alcanzando valores superiores a los

US\$130.00/barril) y de sus derivados, lo que ha estimulado la búsqueda de energías alternativas [SENER, 2010].

De la misma manera el uso del petróleo crudo y sus productos (combustibles) han modificado de manera importante el medio ambiente, pues en la atmosfera se ha presentado un aumento en las concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI); tales como el dióxido de carbono, metano y óxidos de nitrógeno, los cuales contribuyen al cambio climático actual. Lo anterior se debe a que los hidrocarburos son propensos a presentar combustiones incompletas.

De esta forma resulta obvio que la oferta energética requiere de una transición desde su actual dependencia de los hidrocarburos hacia fuentes de energía alternativa. Esta transición debe realizarse de forma gradual y ordenada, logrando el aprovechamiento de diferentes fuentes de energía, como las fuentes renovables: eólica, hidráulica, geotérmica, solar y la obtenida a partir de la biomasa. A diferencia de la mayoría de las energías renovables con las cuales se obtiene principalmente energía eléctrica o calor, por medio del uso de biomasa se pueden obtener combustibles líquidos que pueden ser usados para el transporte [Carreón et al., 2009].

La energía renovable es aquella que, administrada en forma adecuada, puede explotarse ilimitadamente. La utilización de estas energías tiene como ventajas [Vázquez, 2012]:

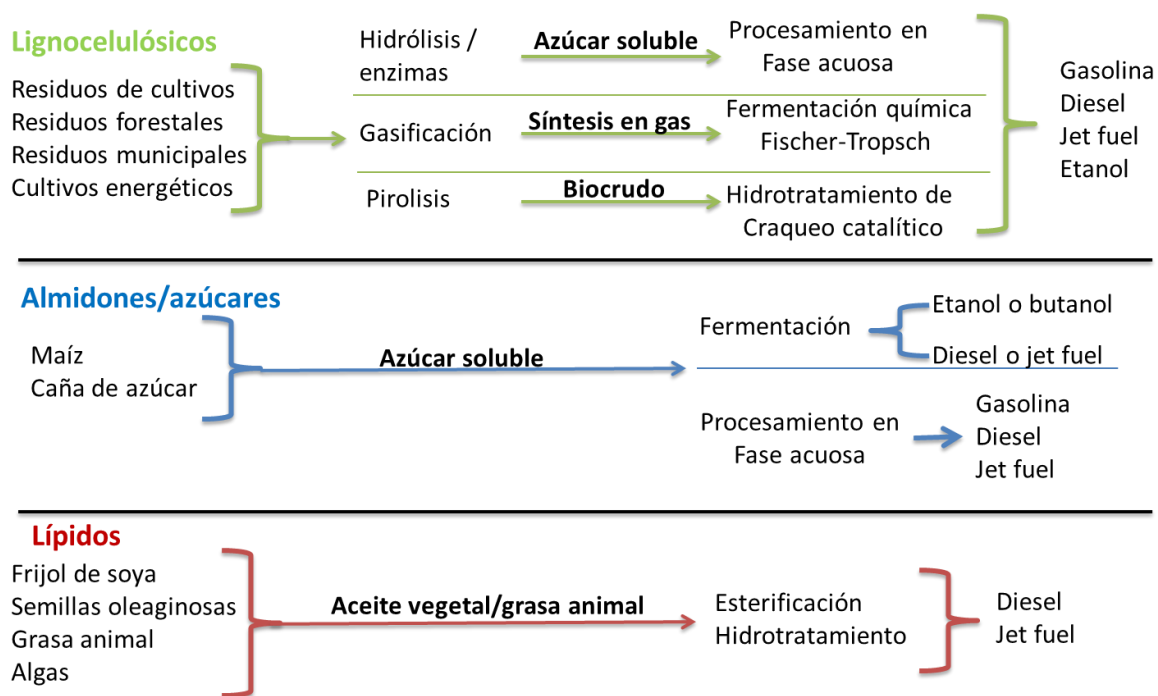
- Garantizar la seguridad y diversidad del suministro energético
- Proveen servicios de energía que evitan en gran medida el impacto ambiental, contribuyendo a la protección del ecosistema.
- Su tecnología en forma natural es de tipo modular, lo que permite ir desarrollando infraestructura en forma gradual y conforme a los requerimientos del mercado.

## 1.1 Biocombustibles

El término biocombustible engloba a todos aquellos combustibles derivados de la biomasa vegetal y tienen características similares a los combustibles fósiles, lo que permite ser utilizados en motores sin efectuar modificaciones importantes. Al mismo tiempo no contiene azufre, uno de los principales componente de la lluvia ácida, ni contribuyen al incremento de CO<sub>2</sub> atmosférico, sino que este se recicla (ciclo cerrado de carbono) [Olivia, 2003; Carreón et al., 2009]. La energía proveniente de los biocombustibles es energía renovable además es especialmente viable en países que disponen de tierras para su cultivo, que poseen disponibilidad de mano de obra rural [Olivia, 2003; SENER, 2010].

En la actualidad los biocombustibles líquidos se obtienen a partir de productos agrícolas como el azúcar, los cereales y semillas oleaginosas (Figura 1.1) [Olivia, 2003].

Figura 1.1: Diferentes materiales usados para la obtención de biocombustibles [Ritter, 2011].



De acuerdo a su origen, los biocombustibles se pueden distinguir en dos clases de energéticos líquidos (biodiesel y bioetanol) para su utilización en el sector de transporte y vehículos particulares.

El biodiesel es un biocombustible líquido producido a partir de los aceites vegetales y grasas animales, siendo la colza, el girasol y la soja las materias primas más utilizadas para este fin [SENER, 2006]. Químicamente la American Society for Testing and Material Standard (ASTM) define al biodiesel como “ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables tales como aceites vegetales o grasas de animales, y que se emplean en motores de ignición de compresión, estas cadenas no contienen azufre”. Los ésteres más utilizados, son los de metanol y etanol, obtenidos a partir de una reacción de transesterificación de cualquier tipo de aceites vegetales, grasas animales o de la esterificación de los ácidos grasos, debido a su bajo coste y sus ventajas químicas y físicas [Mata et al., 2010].

El bioetanol, que es el biocombustible de interés en este trabajo, es un producto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales, tales como cereales, remolacha, caña de azúcar, sorgo, maderas, bagazos, etc [Hahn-Hägerdal et al., 2008]. En este proceso se obtiene el alcohol hidratado (humedad ~5 %), que tras ser deshidratado (humedad > 0.4 %) se puede utilizar como combustible [Olivia, 2003; Carreón et al., 2009].

### 1.1.2 Bioetanol

El etanol es un combustible, es decir, libera cantidades significativas de calor al quemarse. Sin embargo, el etanol presenta algunas diferencias importantes con relación a los combustibles derivados de petróleo. La principal es el elevado contenido de oxígeno, que constituye cerca del 35 % en masa lo que posibilita una combustión más limpia y de mejor desempeño en los motores, así contribuye a la reducción de las emisiones contaminantes, sustituyendo el

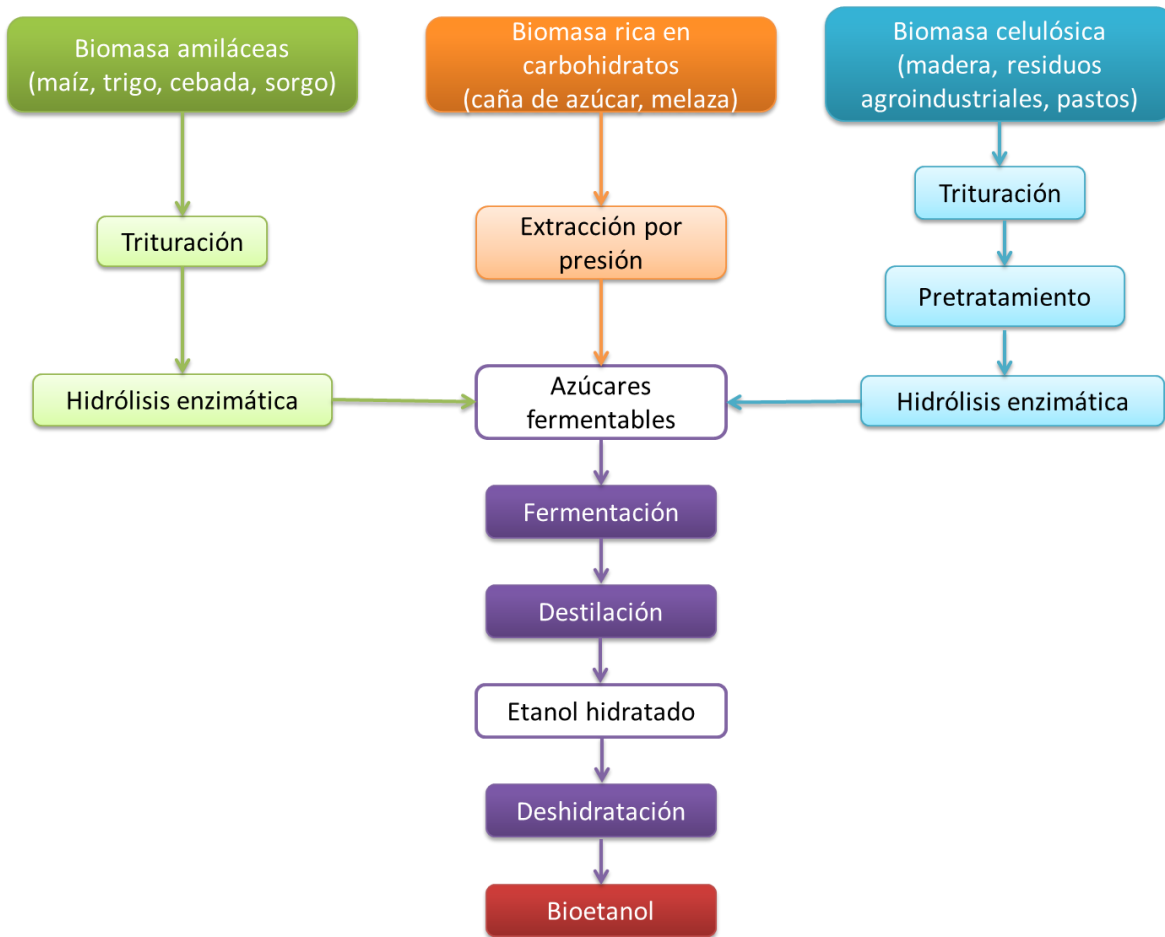
tetraetilo de plomo y otros aditivos oxigenantes que presentan restricción ambiental, como el MTBE (metil terciario butil éter). Estos beneficios se presentan aun al mezclarlo con la gasolina, actuando de esta forma como un aditivo y mejorando sus propiedades [BNDES & CGEE, 2008; Carreón et al., 2009].

En comparación con las gasolinas, el contenido energético del etanol es aproximadamente de un tercio menor con respecto a la gasolina o diesel, sin embargo, su calor de vaporización es casi tres veces mayor y su número de octanos también es superior (110 octanos), permitiendo que los motores obtengan más energía útil de calor en comparación con la gasolina. Los motores de combustión interna que utilizan gasolina pueden emplear como energético mezclas con etanol con un porcentaje de 5 %, 10 % y 20 % denominadas E-5, E-10 y E-20, sin requerir modificaciones en estos motores [Olivia, 2003; SENER, 2006; BNDES & CGEE, 2008].

El desarrollo tecnológico en Brasil ha permitido la comercialización de automóviles que pueden emplear mezclas de etanol E-95 (5 % de gasolina y 95 % de etanol) a partir de 2003, denominados como Flex-Fuel (de combustible flexible), equipados con un sensor de combustible que detecta la proporción etanol/gasolina adaptando los sistemas de inyección e ignición a las características de la mezcla. La materia prima utilizada es el bagazo de caña, para su cultivo Brasil dispone [Olivia, 2003; BNDES & CGEE, 2008].

La producción de bioetanol a partir de la biomasa lignocelulósica incluye varios pasos importantes como son: la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, la fermentación, la separación de la lignina del residuo biomásico y finalmente la recuperación y purificación (Figura 1.2) [Alvira et al., 2010].

Figura 1.2: Diagrama general para la obtención de bioetanol [Diez & Garrido, 2008].



Para mejorar la competitividad del bioetanol frente a los combustibles derivados del petróleo se deben reducir los costes de producción, y para ello se necesita reducir el gasto de energía y el precio de las materias primas, ya que éstas suponen alrededor del 60 % del coste final del etanol, siempre conservando el objetivo de obtener el mayor rendimiento. Es necesario desarrollar nuevos cultivos como los organismos genéticamente modificados y considerar la biomasa secundaria y los residuos orgánicos como recursos complementarios para la producción de biocombustibles. El uso de los OGM con responsabilidad y ser controlados para disminuir los posibles riesgos ambientales.

La utilización de biomasa lignocelulósica es, a mediano plazo, la opción más prometedora para la obtención de etanol carburante a bajos costes, posibilitando que este producto pueda ser adoptado por la industria [Olivia, 2003; Yang & Wyman, 2008].

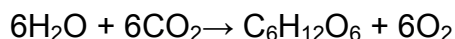
## **1.2 Biomasa**

En el término biomasa se incluye toda la materia orgánica que tiene su origen inmediato en un proceso biológico. La formación de la biomasa es a partir de energía solar, agua y dióxido de carbono transformado a través de procesos fotosintéticos, gracias a la cual se forman moléculas de alto contenido energético en forma química. La energía es liberada al romperse los enlaces de los compuestos orgánicos durante el proceso de combustión, emitiendo dióxido de carbono y agua. [SENER, 2010; SENNER, 2012].

### *1.2.1 Fuentes de biomasa*

A partir de la reacción (Figura 1.3) se calcula que para producir una tonelada de glucosa, son consumidos aproximadamente 0.6 toneladas de agua, 1.5 toneladas de dióxido de carbono liberando para la atmósfera 1.1 toneladas oxígeno [SENER, 2010]. La producción de biomasa a escala global en el planeta es muy alta, estimándose que la fotosíntesis fija anualmente es de  $2,2 \times 10^{11}$  toneladas de peso seco de biomasa, que se supone unas diez veces la demanda energética mundial. [Olivia, 2003].

Figura 1.3: Reacción fotosintética en presencia de luz solar



Dependiendo del tipo de fuente a partir de la cual es producido, el bioetanol se clasifica en tres generaciones [SAGARPA, 2011]:

- *Primera Generación:* Proviene de cultivos que pueden ser empleados en la alimentación humana o animal. Los cultivos que tienen altas concentraciones de azúcares, son la caña de azúcar, el sorgo dulce o la remolacha; o altas concentraciones de almidón, como el maíz, la yuca o la papa.
- *Segunda Generación:* Se produce a partir de materias primas con alto contenido de celulosa, como los residuos de la madera o residuos alimenticios (desechos del maíz y el trigo o el bagazo de la caña de azúcar y el de sorgo dulce).
- *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 producción a nivel industrial.

### 1.2.1 Partes de la biomasa y estructura

Las plantas están compuestas de alrededor de 35 tipos de células diferentes, donde la composición y estructura dependen del origen del material. Sin embargo todas las células tienen una pared celular con un espesor de 0.1 a 10 micras que proporciona rigidez y ayuda a evitar el ataque de los patógenos. Los componentes principales del material lignocelulósico se dividen en la celulosa (20-50 %), hemicelulosa (15-35 %), y la lignina (10-30 %) los cuales son los componentes principales de la pared celular y las proteínas (3-10 %), lípidos (1-5 %), azúcares solubles (1-10 %), y minerales (2-10 %) son los componentes menores [Chundawat et al., 2011]. A pesar de los innumerables compuestos de los materiales lignocelulósicos el interés en la producción de bioetanol se concentra la celulosa y hemicelulosa.

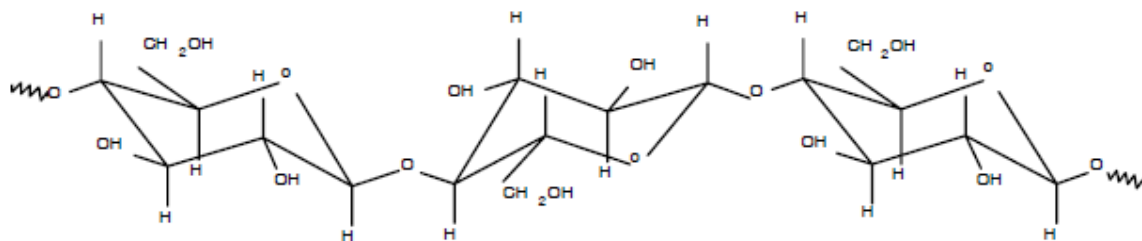
#### 1.2.1.1 Celulosa

Es el componente mayoritario de las paredes celulares de las plantas, es una macromolécula compleja compuesta de cadenas lineales de glucano  $\beta$ -1,4 fuertemente unida por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals de forma



inter e intramolecular debido al apilamiento de las piranosas; la celulosa se organiza en microfibrillas con un diámetro de 3-5 nm (Figura 1.4). El grado de polimerización de la celulosa varía, dependiendo de su origen, entre 100 y 10000. Los bajos rendimientos en la sacarificación de la celulosa se deben a la organización de las cadenas de glucano fuertemente acopladas en el sólido provocando un impedimento, de la misma manera la morfología cristalina que ofrece el sólido. La celulosa presenta múltiples polimorfismos siendo el más abundante el  $I_{\beta}$ , el cual posee dos cadenas monocíclicas. Algunos pretratamientos termoquímicos pueden transformar a la celulosa  $I_{\beta}$  en otros polimorfismos como la celulosa II que se obtiene con hidróxido de sodio, celulosa III en presencia de aminas o amoníaco y celulosa IV por glicerol. Estos diferentes polimorfismos pueden influir en las velocidades de hidrólisis [Chundawat et al., 2011].

Figura 1.4: Estructura primaria de la celulosa [Olivia, 2003].



El anillo de piranososa está en conformación  ${}^4C_1$ , lo que significa, que los grupos  $-\text{CH}_2\text{OH}$  y  $-\text{OH}$ , así como los enlaces glucosídicos, están en posición ecuatorial con respecto al plano medio del anillo, y los átomos de hidrógeno en posición axial. Cuando la molécula de celulosa está completamente extendida y aplanada como una cinta, los grupos  $-\text{OH}$  sobresalen lateralmente, formando los puentes de hidrógeno. La superficie de la cinta, compuesta por átomos de hidrógeno unidos directamente a carbono, es hidrofóbica. Estas dos características de la estructura molecular son las responsables de su estructura supramolecular, y determina muchas de las propiedades físicas y químicas de la celulosa [Olivia, 2003].

### 1.2.1.2 Hemicelulosa

Es un polisacárido constituido por polímeros de unidades de anhidroazúcares unidas por enlaces glucosídicos, formadas por más de un tipo de azúcar (hexosas o pentosas), y además presentan ramificaciones y sustituciones. Su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa. En estado natural existe en forma amorfa con un grado de polimerización que no excede de 200, su extracción es preferentemente por soluciones alcalinas. La composición de la hemicelulosa varía de acuerdo a la especie de la planta difiriendo en el tipo de enlaces glicosídicos, la composición de la cadena lateral, y el grado de polimerización. De acuerdo a esto los complejos se pueden clasificar en cuatro clases estructurales [Olivia, 2003; Chundawat et al., 2011]:

- Xilanos: con una estructura principal  $\beta$ -1,4-xilopiranososa, además de ramificaciones de arabinosa.
- Mananos: polímeros lineal de glucosa y manosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 con predominio de las manosas, y puede presentar ramificaciones de galactosa.
- Los  $\beta$ -glucanos con enlaces mixtos que comprenden  $\beta$ -1,3-1,4.
- Xiloglucanos: con una estructura principal de glucosa unida por enlaces  $\beta$ -1,4 y con cadenas laterales de xilosa.

La xilosa es el monómero más importante en la hemicelulosa. La hemicelulosa de madera dura es rica en xilanos (Figura 1.5), los de madera suave contienen principalmente galactoglucomananos (Figura 1.6) y en pastos el arabinoxilano es el componente principal [Olivia, 2003; Quiroz et al., 2010].

Figura 1.5: Estructura del xilano con ramificaciones de arabinosa y glucosa  
[Guzmán, 2013].

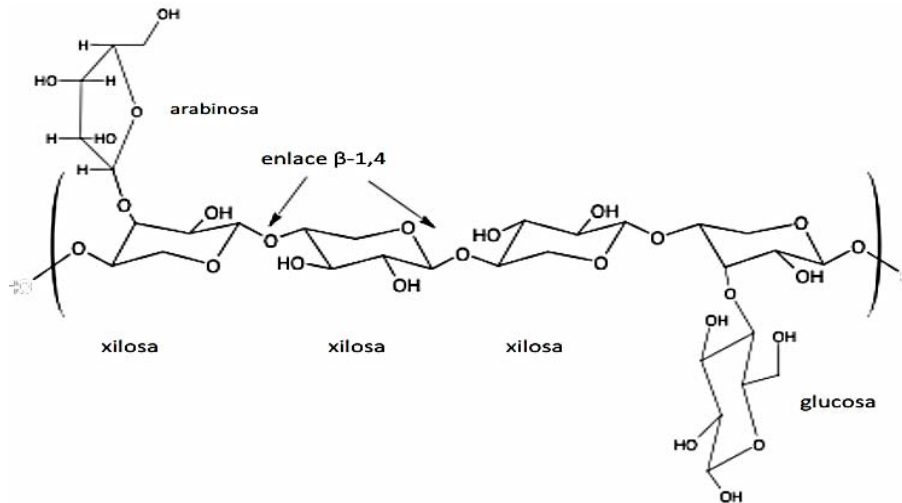
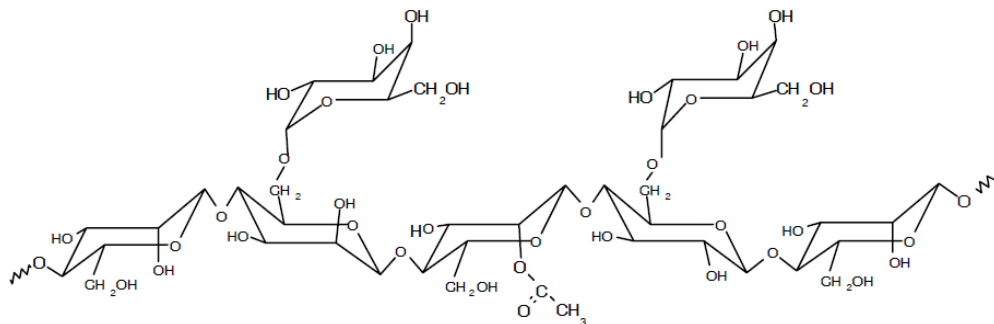


Figura 1.6: Estructura del galactoglucomanano [Olivia, 2003].



### 1.2.1.3 Lignina

Es un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada, es hidrofóbico y altamente resistente a la degradación química y biológica (Figura 1.7). Los monómeros que forman la lignina son los denominados alcoholes cinamílicos (Figura 1.8), que se diferencian entre sí por las diferentes sustituciones en el anillo aromático. Así, el alcohol p-cumarílico que da lugar a las unidades p-hidroxifenilo (H) no presenta ningún sustituyente; el alcohol coniferílico que da lugar a las unidades guayacilo (G) el cual presenta un grupo metóxilo en la posición 3 del anillo aromático y el alcohol sinapílico que da lugar a

las unidades siringilo (S) y presenta dos grupos metoxilo en posiciones 3 y 5 de dicho anillo [Olivia, 2003; Chundawat et al., 2011].

Figura 1.7: Estructura de la lignina [Guzmán, 2013].

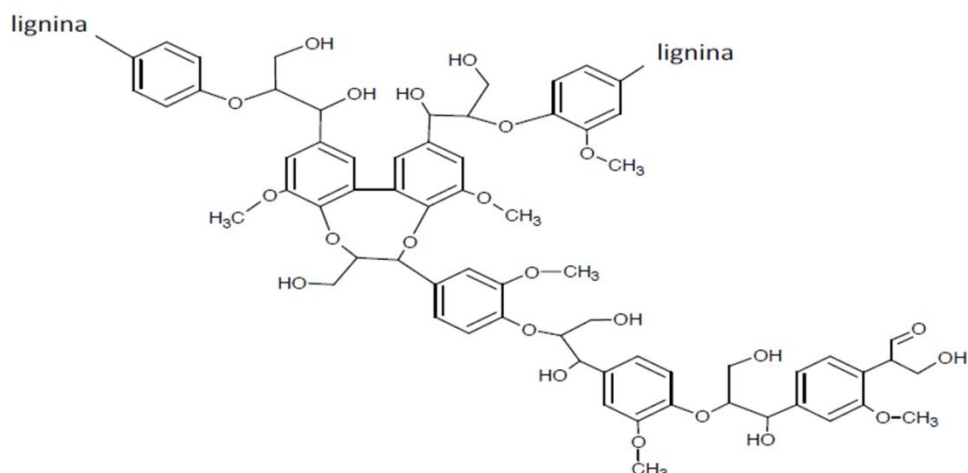
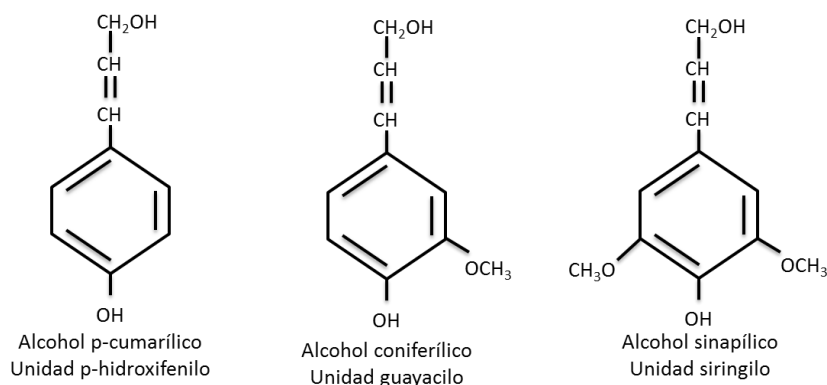


Figura 1.8: Alcoholes cinamílicos o monolignoles precusores de lignina [Olivia, 2003].



En la formación de la pared celular se produce la polimerización de esta mediante la sucesión de una etapa enzimática donde los precusores son oxidados por peroxidadas de la pared dando radicales fenoxilo [Higuchi, 1990] y una etapa química donde los radicales reaccionan al azar lo que ocasiona una gran variedad de formas resonantes por ello la lignina no presenta una única estructura [Hernández, 1997].

Las enlaces pueden ser de tipo condensado C-C, o de tipo no condensado aril-alquil éter, en las que intervienen tanto los anillos aromáticos como las cadenas propílicas [Adler, 1977]. Los enlaces que determinan la alta condensación de la lignina son los enlaces condensados entre unidades H o G, ya que las unidades S al tener dos grupos metoxilo en posiciones 3 y 5 no puede establecer este tipo de enlaces [Olivia, 2003].

La proporción de las tres unidades que forman la lignina y el tipo de enlace difiere según el tipo de planta, el grupo taxonómico, pared celular, desarrollo y condiciones ambientales. Así, una clasificación que se le puede dar a la lignina va de acuerdo al grupo taxonómico [Hernández, 1997].

La lignina en maderas blandas, está formada mayoritariamente por unidades de tipo G, mientras que la lignina de las maderas duras está formada por unidades G y S. La razón de que las maderas duras son más fáciles de designificar que las maderas blandas se debe a las unidades S presentan dos grupos metoxilo en posiciones 3 y 5 del anillo aromático reduciendo la formación de enlaces tipo eter y los enlaces C-C, lo que se traduce en una reducción del grado de polimerización y en un menor grado de condensación. La lignina de las monocotiledóneas incorpora cantidades equivalentes de unidades G y S junto con cantidades significativamente mayores de monolignoles H [Olivia, 2003; Chundawat et al., 2011].

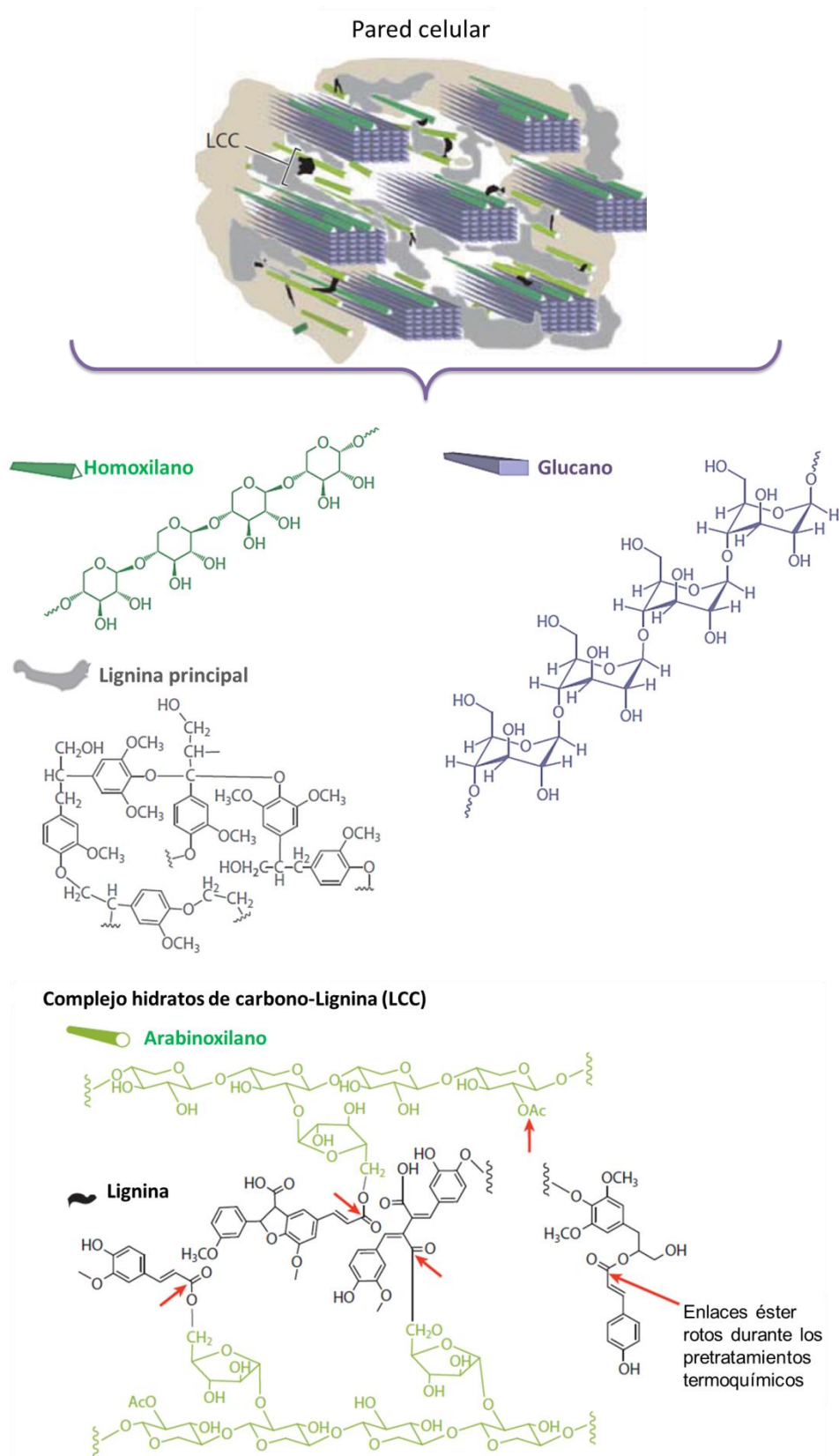
### 1.2.2 Organización del material lignocelulósico

Las hipótesis sobre modelos de las paredes celulares en la actualidad indican una organización de la celulosa en forma de microfibrillas (compuestas de 30 a 36 cadenas de glucano unidas mediante puentes de hidrógeno), rodeadas por una matriz de hemicelulosa y lignina (Figura 1.9).

Las microfibrillas de celulosa se organizan en laminillas sucesivas en la pared primaria, creando una matriz en forma de banda, que están separadas por

hemicelulosa y pectinas que controlan la porosidad de la pared general (<10 nm de tamaño de poro). La hemicelulosa no ramificada (xiloglucanos, homoxilanos, y mananos) forma enlaces de hidrógeno con la superficie de fibrillas de celulosa, mientras que la hemicelulosa ramificada (por ejemplo, ácidos urónicos y arabinosa) se ubica en cadenas laterales y están unidos de forma covalente a la hemicelulosa o lignina para crear enlaces cruzados, también conocidos como complejos de hidratos de carbono-lignina (LCC: lignin carbohydrate complexes). La mayoría de los enlaces de LCC en monocotiledóneas son enlaces éster entre la hemicelulosa y ácidos fenólicos que constituyen una parte de la lignina. El LCC se cree que forma complejos de que excluyen el agua e impiden el ataque químico o enzimático en las paredes celulares [Chundawat et al., 2011].

Figura 1.9 Estructura general de la pared celular [Chundawat et al., 2011].



### **1.3 Pretratamiento aplicados en la biomasa**

La biomasa lignocelulósica presenta una estructura compleja, compuesta de varias fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente a etanol. La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 que a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad. Esta estructura cristalina es la que dificulta la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares fermentables [Olivia, 2003], sumado a esto se encuentra que la lignina es un polímero amorfo el cual dificulta la hidrólisis enzimática.

Los objetivos fundamentales del pretratamiento van encaminados a:

- Reducir la cristalinidad de la celulosa
- Disociar el complejo celulosa-lignina
- Aumentar el área superficial del material
- Disminuir la generación de compuestos tóxicos potencialmente inhibitorios en la fermentación.

Igualmente el pretratamiento debe cumplir las características: bajo consumo de energía, bajo costo de inversión, utilización de reactivos baratos y debe ser aplicable a diversos materiales y no generar residuos altamente contaminantes [Olivia, 2003; Alvira et al., 2010].

Para la elección de un pretratamiento, además de los antes mencionados se debe tomar en cuenta las diferentes características físico-químicas de cada material, ya que la elección del método posee un alto impacto en todo los pasos subsecuentes [Alvira et al., 2010].

Debido a lo anterior se han propuesto innumerables pretratamientos en la última década que van de acuerdo a la naturaleza de la biomasa. Por su naturaleza los pretratamientos pueden ser clasificados como biológicos, físicos, químicos y físico-químicos [Olivia, 2003; Alvira et al., 2010].



### 1.3.1 Pretratamiento biológico

Este es un pretratamiento en el cual el material lignocelulósico se somete a la acción de determinados microorganismos, como los hongos de la podredumbre blanca, marrón o blanda [Olivia, 2003].

La podredumbre blanca ha demostrado mayor eficiencia en la degradación de la lignina pues posee un sistema de enzimas lacasas y peroxidasas [Alvira et al., 2010], en esta clasificación destaca *Phanerochaete chrysosporium*, que durante el metabolismo secundario en respuesta a limitaciones de carbono y nitrógeno, produce enzimas como la lignina peroxidasa y la peroxidasa dependiente de magnesio que degradan la lignina [Olivia, 2003]. Los hongos de podredumbre café remueven selectivamente la hemicelulosa y atacan una parte de la celulosa, por otro lado, los hongos de podredumbre blanda degradan preferentemente la celulosa de las paredes celulares [Alvira et al., 2010].

Este es un método seguro y amigable con el medio ambiente; sin embargo, la velocidad de reacción en la hidrólisis es lenta por lo que requiere mejoras comerciales [Vázquez, 2012]. En general es un proceso que ofrece ventajas como el bajo costo de energía y que es amigable con el ambiente, sin embargo debido a la velocidad lenta en la hidrólisis es necesario la combinación con otros procesos [Alvira et al., 2010].

### 1.3.2 Pretratamientos físicos

#### 1.3.2.1 Trituración mecánica

La reducción del tamaño de partícula, mediante la combinación de astillado y molienda, tiene como objetivo la reducción de la celulosa cristalina y el grado de polimerización del material lignocelulósico, además de que mejora la posterior hidrólisis enzimática. El tamaño de partícula depende de la técnica de trituración pues 10-30 mm se obtiene después del astillado y 0.2-2 mm después de la molienda [Sun & Cheng, 2002]. Existen diferentes procesos de molienda como: el

molino de bolas, molino de dos rodillos, martillos, cuchillas y molino de vibración [Olivia, 2003; Alvira et al., 2010]. Este tipo de pretratamiento tiene el inconveniente de su alto consumo de energía que es proporcional al tamaño final de partícula y las características de la biomasa [Olivia, 2003].

En general es la primera etapa del proceso de transformación de la biomasa a biotanol, ya que es preferible tener un tamaño de partícula menor aumentando de esta forma el área de contacto del material haciendo más eficaz cualquier tratamiento.

### 1.3.3 Pretratamientos químicos

El objetivo de los pretratamientos químicos es solubilizar la mayor fracción de lignina y modificar la estructura de la celulosa facilitando de esta forma la acción enzimática.

#### 1.3.3.1 Pretratamiento ácido

En el medio ácido se favorece la solubilización de hemicelulosa en el residuo lignocelulósico y hace a la celulosa más accesible para las enzimas. Este pretratamiento puede ser a partir de un ácido concentrado o uno diluido. Los ácidos comúnmente empleados son el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$  o  $\text{HNO}_3$  en concentraciones de 0.75-5 % en presencia de 5-10 % de biomasa seca a 160-200 °C [Sánchez & Cardona, 2008].

El uso del ácido concentrado es menos atractivo para la producción de etanol pues ocasiona la formación de compuestos inhibitorios durante el pretratamiento, conjuntamente el equipo sufre de corrosión y existen problemas en la recuperación del ácido, resultando también muy costosa la etapa de neutralización antes de la fermentación o sacarificación [Sánchez & Cardona, 2008; Alvira et al., 2010].

Los procesos que emplean ácidos diluidos tienen su principal ventaja en el relativamente bajo consumo de ácidos. Sin embargo, se requieren altas temperaturas para alcanzar rendimientos aceptables de conversión de celulosa a glucosa. Las temperaturas que se emplean en estos procesos originan una mayor corrosión en los equipos empleados y aumenta la tasa de degradación de los azúcares hemicelulósicos los cuales pueden afectar a la posterior etapa de fermentación [Olivia, 2003].

### 1.3.3.2 Pretratamiento alcalino

El método está basado en los efectos que tiene la adición de bases diluidas lo que provoca en la biomasa un incremento en la digestibilidad de la celulosa y es más efectivo en la solubilización de la lignina que incluso el uso de ácido o procesos hidrotérmicos [Alvira et al., 2003].

Hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio son usualmente usados en los pretratamiento alcalinos. El hidróxido de sodio causa un incremento en la estructura interna de la celulosa y disminuye el grado de polimerización y cristalinidad [Sánchez & Cardona, 2008; Alvira et al., 2010]. El mecanismo de la hidrólisis alcalina en la biomasa está asentada en la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares que unen a la lignina con la hemicelulosa [Sun & Cheng, 2002].

El hidróxido de calcio es otra base que ha demostrado que en combinación con temperatura da buenos resultados, pues es capaz de remover los grupos acetilos de la hemicelulosa reduciendo el impedimento estérico para la acción enzimática y mejora la digestibilidad de la celulosa. Su recuperación es a partir de la hidrólisis con  $\text{CO}_2$  [Alvira et al., 2010]. También la adición de un agente oxidante (oxígeno/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a un pretratamiento alcalino ( $\text{NaOH}/\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) presenta un efecto favorable y más potente que solo el pretratamiento alcalino, este es útil para materiales con un contenido mayor al 26% de lignina [Oliva, 2003; Alvira et al., 2010].

Los pretratamientos alcalinos pueden ser aplicados con o sin temperatura y en tiempos diversos que pueden ir desde segundos hasta días. Los álcalis provocan una menor degradación de los azúcares y es más eficaz en residuos provenientes de la agricultura que en maderas. Además durante el proceso genera menor cantidad de compuestos inhibitorios para una posterior fermentación [Sánchez & Cardona, 2008; Alvira et al., 2010].

#### 1.3.3.4 Ozonólisis

El ozono es un fuerte oxidante soluble en agua que muestra una alta eficacia en la deslignificación del material. La degradación se limita a la lignina ya que la hemicelulosa es atacada ligeramente y la celulosa no sufre ningún cambio. El fundamento del método tiene origen en la alta reactividad que tiene el ozono con compuestos que contienen dobles enlaces conjugados en su estructura, por ello, el compuesto más factible a ser oxidado durante la ozonólisis es la lignina, debido a su alto contenido de enlaces C=C. El ozono ataca la lignina liberando principalmente ácidos orgánicos como el fórmico y el acético los cuales pueden traer como resultado una caída del pH desde 7 hasta 2. Por esta razón, el proceso puede llevarse a cabo en un medio tamponado de pH =7 [Olivia, 2003; Alvira et al., 2010; Vázquez, 2012].

Entre las ventajas en que se lleva a cabo este proceso son el uso de temperatura y presión ambiental y la remoción de la lignina sin producir ningún tipo de residuos tóxicos que inhiban la fermentación. La principal limitación de la ozonólisis, es la utilización de grandes cantidades de ozono lo que provoca que sea un proceso caro [Sun & Cheng, 2002; Alvira et al., 2010; Vázquez, 2012].

#### 1.3.3.5 Organosolv

Se utilizan una mezcla de disolvente orgánicos como el metanol, etanol, acetona y etilenglicol acompañado de un catalizador ácido como el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HCl lo que ocasiona la ruptura de los enlaces internos de lignina-hemicelulosa También pueden emplearse ácidos orgánicos como el ácido oxálico, acetilsalicílico y

salicílico como catalizadores [Oliva, 2003]. La remoción de los solventes del sistema es necesaria, ya que pueden actuar como inhibidores tanto en la hidrólisis como en la fermentación, los métodos de separación comprenden las técnicas tradicionales de evaporación y condensación. [Sun & Cheng, 2002; Alvira et al., 2010]. El pretratamiento organosolv ha mostrado eficiencia en maderas blandas [Sánchez & Cardona, 2008].

#### 1.3.4 Pretratamientos físicoquímicos

##### 1.3.4.1 Explosión de vapor

El material lignocelulósico triturado se somete a temperatura entre 190-230 °C, mediante la inyección directa de vapor saturado, en un intervalo de tiempo entre 1-10 minutos. Tras el tiempo de tratamiento, se somete el material a una rápida despresurización ocasionando una explosión. El efecto del pretratamiento sobre la biomasa es una combinación de alteraciones físicas ocasionada por la rápida despresurización dando origen a la despolimerización y ruptura de las fibras principalmente en las regiones débiles, simultáneamente ocurren alteraciones químicas que se deben a la hidrólisis de los restos acetilos de las hemicelulosas produciendo ácido acético, que a la temperatura del proceso, cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa (autohidrólisis). Durante el tratamiento se destruyen parcialmente los enlaces lignina-carbohidrato y como resultado, se obtiene un producto fibroso cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis enzimática. La hemicelulosa se despolimeriza, siendo fácilmente recuperada por lavado. La lignina, prácticamente sin alterar puede ser extraída y utilizada con diferentes fines. Las variables más importantes en el pretratamiento de explosión por vapor son la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula y la humedad [Olivia, 2003; Alvira et al., 2010].

El método es efectivo en el tratamiento de maderas duras y residuos agrícolas. Sin embargo, este pretratamiento se ha mostrado menos eficaz con las maderas blandas, debido a su mayor contenido en lignina, por lo que se ha

modificado adicionando SO<sub>2</sub> el cual no es corrosivo aumentando la eficiencia de la hidrólisis enzimática [Olivia, 2003; Alvira et al., 2010; Vázquez 2012].

#### 1.3.4.2 Explosión por vapor con amoníaco (AFEX)

Es un proceso similar a la explosión por vapor en el que el material es impregnado con amoníaco líquido ( $1-2 \text{ kg amoníaco} / \text{kg biomasa seca}$ ) a una temperatura ~90 °C y un tiempo aproximado de 30 minutos, seguido de una rápida descompresión [Sun, 2002]. La diferencia con la explosión por vapor y otros tipos de pretratamiento ácidos, es que en este proceso no se solubiliza la hemicelulosa. Utilizando materiales con bajo contenido en lignina (hasta un 15 % como los residuos herbáceos), se han obtenido rendimientos de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa del 90 %, después del pretratamiento. Sin embargo, este proceso no es tan efectivo con biomásas con un mayor contenido en lignina [Olivia, 2003; Sánchez & Cardona, 2008].

Como ventajas del proceso pueden citarse que no se producen inhibidores que puedan afectar a las posteriores etapas del proceso de producción de etanol y no requiere un tamaño de partícula menor para aumentar su eficiencia [Olivia, 2003].

#### 1.3.4.3 Explosión con CO<sub>2</sub>

Es un proceso similar a la explosión por vapor o al proceso AFEX y es muy utilizado. El tratamiento se lleva a cabo con altas presiones con temperaturas hasta 200 °C, mediante la despresurización del sistema ocurre una explosión de la biomasa que se encuentra inmersa con dióxido de carbono formando así ácido carbónico, lo que aumenta la hidrólisis [Sun & Cheng, 2002]. Aunque los rendimientos obtenidos son relativamente bajos comparados con la explosión por vapor y el proceso AFEX, los estudios realizados con bagazo de caña y papel reciclado, demostraron que este proceso es más barato que la explosión con amoníaco y no origina los compuestos inhibitorios [Zheng et al., 1998; Olivia, 2003].

#### *1.3.4.4 Pretratamiento con agua caliente líquida, Liquid Hot Water (LHW)*

Es otro tratamiento hidrotérmico que no requiere de una rápida descompresión y ningún catalizador químico. Este se lleva a cabo en un reactor el cual debe estar presurizado (presiones superiores al punto de saturación) para mantener el agua en estado líquido a temperaturas entre 160-240 °C durante un tiempo aproximado de 30 min. El objetivo del pretratamiento es principalmente solubilizar la hemicelulosa para dejar más accesible la celulosa y evitar la formación de inhibidores de la fermentación mientras que la lignina es parcialmente despolimerizada y solubilizada pero la completa deslignificación no es posible solo con agua caliente. Sin embargo este pretratamiento es altamente eficiente en materiales que no presentan alto contenido de lignina como: bagazo de caña y residuos herbáceos [Alvira et al., 2010; Vázquez, 2012].

#### *1.3.4.5 Oxidación húmeda*

Utiliza oxígeno como oxidante de compuestos disueltos en agua. Es un pretratamiento efectivo en la remoción de lignina y la solubilización de hemicelulosa en el cual ocurren dos reacciones durante el proceso, la primera es una reacción de hidrólisis a baja temperatura y la segunda es una reacción de oxidación a altas temperaturas, el reactivo que se usa es  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a una temperatura de 195 °C por 10-20 min. Durante la oxidación húmeda la lignina es descompuesta hasta dióxido de carbono, agua y ácidos carboxílicos, lo que permite removerla entre un 50 % a 70 %. No obstante, una de las desventajas del proceso es que la cantidad de productos indeseados formados, es mayor que en otros pretratamientos por oxidación, como la explosión por vapor [Vázquez, 2012].

### **1.4 Hidrólisis enzimática en el material lignocelulósico**

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un cóctel enzimático denominada genéricamente glucosil-hidrolasas, que son en realidad, una mezcla de enzimas con distintas actividades cuya acción conjunta produce la degradación

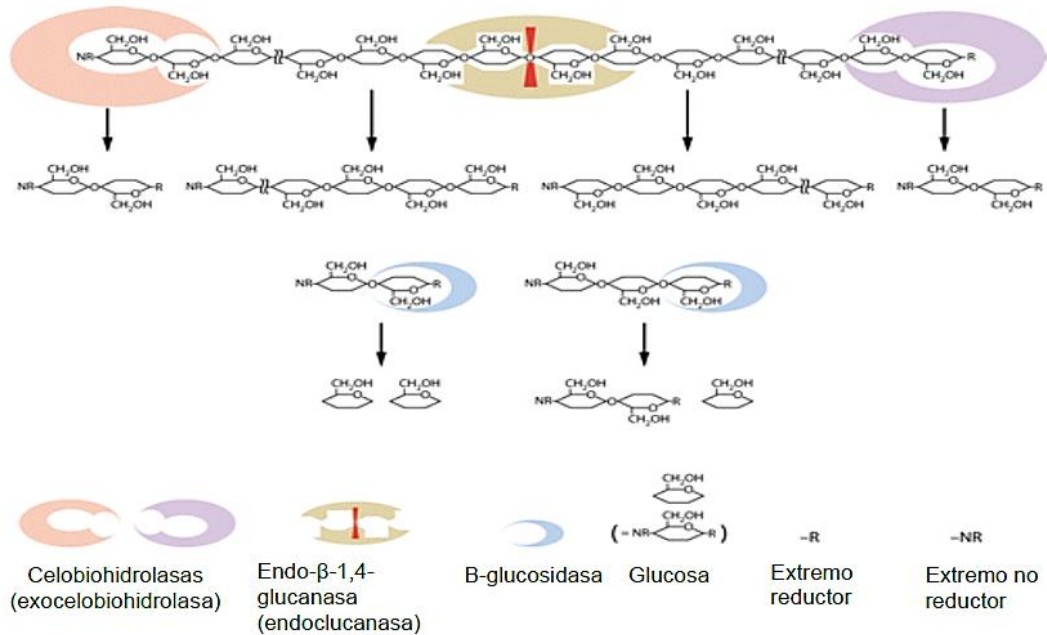
de la celulosa y hemicelulosa. Algunas de estas mezclas se componen de [Olivia, 2003; Vázquez, 2012; Guzmán, 2013]:

- *Endo- $\beta$ -D-glucanasas o  $\beta$ -(1,4)-glucanglucanohidrolasa*: actúa al azar en el interior del polímero, hidrolizando enlaces  $\beta$ -1,4 y generando nuevos finales de cadena no reductores. Puede actuar sobre celodextrinas, carboximetilcelulosa (CMC), hidroximetilcelulosa (HMC).
- *Exo-1,4- $\beta$ -D-glucanasas (celobiohidrolasas (CBH) y glucohidrolasa (GGH))*: liberan las unidades de glucosa o celobiosa como productos principales. Las celobiohidrolasas son de dos tipos, CBH1 y CBH2, que trabajan en el extremo reductor y no reductor de la celulosa, respectivamente.
- *1,4- $\beta$ -D-glucosidasa*: hidrolizan la celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño a glucosa.

La adición del cóctel de enzimas es recomendada después del pretratamiento para propagar la hidrólisis del material de forma más eficiente. En la figura 2.10 se presenta en el mecanismo de la hidrólisis enzimática de la celulosa siendo uno de los primeros pasos la adsorción de las celulasas dentro del sustrato. El pH y la temperatura son los factores principales que tienen efecto en la adsorción de la enzima, siendo una adsorción máxima a un pH de 4.8 y a una temperatura de 50 °C [Barrera et al, 2012].



Figura 1.10: Hidrólisis enzimática de la celulosa [Guzmán, 2013].



## 1.5 Biomasa agroindustrial

Los residuos lignocelulósicos utilizados durante el estudio fueron la corona de la piña y el residuo del nopal.

### 1.5.1 Corona de la piña

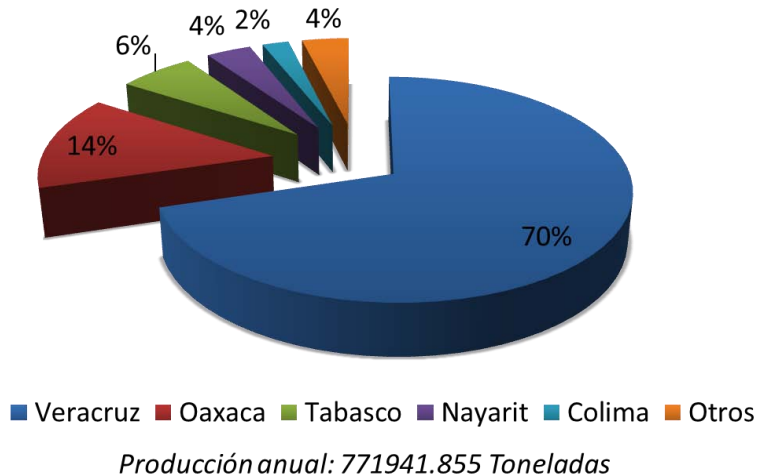
La piña es una planta que pertenece a las bromeliáceas, género Anana y especie comosus. La piña incluye alrededor de 1400 especies en todo el mundo, muchos de los miembros de esta familia son epifitos, es decir, viven encima de otras plantas en zonas de clima tropical, nacen sobre tierra firme (Figura 1.11). Es una planta que llega a alcanzar hasta 1.5 metros de altura, los frutos pueden ser de más de 30 cm de largo y existen diferentes variedades del cultivo [Quesada et al., 2005].

Figura 1.11: Plantación de piña en Veracruz.



En México, dentro de las regiones con agricultura tropical, uno de los cultivos de relativa importancia por su carácter económico y social es la producción de piña (*Ananas comosus* (L) Merr). La producción a nivel nacional durante el 2013 se presenta en la gráfica 1.2.

Gráfica 1.2: Producción de piña en México en el 2013. [Tomado y modificado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>].



A su vez, la principal región productora de Veracruz se ubica en la Cuenca del Papaloapan, en donde destacan las poblaciones de Villa Isla, José Azueta y Juan Rodríguez Clara. Alrededor del 5 % de la producción anual es exportada [Hernández, 2008].

La planta adulta presenta de 70 a 80 hojas siendo las más jóvenes ubicadas en el centro. La parte superior de la hoja tiene una apariencia cerosa. La epidermis superior está cubierta por una capa de cutícula que evita la excesiva evaporación. La composición química de la corona de la piña puede variar dependiendo de la especie y el estado de la planta [Quesada et al., 2005; Hernández, 2008]. Una aproximación se presenta en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: Composición de la corona de piña en base seca [Quesada et al., 2005].

Ensayo	Contenido (% p/p)
Cenizas	4.6 ± 0.01
Humedad	13.5 ± 0.2
Lignina	27.72 ± 0.01

Debido a que es una parte de la piña que no sirve directamente para la alimentación humana, no se ha estudiado a fondo en la composición química, de la misma manera tampoco se ha probado en la elaboración de etanol carburante, por lo que no se encuentra en la bibliografía.

### 1.5.2 Residuo del nopal

El nopal es un cactus del género *Opuntia*, subfamilia *Opuntioideae*, familia *Cactaceae*, crece en zonas áridas (precipitación anual < 250 mm) y semi-áridas (precipitación anual de 250 a 450 mm). La *opuntia* incluye 200–300 de especies y produce un fruto denominado tuna. Debido a su variabilidad genética notable, plantas de *Opuntia* muestran una alta adaptabilidad ecológica y se encuentra en todo el continente Americano, el Mediterráneo, África, Oriente Medio, Australia, y también en la India [Stintzing & Carle, 2005]. Actualmente el nopal es usado como alimento, con fines medicinales y cosméticos, como forraje, material de construcción, y como una fuente de colores naturales. [Esquivel, 2004].

En cuanto al cultivo nacional, México (Figura 1.12) cuenta con 12500 hectáreas sembradas de nopal y una producción en el 2013 de 786774.52

toneladas, siendo el estado del Morelos el mayor productor, la cosecha se realiza en los meses de julio a septiembre principalmente. En la gráfica 1.3 se muestra los principales estados productores.

Gráfica 1.3: Producción de nopal en México en el 2013. [Tomado y modificado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>].

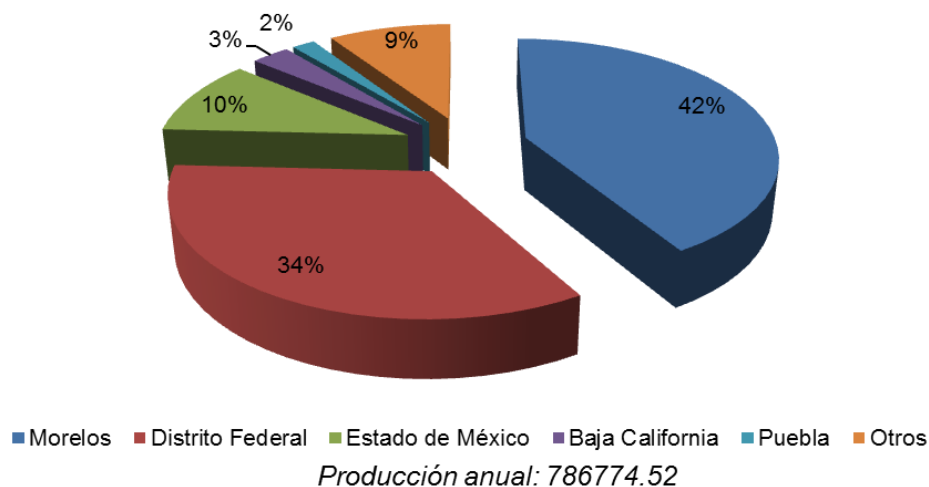


Figura 1.12: Cultivo de nopal en Morelos.



El nopal cuenta con segmentos denominados como cladodios, que aunque no coincidan con los criterios morfológicos, son considerados como las hojas del cactus ya que cumplen la función fotosintética, además cuenta con espinas que sirve de protección a la planta.

La composición del cladodio varía dependiendo del sitio de cultivo, la estación y la edad de la planta. Por lo tanto, el contenido de nutrientes respectivos

varían tanto entre especies y variedades por lo que no deben tomarse como valores absolutos [Stintzing & Carle, 2005]. A continuación se presenta la composición de los cladodios de acuerdo a la bibliografía:

Tabla 1.2: Composición del cladodio del nopal [Malainine et al., 2003].

Ensayo	Contenido (% p/p) en base seca
Cenizas	19.60
Lípidos y ceras	7.20
Lignina	3.60
Celulosa	21.60
Otros polisacáridos	48

Los cladodios jóvenes muestran mayor cantidad de carbohidratos de carbono, proteínas y contenido de agua entre el 88-95 %. Por otro lado las espinas están constituidas por 96 % de polisacáridos, que a su vez se divide en 49.7 % de celulosa y un 50.3 % arabinano, siendo el resto de cenizas, grasas y ceras, así como la lignina [Stintzing & Carle, 2005].

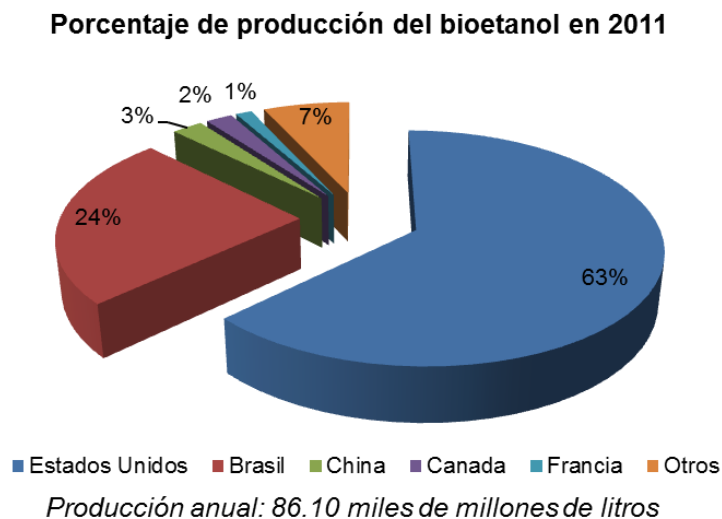
El mucílago del nopal proviene de la degradación de las sustancias pécticas, que son biopolímeros compuestos de polisacáridos tales como pectinas. Tal composición es útil como una materia prima potencial para la producción de películas plásticas comestibles. El mucílago del nopal, contiene galactosa arabinosa, ácido galacturónico, ramnosa y xilosa. Los estudios de la degradación del mucílago se han hecho mediante diversas técnicas como la metilación de este obteniendo una hidrólisis parcial. Por otro lado también se ha estudiado como medio de la incubación para hongos [Olivares et al., 2012].

### 1.6 Perspectiva del bioetanol en el mundo y en México

Las energías renovables crecieron a una tasa promedio anual de 2.9 % de 1990 a 2010 a nivel mundial, y contribuyeron con 19.4 % de la generación de energía eléctrica mundial. Desde hace dos décadas, el proceso de transición a la utilización de energía renovable se ha acelerado en varios países del mundo, debido a importantes inversiones en la explotación y su uso, como el caso de Alemania, España, Dinamarca, Estados Unidos, Brasil, India y China [SENER, 2012].

La producción de etanol carburante a partir de diferentes fuentes ha crecido en los últimos años, no sólo para reducir la dependencia internacional del petróleo como una medida para preservar las reservas existentes, sino como una medida para mitigar problemas ambientales como el calentamiento global. Los principales productores de etanol combustible del mundo son los Estados Unidos y Brasil, con una producción mundial de 63 % y 24 % (Gráfica 2.4) [Yang, 2008 y SENER, 2010].

Gráfico 1.4: Producción de biocombustibles durante el 2011 [SENER, 2012].



El mayor productor mundial de etanol, es Estados Unidos, con una producción a partir de maíz. El programa de este país es reciente y encuentra su

justificación en el hecho de representar una alternativa como aditivo oxigenante, en sustitución de los esteres derivados del petróleo. El segundo mayor productor mundial de etanol es Brasil. El etanol brasileño es producido a partir de caña de azúcar y ha sido usado desde hace más de treinta años en ese país como sustituto de gasolina. Actualmente, el consumo de bioetanol en Brasil es equivalente al de la gasolina (en correspondencia 1:1), su costo es competitivo aún sin los subsidios. Los automóviles producidos en Brasil en 2008, fueron 90 % Flex fuel, capaces de operar con combustibles de variadas composiciones, desde etanol anhidro (E100) hasta gasolina con un 20 % de etanol (E20). Brasil tiene una gran disponibilidad de tierras para la expansión de la producción de etanol de caña de azúcar. [SENER, 2010]. A pesar de los continuos aumentos en la producción las tasas de crecimiento se desaceleraron considerablemente en el mundo a partir de 2009, y por primera vez desde el año 2000, la producción solo creció 10 % en 2009 y en 2010 aumentó 20 %. No obstante, la producción de etanol se estimó en 86.1 mil millones de litros en 2011, lo que representó cuatro veces más la producción registrada en 2000 [SENER, 2012].

En México se está buscando la manera de introducir los biocombustibles en una forma sustentable con productores nacionales y así poder impulsar el desarrollo rural. La Secretaría Nacional de Energía (SENER) ha otorgado al mes de Junio del 2012, 29 permisos para la producción, almacenamiento, transporte, distribución y comercialización de Bioenergéticos, para su producción se han establecido diversos programas, tales como el *“Programa de Producción Sustentable de Insumos para Bioenergéticos y de Desarrollo Científico y Tecnológico 2009-2012”*, a cargo de la SAGARPA; y *“los programas en materia de bioenergéticos”*, a cargo de la SENER. Algunos cultivos que se consideran para la producción de biocombustibles en el país son la remolacha, sorgo dulce, caña de azúcar, jatropha, higuera y palma de aceite. El avance en las investigaciones en esta materia establecerá cuales de estos cultivos tienen el potencial para la producción de biocombustibles y cuáles serán incluidos con base en la rentabilidad económica que presenten. Posteriormente se podrán ir sumando la

segunda y tercera generación de cultivos bioenergéticos, a través del desarrollo científico y tecnológico, asimismo se fomentará el desarrollo del mercado para 2030 [SENER 2012].

De acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en México existen hasta 18 mil hectáreas con condiciones para cultivos agrícolas que, en su caso, podrían aprovecharse para convertirse en biocombustibles (Tabla 1.3), es prescindible denotar que estos cultivos incluyen a aquellos destinados a alimentación. El desarrollo de esta actividad agrícola depende, principalmente, de la disponibilidad de la tecnología necesaria para hacer competitiva su producción.

Tabla 1.3: Potencial productivo de cultivos aptos para la producción de biocombustibles (Miles de hectáreas)

Cultivo	Bioenergético	Potencial Medio	Potencial Alto	Localización
Caña de azúcar	Etanol	460	4,313	22 estados de la República
Higuerrilla	Biodiésel	3,960	6,345	30 estados de la República
Jathrofa	Biodiésel	2,620	3,468	28 estados de la República
Palma de aceite	Biodiésel	242	293	Chiapas, Campeche, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Veracruz
Remolacha azucarera	Etanol	1,725	2,008	32 estados de la República
Sorgo dulce	Etanol	2,072	2,200	22 estados de la República

El principal inconveniente con el que se enfrenta la comercialización de los biocombustibles en el sector de transporte es el alto costo de fabricación para llegar a realizar una sustitución completa actualmente. De esta forma la manera más sencilla e inmediata para utilizar el etanol como combustible es a través de mezclas con gasolina en vehículos ya existentes.



## **2. HIPÓTESIS**

Al someter los residuos agroindustriales a un pretratamiento físicoquímico (hidrotérmico/alcalino) se provocará su deslignificación, aumentando la biodisponibilidad de la celulosa contenida en el material para una posterior hidrólisis enzimática. Esto ocasionará un aumento de la concentración de azúcares potencialmente fermentables a etanol. Además estos azúcares serán mayores en materiales pretratados que en los no pretratados.

### **3. OBJETIVO**

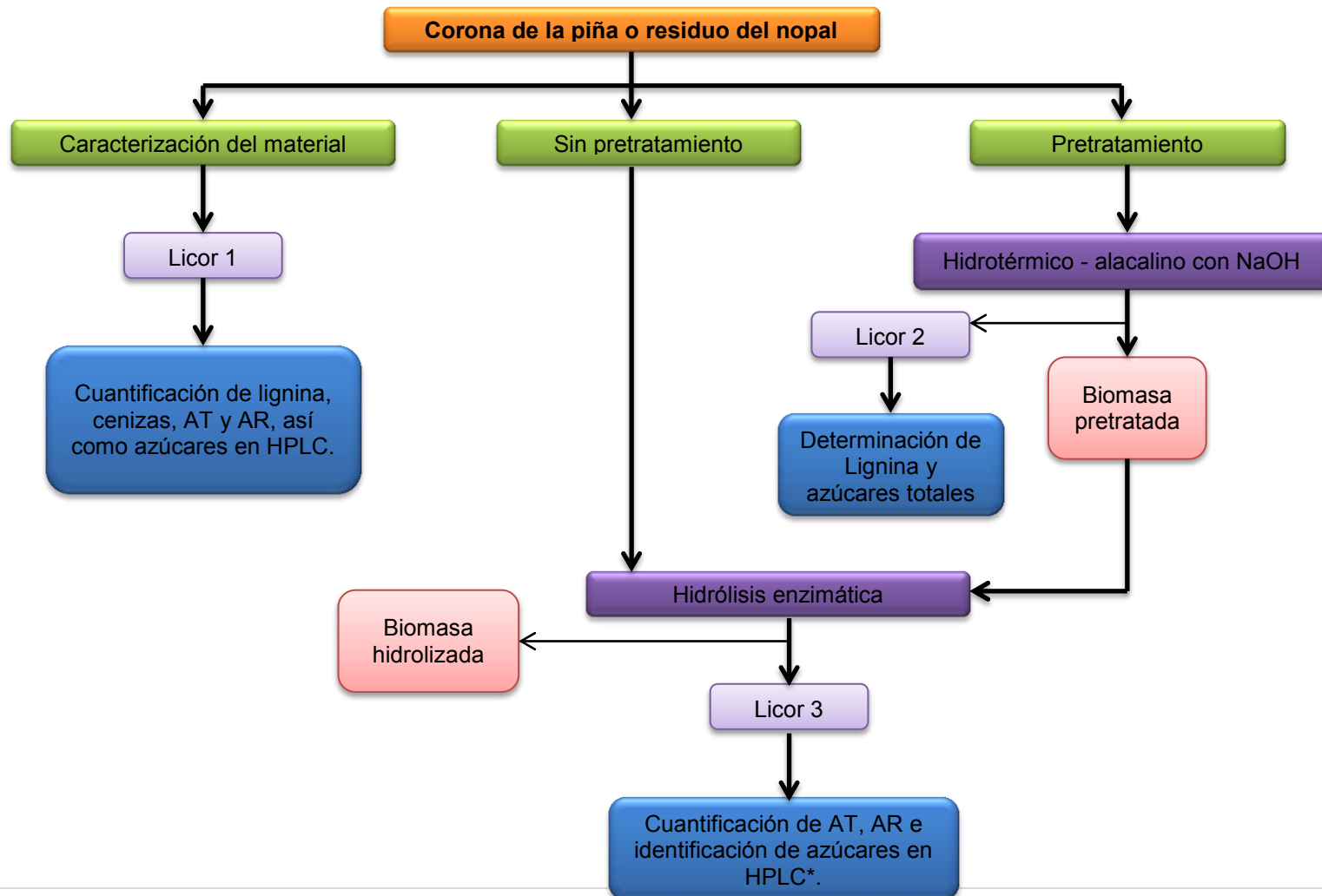
Evaluar el efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en la corona de la piña y residuo del nopal sobre la generación de azúcares potencialmente fermentables a partir de una hidrólisis enzimática efectuada con un cóctel enzimático comercial, para elegir las condiciones óptimas del pretratamiento y sacarificación en cada biomasa.

#### **3.1 *Objetivos parciales***

- Caracterizar la corona de la piña y el residuo del nopal para obtener el contenido y perfil de azúcares así como el contenido de lignina.
- Evaluar la hidrólisis enzimática sobre la biomasa sin pretratar con los cocteles enzimáticos *E6*, *E7*, *E9* y *E10* mediante la cuantificación de azúcares totales y reductores, con el fin de obtener la eficiencia de la sacarificación en un residuo lignocelulósico sin pretratar.
- Valorar el efecto de cada pretratamiento hidrotérmico/alcalino con NaOH para la deslignificación de la biomasa, determinando la lignina soluble y azúcares totales.
- Discutir el efecto de cada pretratamiento hidrotérmico/alcalino en la hidrólisis enzimática de la biomasa, cuantificando la concentración de azúcares totales y azúcares reductores, del mismo modo la obtención del perfil de carbohidratos mediante HPLC.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Diagrama General



#### **4.2 Obtención de la corona de la piña y el residuo del nopal**

Se empleó corona de la piña y residuo del nopal (la fracción que es removida al realizar su venta al público), los cuales se recolectaron en un mercado ambulante cercano al Instituto Mexicano del Petróleo. Se acondicionaron los residuos para poder realizar el trabajo experimental. En el caso de la corona de la piña (Figura 4.1) se retiraron las hojas de la penca y se cortó un pedazo pequeño del cual se determinó la humedad del material fresco en la termobalanza marca OHAUS modelo MB45, el resto se secó en una estufa de convección a 50 °C por 24 horas hasta llegar a un porcentaje de humedad menor al 10 % para su posterior trituración. El residuo del nopal (Figura 5.1) se cortó en pedazos pequeños del cual también se determinó la humedad del material fresco, se prosiguió a secarlo de la siguiente forma: secado al aire libre bajo techo por tres días y en una Estufa a 50 °C conectada a bomba de vacío por 24 horas. Después se trituro y finalmente ambos residuos se tamizaron en las siguientes mallas: 20, 40 y 60, y cada fracción se almaceno para su posterior uso.

Figura 4.1: Corona de piña (izquierda) y residuo de nopal (derecho) que fueron empleados para este trabajo. Ambos materiales en forma fresca.

Corona de piña



Residuo del nopal



Se caracterizó cada material mediante la digestión ácida, determinando así el contenido de lignina en dos fracciones, lignina soluble al ácido y lignina insoluble al ácido (expresado en % LSA y % LIA respectivamente), también los azúcares totales (% AT), azúcares reductores (% AR), cenizas y el tipo de

azúcares de cada residuo biomásico. La caracterización del material se realizó para obtener un perfil de los residuos agroindustriales a estudiar, es decir, obtener las cantidades máximas de lignina y azúcares que posee cada biomasa.

El método utilizado para la caracterización de la biomasa fue el descrito en el reporte técnico del Laboratorio de Energía Renovable Nacional (NREL, por sus siglas en inglés) [Sluiter et al., 2010].

### **4.3 Digestión ácida**

La técnica es usada en los residuos lignocelulósicos debido a que estos poseen una estructura resistente, compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina, que necesitan ser hidrolizados para la cuantificación de los componentes antes mencionados, por lo que la digestión ácida es una reacción que permite la caracterización de la biomasa obteniendo la cuantificación más cercana del contenido de lignina y de azúcares. Sin embargo, la técnica no puede ser usada como pretratamiento de la biomasa ya que forma inhibidores que interfieren para su posterior fermentación, estos son derivados de furfural que provienen de la degradación de los azúcares contenidos de la biomasa, el furfural y el hidroximetilfurfural que se producen en diferentes cantidades de acuerdo a la naturaleza del material [Sánchez & Cardona, 2008].

La reacción se realizó en un matraz con rosca, en el cual se pesó 300 mg de biomasa con un tamaño de la malla 60 y se añadió 3 mL de ácido sulfúrico al 72 %, a continuación se incubó a 30 °C en un baño de agitación marca HAAKE modelo SWB-25 por una hora con agitación constante de 150 rpm, después se diluyó el ácido sulfúrico hasta el 4 % con agua destilada e inmediatamente la reacción fue transferida a una autoclave marca YAMATO modelo SE510 a 121°C por una hora. Posteriormente se filtró la solución al vacío para separar el líquido (al cual fue medido el volumen y recuperado) de los sólidos [Sluiter et al., 2010].

#### 4.4.1 Determinación de lignina insoluble en ácido

La lignina insoluble en ácido (LIA) se cuantificó a partir del sólido remanente de la digestión ácida, este se lavó con agua destilada y secó en una estufa de convección a 105 °C hasta obtener un peso constante obteniendo así el residuo insoluble al ácido (RIA), consecutivamente el sólido se colocó en una mufla marca LINDBERG/BLUE modelo BF51866A-1 a 550 °C por 24 horas, a continuación se pesó obteniendo el contenido de las cenizas. Para obtener el contenido de la LIA es necesario tomar el peso del RIA y restar el contenido de cenizas; el contenido de LIA debe ser expresado en % LIA contenido en biomasa seca [Sluiter et al., 2010; Barrera et al., 2012].

$$\% RIA = \frac{\text{Peso del sólido remanente seco}}{\text{Peso de la biomasa seca}} * 100$$

$$\% LIA = \frac{RIA - \text{cenizas}}{\text{Peso de la biomasa seca}} * 100$$

#### 4.4.2 Determinación de lignina soluble en ácido

En el líquido obtenido de la digestión ácida, se encuentra solubilizada una porción de lignina a la cual se le denomina lignina soluble en ácido (LSA) esta se determinó en un espectrofotómetro UV-vis marca THERMO SPECTRONIC modelo HELIOS. La lectura se realizó mediante un espectro UV-vis de 190 a 500 nm, y se determinó la longitud de onda a la que se debió leer la lignina soluble para cada biomasa en el estudio. Dicha longitud fue seleccionada comparando el espectro obtenido con respecto al de otros materiales ya estudiados por el equipo de trabajo, así como la naturaleza del material lignocelulósico y las recomendaciones de NREL (Gráfica 4.1, Tabla 4.1) [Sluiter et al., 2010]. Para la corona de piña es de 240 nm por tratarse de un residuo agrícola que contiene material duro, mientras que para el residuo del nopal es de 320 nm por ser una hoja de planta. La determinación de la LSA se debe realizar dentro de un periodo no mayor de 6 horas después de la digestión ácida, debido a que lignina se

encuentra solubilizada en un medio ácido y puede repolimerizarse fácilmente [Barrera et al., 2012]. La ecuación que fue utilizada para establecer el contenido de LSA es la siguiente:

$$\% LSA = \frac{UVabs * Volumen\ del\ filtrado * dilución}{\epsilon * peso\ de\ la\ biomasa\ sin\ humedad * ancho\ de\ la\ celda} * 100$$

Dónde:

UVabs = valor de la absorbancia de la muestra

Volumen del filtrado: (L)

$\epsilon$ : absortividad de la biomasa a la longitud de onda específica (L/gcm).

Peso de la biomasa sin humedad: (g)

Ancho de la celda: (cm)

Dilución:

$$Dilución = \frac{Volumen\ final}{Volumen\ de\ la\ muestra}$$

Gráfica 4.1: Espectros UV-vis de diferentes materiales lignocelulósicos obtenidos en el equipo de trabajo.

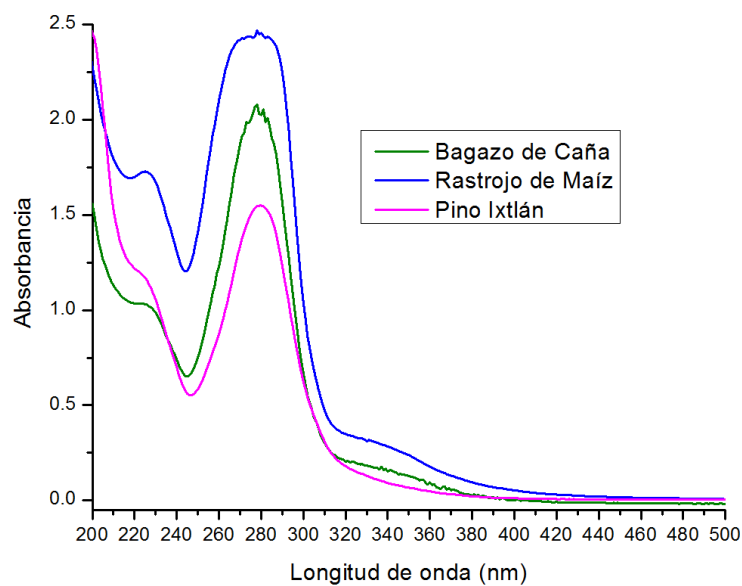


Tabla 4.1: Constante de absortividad para medir lignina soluble al ácido para distintos tipos de biomasa [Sluiter et al., 2011].

Material lignocelulósico	Lambda max (nm)	Absortividad a la lambda max (L/gcm)	Longitud de onda recomendada (nm)	Absortividad a la longitud de onda recomendada (L/gcm)
Pinus radiata	198	25	240	12
Bagazo	198	40	240	25
Rastrojo de maíz	198	55	320	30
Pupulus deltoides	197	60	240	25

#### 4.4.3 Determinación de lignina total

La obtención de la lignina total (LT) del material es simplemente la suma de la LIA y la LSA siguiendo:

$$\% LT = \% LIA + \% LSA$$

#### 4.4 Azúcares solubles presentes en material lignocelulósico

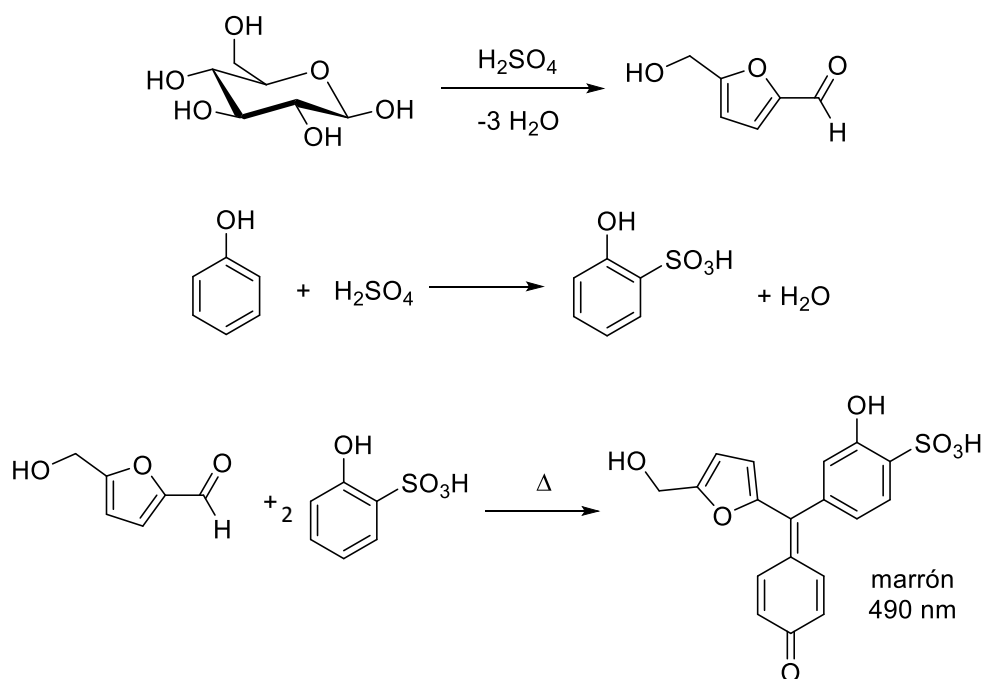
La corona de piña y el residuo de nopal pueden presentar azúcares solubles los cuales deben ser cuantificados para no sobreestimar los resultados de azúcares totales y/o reductores. La determinación fue realizada mediante el lavado de 2 g de biomasa seca con 10 mL de agua destilada a temperatura ambiente la cual fue caracterizada mediante los métodos descritos en los apartados 4.5 y 4.7. La cantidad obtenida fue previamente sustraída de todas las determinaciones de azúcares totales y reductores.



#### 4.5 Determinación de azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico

Los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. El primer paso de la reacción es una deshidratación seguida del calentamiento y la catálisis ácida. El método espectrofotométrico fundamenta que se producen varios derivados de furano que se condensan con el fenol para dar origen a compuestos coloridos (Figura 5.2), la absorbancia de estos compuestos son leídos a una longitud de onda de 490 nm [Nielsen, 2007].

Figura 4.2: Reacción de los carbohidratos con fenol y ácido sulfúrico.



Para realizar la cuantificación de azúcares totales (AT) presentes en la muestra, es necesario elaborar una curva de calibración con glucosa, que se encuentre entre concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  vs su respectiva absorbancia (Anexo A: Tabla A1). A cada tubo de glucosa es añadido 1 mL de fenol al 5 % y 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98 %, grado reactivo ACS o analítico, homogeneizar los tubos en un Vortex y enfriarlos a temperatura ambiente por 30 min. En este procedimiento se recomienda hacerlo en la campana de extracción mientras el tiempo transcurre; en seguida medir la absorbancia de cada tubo frente a un blanco a una longitud de onda de 490 nm en el espectrofotómetro Uv-vis. (Anexo A: Gráfica A1).

Para determinar el contenido de AT en la muestra se utiliza el licor obtenido de la prueba realizada (carbohidratos solubles, digestión ácida, hidrólisis enzimática), la muestra tomada es diluida para que la absorbancia se encuentre dentro del intervalo en que se elaboró la curva de calibración. Los reactivos y tratamiento que se da a la muestra es el mismo que el que se aplicó en la elaboración de la curva [Nielsen, 2007].

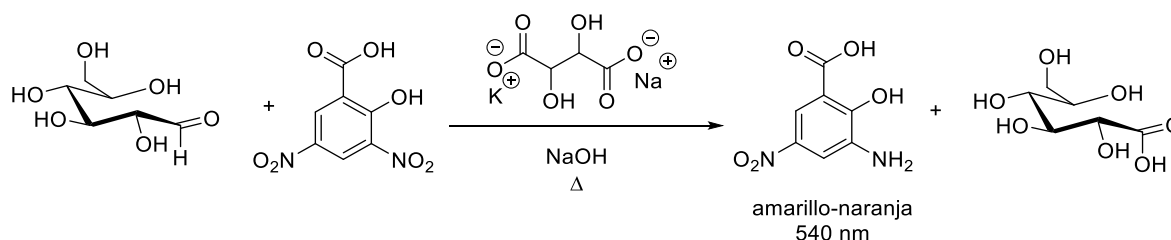
#### 4.6 Neutralización de muestra

El filtrado de la digestión ácida debe ser neutralizado para usarlo en la determinación de azúcares reductores y el perfil de carbohidratos. Dicha neutralización de la muestra se realizó con  $\text{CaCO}_3$  hasta obtener un pH de 5-7, después se centrifugó a 10000 rpm en una microcentrífuga marca LAB-NET modelo 2233-M2 HERMLE por 5 minutos y se filtró con una membrana de 0.45 micras para poder emplear las muestras en las determinaciones de azúcares reductores y HPLC.

#### 4.7 Determinación de los azúcares reductores por el método de DNS

El método que se utilizó fue el 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en el cual el grupo aldehído reacciona con el grupo 3-nitro del DNS para producir el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Figura 4.3) [Nielsen, 2007; Iturbe & Sandoval, 2013].

Figura 4.3: Reacción de Carbohidratos con DNS.



La preparación de 100 mL del reactivo de DNS se realizó disolviendo 1 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico en 50 mL, después se adicionó 20 mL de una solución de hidróxido de sodio 2 N. Una vez disuelto lo anterior se adicionó 30 g de tartrato de sodio y potasio. La mezcla se homogeneizó, a continuación la disolución se aforó a 100 mL para luego almacenarla a temperatura ambiente y en frasco ambar.

Al igual que en la determinación de AT, en los azúcares reductores (AR) se requiere elaborar una curva de calibración con glucosa en concentraciones de 100 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  vs la absorbancia (Anexo A, Tabla A2); a los tubos con muestra de glucosa se les adicionó 1 mL del reactivo de DNS, después se colocaron en un baño con agua hirviendo por 5 min. Concluido este tiempo los tubos pasaron a un baño con agua fría, a continuación se agregó 8 mL de agua destilada y homogeneizó en un Vortex; la absorbancia de cada tubo es medida a una longitud de onda de 540 nm frente a un blanco en el espectrofotómetro UV-vis. (Anexo A, Gráfica A2).

La determinación de AR en la muestra se realizó de la misma forma que los tubos de la curva de calibración, para ello se efectuó la dilución pertinente para que la absorbancia se encuentre dentro de los puntos de la curva de calibración [Iturbe & Sandoval, 2013].

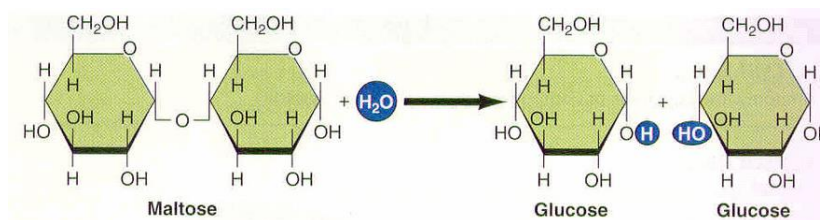
La cuantificación debe partir de una muestra con pH entre 6-7, debido a que si la muestra se encuentra ácida esta provocará la precipitación del reactivo DNS.

#### **4.8 Corrección anhidra en azúcares**

Para realizar una correcta cuantificación de los AT y AR determinados por fenol-sulfúrico y DNS respectivamente, es necesario realizar una corrección anhidra, esto se debe a que su cuantificación es a partir de la hidrólisis de polisacáridos en la cual ocurre la adición de una molécula de agua (Figura 4.4). Utilizando el factor de 0.9 convierte matemáticamente el valor obtenido de los

monómeros al valor de la estructura polimérica original ya que así se elimina el aporte de la molécula de agua [Sluiter et al., 2010].

Figura 4.4: Hidrólisis de carbohidratos.



#### 4.9 Perfil de carbohidratos en HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica ampliamente usada, ya que posee una alta sensibilidad, igualmente puede identificar, cuantificar y separar especies no volátiles o termolábiles, a diferencia de la cromatografía de gases en la cual se pueden analizar muestras no termolábiles y volátiles. Algunos ejemplos de los materiales que pueden ser analizados son: proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, plaguicidas, etc. [Gomis, 2008].

El fundamento de la técnica utiliza una presión elevada que obliga a la fase móvil (disolvente) y la muestra líquida a atravesar la columna, en la cual se encuentra la fase estacionaria (sólido con un diámetro de partículas 3, 5, 10  $\mu\text{m}$ ). La migración diferencial o la separación de los componente en una muestras dependerá de la afinidad de estos por las partes polares de la fase estacionaria y su solubilidad con la fase móvil, esto induce a que cada analito posea diferentes tiempos de salida de la columna, a lo que se le conoce como tiempo de retención y es único para cada uno de ellos. Para su posterior identificación es requerido utilizar estándares de los posibles componentes que pueda contener el material a estudiar, y la elaboración de curvas de calibración para lograr su cuantificación [Gomis, 2008; Vázquez, 2012].

La fase móvil consiste en mezclas para conseguir la elución y selectividad adecuadas de la muestra a analizar, otros puntos importantes para la cromatografía son los tiempos de la corrida, temperatura y presión. Las condiciones usadas en el estudio se encuentran en la Tabla 4.2 y 4.3.

El Cromatógrafo de Líquidos de Alta eficiencia (HPLC) marca HEWLETT-PACKARD modelo 1100 consta de suministro de disolvente, válvula de inyección automatizada, con una columna de HPLC Pinnacle™ II Amino Columns marca RESTEK, tamaño de partícula 5µm, esférica, tamaño del poro 110Å. Intervalo de pH: 2.5 a 7.5 y límite de temperatura de 80 °C, la cual esta acoplada a un detector de UV-vis y un detector Evaporativo de Dispersión de Luz marca AGILENT TECHNOLOGIES modelo 1260 ELSD; este último es necesario debido a que los carbohidratos no son visibles en el espectro de UV-vis. En el ELSD el efluente de la columna atraviesa a un nebulizador mediante un flujo de nitrógeno, después la niebla pasa a un tubo de conducción a temperatura controlada lo que provoca la evaporación de la fase móvil dejando integro el analito, a continuación este pasa a través de un haz láser. La traducción de esta señal es mediante un fotodiodo de silicio que detecta la radiación dispersa perpendicularmente al flujo. El usar un detector de dispersión de luz, elimina la necesidad de utilizar bases fuertes, convirtiéndose en un método no destructivo [Gomis, 2008].

Tabla 4.2: Condiciones usadas en el HPLC durante el estudio al inicio.

<b>Parámetro</b>	<b>Condiciones</b>
Tipo de columna	Columna amino. Marca ultra amino de 30 cm
Temperatura de columna	30 °C
Flujo	1.0 mL/min
Inyección	10µL
Temperatura del detector	80 °C
Detector	ELSD
Proporción de los disolventes	84 % H <sub>2</sub> O y 16 % ACN
Presión máxima de HPLC	200 bar
Presión del detector	3.5 bar
Tiempo de la corrida	35 min

Tabla 4.3: Condiciones usadas en el HPLC durante el estudio después del cambio de columna.

<b>Parámetro</b>	<b>Condiciones</b>
Tipo de columna	Columna amino. Marca ultra amino de 20 cm
Temperatura de columna	30 °C
Flujo	1.0 mL/min
Inyección	10µL
Temperatura del detector	80 °C
Detector	ELSD
Proporción de los disolventes	69 % H <sub>2</sub> O y 31 % ACN
Presión máxima de HPLC	200 bar
Presión del detector	3.5 bar
Tiempo de la corrida	17 min

Para obtener un perfil de carbohidratos de la muestra se utilizó, el método de calibración relativa o indirecta, en el cual se inyecta el analito acompañado de una solución de concentración conocida, denominada estándar interno (EI) [Peña et al., 2011].

La identificación de los diferentes tiempos de retención de los azúcares, se llevó a cabo mediante la inyección de los diferentes estándares; para este estudio se utilizó alanina como EI en una concentración de 3.0 mg/mL; y una mezcla de carbohidratos estándares los cuales fueron: glucosa, xilosa, celobiosa, fructosa, manosa, galactosa, maltosa y sacarosa. Para la cuantificación de los carbohidratos se elaboró una curva de calibración de cada uno de ellos a diferentes concentraciones acompañado de alanina, luego en los cromatogramas adquiridos se obtuvieron las áreas de los carbohidratos y la alanina, determinando así la relación del área del azúcar/área del EI ( $A_{\text{Carb}}/A_{\text{EI}}$ ), dato necesario para realizar la regresión lineal de cada carbohidrato. Los tiempos de retención así como las curvas de calibración se encuentran en el Anexo A: Tabla A3, Gráficas A3-A9; y para la segunda columna en Tabla A4 y Gráficas A10-A16.

En el caso de la muestra, esta se debe filtrar con una membrana de 0.22 micras y encontrar neutralizada. Se inyectó en una relación de 0.9 mL de muestra y 0.1 mL de alanina, la identificación de los carbohidratos se llevó a cabo con los tiempos de retención, y su cuantificación mediante a la relación  $A_{\text{Carb}}/A_{\text{EI}}$  y la regresión lineal.

#### **4.10 Hidrólisis Enzimática**

Durante el estudio experimental se realizó una hidrólisis enzimática en la biomasa sin pretratar, esto con el fin de no sobrevalorar el rendimiento de la hidrolisis enzimática en el material pretratado.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en viales con rosca en los que se pesó 50 mg de biomasa seca proveniente de la malla 40, consecutivamente se adiciono buffer de citratos 4.8 pH y el coctel enzimático; la añadidura de líquidos se realizó conservando una relación de 10 % de sólidos y una porción  $0.9 \text{ mL de cóctel enzimático} / \text{mg de biomasa seca}$ . La reacción se dispuso en un equipo de agitación (baño con temperatura y agitación) marca BÜCHI modelo SYNCORE P-101 o en un baño con agua (antes mencionado) a 50 °C y con agitación constante de 180 rpm durante una hora. Posteriormente la enzima se desactivó en un baño de agua en ebullición por 5-10 min y se adiciono agua destilada hasta un volumen final de 5 mL. Después se homogenizó, centrifugó y filtro con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  obteniendo el líquido. Al licor obtenido de la hidrólisis enzimática se realizaron las pruebas de:

- Azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico
- Azúcares reductores por el método de DNS
- Perfil de carbohidratos por HPLC (solo para la hidrólisis enzimática del material pretratado).

#### *4.10.1 Caracterización de los cocteles enzimáticos*

Debido a que cada complejo enzimático se encuentra inmerso en un jarabe azucarado, es necesario cuantificar los carbohidratos presentes.

El blanco de enzima se realizó con 45  $\mu\text{L}$  de la enzima y 450  $\mu\text{L}$  de buffer de citratos, posteriormente fue sometido a las mismas condiciones de una hidrolisis enzimática pero sin biomasa. A continuación se determinó AT, AR y perfil de carbohidratos en HPLC de cada cóctel enzimático (Tabla 4.4).



Tabla 4.4: Cantidad de AT, AR y el perfil de HPLC presentes en los cocteles enzimáticos E6, E7, E9 y E10.

Enzima	AR por DNS (mg/mL enzima)	AR por HPLC (mg/mL enzima)	AT por Fenol (mg/mL enzima)	AT por HPLC (mg/mL enzima)
<b>E6</b>	24.61	22.55	273.87	244.50
<b>E7</b>	63.33	47.69	244.76	220.56
<b>E9</b>	92.01	58.93	303.64	267.79
<b>E10</b>	238.97	188.28	294.14	220.72

Por motivos de confidencialidad del estudio no se mostrarán el perfil de carbohidratos para cada cóctel. El contenido de azúcares en los cocteles debe ser sustraído de la cantidad de azúcares obtenidos del licor de la hidrolisis enzimática de la biomasa.

#### **4.11 Diseño de experimentos y pretratamiento hidrotérmico/alcalino con NaOH**

En muchos experimentos interviene el estudio de los efectos de dos o más factores sobre una variable de respuesta, un modelo estadístico útil para averiguar cómo afectan estos factores a dicha variable es el diseño de experimentos, este método puede incluir cuantos factores sean necesarios. En este estudio el diseño que se utilizó fue un diseño factorial completo  $2^k$ , este es ampliamente usado cuando es necesario evaluar el efecto conjunto de los factores de respuesta y además proporciona el menor número de corridas [Montgomery, 2014]. En el diseño  $2^k$ , cada factor se estudia a sólo dos niveles y sus experimentos contemplan todas las combinaciones de cada nivel de un factor con todos los niveles de los otros factores [Ferré, 2004]. Este método se usó con el fin de seleccionar las condiciones adecuadas del pretratamiento alcalino que deben ser empleadas en la biomasa y así obtener la mayor biodisponibilidad en el material para una posterior hidrolisis enzimática.

El diseño de experimentos del estudio consta de tres factores cada uno con dos niveles ( $2^3 = 8$  experimentos), conjuntamente se adicionaron tres puntos centrales para evaluar el error experimental, teniendo un total de once experimentos. Los factores o variables independientes son:

- X1: Tiempo del pretratamiento (min)
- X2: Temperatura ( $^{\circ}$  C)
- X3: Concentración de NaOH (% p/v)

Las variables de respuesta (variables dependientes) se dividen en dos etapas, una de ellas es la determinación de lignina y de azúcares totales presentes en el licor obtenido después de pretratar el material. Y la otra, es la cuantificación de azúcares totales, azúcares reductores y el perfil de carbohidratos obtenidos en el jarabe de la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada.

Un pretratamiento idóneo para aplicar a este tipo de residuos agroindustriales y/o con un contenido de lignina entre el 10-18 % p/p a es un pretratamiento alcalino [Sánchez & Cardona, 2008] que consiste en una solución de hidróxido de sodio diluida en cual la biomasa es inmersa de 85 a 150  $^{\circ}$ C durante 3 a 13 horas, el medio alcalino ocasiona una hinchazón en el material, incrementando la superficie interna de la celulosa y disminuyendo su grado de polimerización y cristalinidad asimismo causa una separación de los vínculos estructurales de la lignina [Vázquez 2012], además se ha observado que la lignina es más soluble en álcalis fuertes [Sánchez & Cardona, 2008]. Otro pretratamiento es el de agua caliente líquida (LHW por su nombre en inglés Liquid Hot Water), el cual comprende en someter a la biomasa a la acción de agua caliente en un reactor presurizado a temperaturas de 160 a 220  $^{\circ}$ C durante un tiempo de 1 a 46 min, esta técnica tiene como objetivo la solubilización de la hemicelulosa, por su parte la lignina es parcialmente despolimerizada y solubilizada, el método no genera inhibidores para la posterior sacarificación y fermentación igualmente es adecuado para aplicarlo en residuos agrícolas y con un porcentaje bajo de lignina

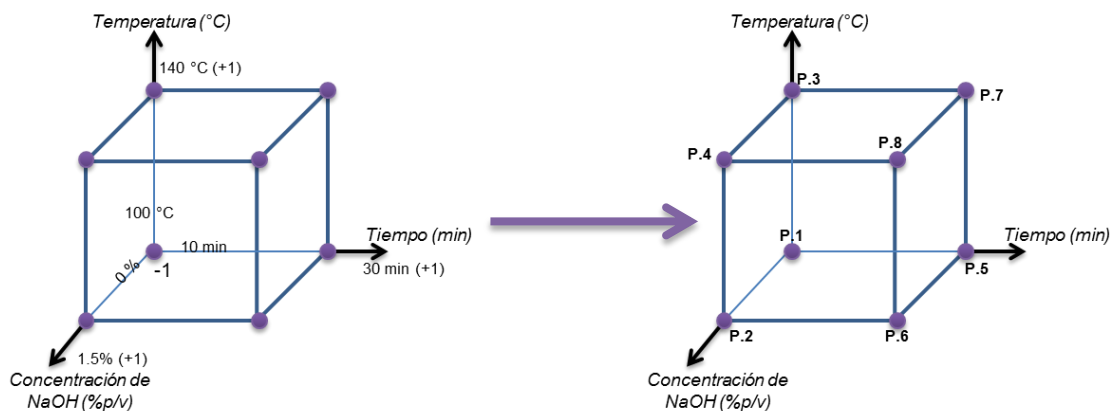
[Sánchez & Cardona, 2008; Alvira et al., 2009]. Las dos técnicas fueron combinadas y modificadas para obtener los beneficios de ambas, como son los tiempos cortos y una solubilización mayor de lignina; y de esta forma fijara las variables independientes del diseño (Tabla 4.5).

Tabla 4.5: Variables independientes del diseño factorial completo utilizadas en el pretratamiento hidrotérmico/alcalino para la corona de la piña y el residuo del nopal.

Variable independiente		Niveles		
		-1	0	+1
<b>X1</b>	Tiempo [min]	10	20	30
<b>X2</b>	Temperatura [°C]	100	120	140
<b>X3</b>	Concentración de NaOH [% p/V]	0	0.75	1.5

El dominio experimental está definido por las variables independientes, las cuales son codificadas con -1, 0 y +1 para representar los niveles alto y bajo de los factores, además muestra el comportamiento de las variables de respuesta dentro de estos límites designado como dominio experimental, este es representado por un cubo debido a que es un diseño  $2^3$  y consiste en 8 experimentos que son representados por cada vértice (Figura 4.5). Los resultados obtenidos en el diseño son válidos dentro del cubo.

Figura 4.5: Dominio experimental del diseño factorial completo  $2^3$  y distribución de las diferentes pruebas dentro de este.



Uno de los puntos clave del diseño de experimentos es la aleatorización de los ensayos para evitar así el sesgo de cualquier variable de respuesta. Las pruebas durante el estudio fueron realizadas siguiendo el orden de la Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Aleatorización de las pruebas del diseño factorial completo y tres puntos centrales para el pretratamiento alcalino de los residuos agroindustriales.

Prueba	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Concentración de NaOH (%p/v)
6	30	100	1.5
8	30	140	1.5
1	10	100	0
11 (C)	20	120	0.75
10 (C)	20	120	0.75
4	10	140	0
9 (C)	20	120	0.75
7	30	140	0
2	10	100	1.5
3	10	140	0
5	30	100	0

#### *4.11.1 Pretratamiento hidrotérmico/alcalino.*

Como se ha mencionado, el pretratamiento tiene como objetivo la deslignificación del residuo biomásico, ocasionando así el aumento de biodisponibilidad de la celulosa para la hidrólisis enzimática.

El pretratamiento aplicado a la corona de piña y al residuo del nopal se llevó a cabo en un reactor vertical marca PARR de acero inoxidable que cuenta con una chaqueta de calentamiento a base de resistencias, además posee un sistema de enfriamiento regulado por agua mediante un recirculador marca FISHER SCIENTIFIC modelo ISOTEM 3006, está provisto con una propela de agitación acoplado a un motor, igualmente está equipado con un manómetro, sensor digital de presión y un termopar tanto dentro del sistema como en la chaqueta de calentamiento que está conectado a un controlado de procesos marca PARR modelo 4810.

Para realizar el pretratamiento se pesó en un vaso de teflón la biomasa a trabajar, para la corona de la piña fue 1 g de biomasa seca (5 % de sólidos) y para el residuo del nopal fueron 2 g de biomasa seca (10 % de sólidos), la diferencia en el porcentaje de sólidos se debe a que la corona de la piña absorbe la mayor parte de la disolución en la que se encontraba inmersa e impedía una agitación adecuada. Posteriormente se adiciono 20 mL de agua destilada con la cantidad de NaOH a trabajar (0, 0.75 ó 1.5 % p/V). A continuación se transfirió el vaso de teflón dentro de un vaso de acero inoxidable y después en la chaqueta de calentamiento del reactor Parr, en seguida se prosiguió a cerrar el sistema y se verificó que ninguna válvula se encontrará abierta para evitar fugas. Durante el pretratamiento se dio un aumento de presión en el sistema y se consideró como autógena de este.

Mediante el software “SPEC VIEW” se controló el sistema de agitación y las rampas de calentamiento elaboradas a partir de la temperatura a trabajar (100, 120 ó 140 °C). Al iniciar el aumento de temperatura, éste no ocurrió

inmediatamente, por lo que el tiempo de reacción (10, 20 o 30 min) se contó a partir de que el sistema llegara a la temperatura fijada, esta se mantuvo constante durante el tiempo del pretratamiento. Una vez concluido el tiempo de reacción, comienza el enfriamiento hasta la temperatura ambiente. Durante todo el tiempo de pretratamiento la agitación fue constante y se fijó para el experimento de 200 rpm.

Una vez concluido el pretratamiento, la biomasa se filtró obteniendo un licor del cual se determinó la cantidad de lignina soluble por el método descrito en la digestión ácida y los AT por el método de fenol-sulfúrico.

La biomasa pretratada se lavó con buffer de citratos 50 mM a 4.8 pH y se filtró hasta eliminar el líquido remanente. Posteriormente se realizó una hidrólisis enzimática como el descrito anteriormente a 10 % de sólidos. Al jarabe obtenido después de la sacarificación se cuantificó el contenido de AT, AR y se elaboró el perfil de carbohidratos.

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Todas las pruebas realizadas durante el estudio fueron ejecutadas por triplicado reportando la desviación estándar y asegurándose que el coeficiente de variación sea menor al 10 %.

### 5.1 Obtención del material

El material a trabajar fue la corona de la piña y el residuo del nopal, ambos se obtuvieron recién generados y se determinó el porcentaje de humedad que contenían. Para poder ser tratados experimentalmente fue necesario someterlos a métodos de secado descritos anteriormente, obteniendo una humedad final (Tabla 5.1).

Tabla 5.1: Porcentaje de humedad contenido en el material lignocelulósico fresco y seco.

Material lignocelulósico	% humedad del material fresco	DS	% humedad del material seco	DS
Corona de la piña	84.71	2.49	10.66	0.38
Residuo del nopal	93.07	0.99	1.89	0.02

El material obtenido se trituró y separó en diferentes tamaños de partícula (Figura 5.1).

Figura 5.1: Corona de piña y nopal secos con humedad menos al 10%. En esta presentación fueron usados para los trabajos de esta tesis.



Durante todo el estudio, la humedad del material seco fue determinada antes de cada prueba, la corona de piña no mostro mayores variaciones, sin embargo en el residuo del nopal modifiko su contenido de humedad hasta un 4 % al final del estudio a pesar de que se almacenaba en un recipiente cerrado y no se abría a menos que se tomara muestra, por lo que se consideró material potencialmente higroscópico.



## 5.2 Caracterización del material lignocelulósico

### 5.2.1 Azúcares solubles

Se realizó un lavado de material y el líquido filtrado fue caracterizado cuantificando los azúcares totales y reductores solubles en el material. Estos resultados fueron sustraídos de las determinaciones posteriores (Tabla 5.2).

Tabla 5.2: Contenido de azúcares solubles presentes en el agua de lavado del material lignocelulósico.

Material lignocelulósico	Azúcares totales (% p/p)	DS	Azúcares reductores (% p/p)	DS
Corona de piña	1.53	0.04	1.28	0.01
Residuo del nopal	0.19	0.02	0.17	0.01

### 5.2.2 Determinación de lignina insoluble en ácido

El material insoluble se forma a través de la condensación de la lignina original por las condiciones ácidas en el que se encuentra la biomasa [Guzmán, 2013]. La cantidad de LIA presente en el material lignocelulósico se determinó a partir del sólido remanente después de la digestión ácida menos la cantidad de cenizas presentes en el material (Tabla 5.3 y 5.4).

Tabla 5.3: Concentración de cenizas obtenidas del sólido remanente de la digestión ácida del material lignocelulósico.

Material lignocelulósico	Cenizas (% p/p)	DS
Corona de piña	0.90	0.07
Residuo del nopal	0.47	0.03

Tabla 5.4: Concentración de lignina insoluble en ácido obtenido del sólido remanente de la digestión ácida del material lignocelulósico.

<b>Material</b>	<b>LIA</b>	<b>DS</b>
<b>lignocelulósico</b>	<b>(% p/p)</b>	
<b>Corona de piña</b>	16.64	1.03
<b>Residuo del nopal</b>	7.39	0.90

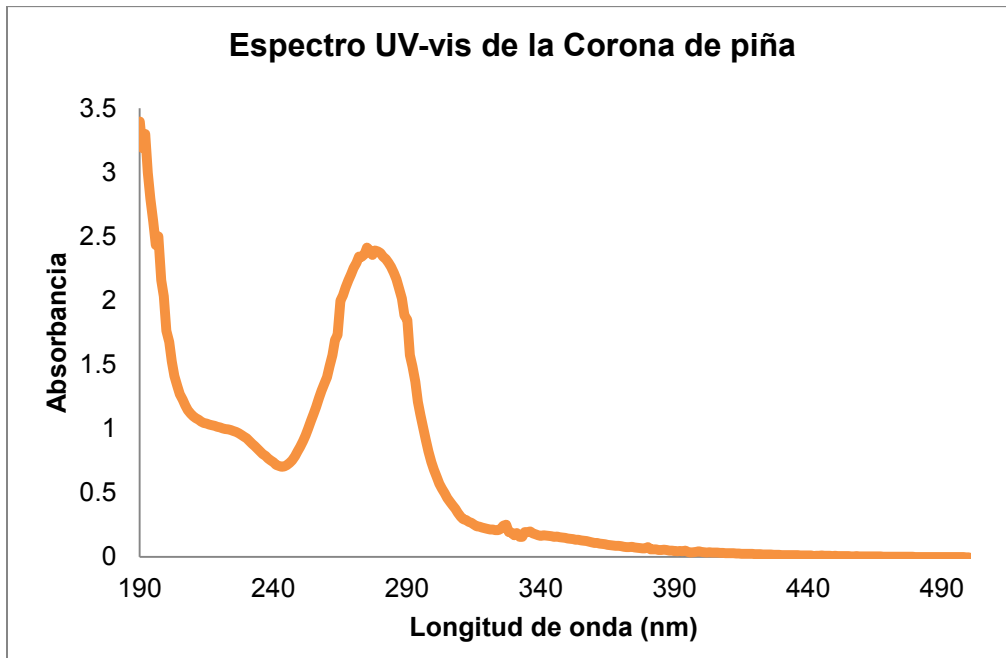
### 5.2.3 Determinación de lignina soluble en ácido

La LSA se determinó a partir del licor obtenido de la digestión ácida, este se analizó durante las primeras seis horas después de la hidrólisis, realizando un barrido de 190-500 nm en el espectrofotómetro UV-vis.

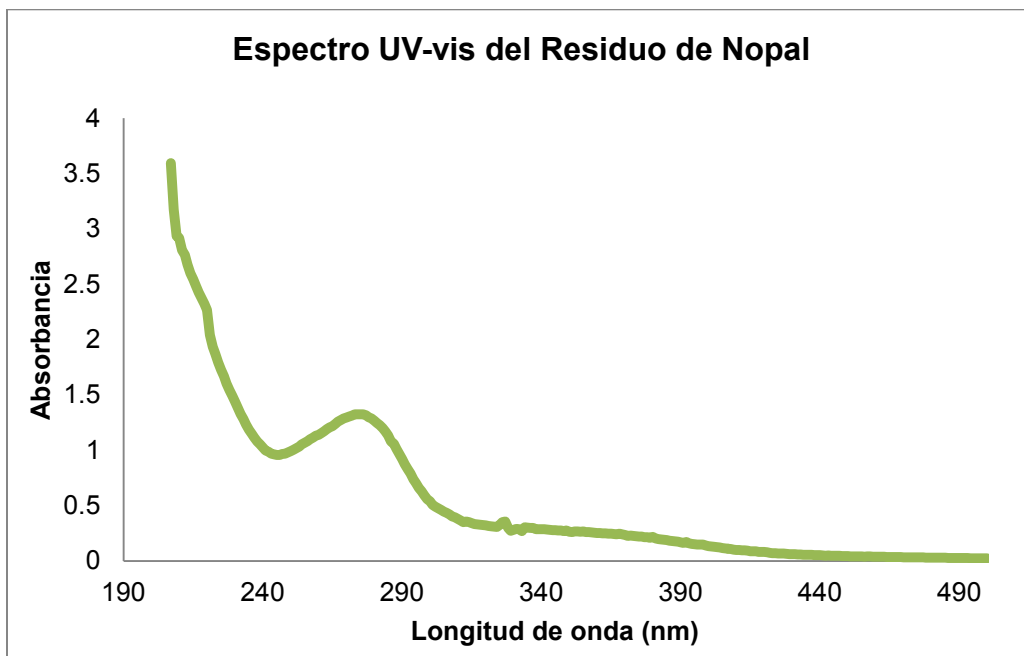
En el espectro UV-vis obtenido en la corona de piña (Gráfica 5.1) se puede observar señales en los siguientes intervalos: 215 a 217 nm y de 270 a 290 nm correspondientes de compuestos como el furfural y/o el hidroximetilfurfural las cuales son similares a las que presenta el bagazo de caña (Gráfica 4.1), por lo que la constante de absortividad seleccionada es de 25 L/g\*cm (Tabla 4.1).

Por otro lado la forma que presenta el espectro UV-vis del nopal (Gráfica 5.2) no tiene similitud con respecto a las biomásas ya estudiadas (Gráfica 4.1), pero el nopal es una hoja proveniente de una cactácea y es un residuo herbáceo como el rastrojo de maíz por lo que la constante de absortividad usada es 30 L/g\*cm (Tabla 4.1).

Gráfica 5.1: Espectro UV-vis de la corona de piña para la determinación de LSA.



Gráfica 5.2: Espectro UV-vis del residuo de nopal para la determinación de LSA.



Para obtener la LSA es preciso utilizar la siguiente ecuación

$$\% LSA = \frac{UVabs * Volumen\ del\ filtrado * dilución}{\epsilon * peso\ de\ la\ biomasa\ sin\ humedad * ancho\ de\ la\ celda} * 100$$

Dónde:

$\epsilon$ : absorptividad de la biomasa a la longitud de onda específica (L/g\*cm)

Usando los coeficientes seleccionados se obtuvo la LSA (Tabla 5.5).

Tabla 5.5: Concentración de lignina soluble en ácido obtenido en el licor de la digestión ácida del material lignocelulósico.

<b>Material lignocelulósico</b>	<b>LSA (% p/p)</b>	<b>DS</b>
<b>Corona de piña</b>	7.68	0.19
<b>Residuo del nopal</b>	4.19	0.13

#### 5.2.4 Determinación de lignina total

La lignina es un polímero presente en las paredes de las células vegetales, debido al proceso de la hidrólisis realizado en la digestión ácida, para determinar la LT en el material se sumó el porcentaje de la LIA y la LSA (Tabla 5.6).

La corona de piña presento un contenido de lignina de 24.35 % p/p el cual no es muy diferente al reportado en la bibliografía que es del 27,72 % p/p [Quesada et al., 2005], por otro lado el residuo del nopal presento un contenido de lignina menor que el de la corona con un 11.58% p/p pero es mayor al reportado en bibliografía que es del 3.60 % p/p [Stintzing & Carle, 2005], a pesar de ello el valor obtenido de forma experimental fue usado como parámetro definitivo en el estudio (Tabla 5.6).

Tabla 5.6: Concentración de lignina total del material lignocelulósico.

<b>Material lignocelulósico</b>	<b>LT (% p/p)</b>
<b>Corona de la piña</b>	24.32
<b>Residuo del nopal</b>	11.58

### 5.2.5 Determinación de azúcares totales y reductores

A partir del jarabe obtenido de la digestión ácida se determinaron los azúcares totales y reductores.

El contenido de AT en la corona de la piña es de 48.03 % p/p y de AR es de 38.85 % (Tabla 5.7). El residuo de nopal presentó una mayor cantidad de AR que AT, con una diferencia de 1.5 %, una hipótesis a este resultado se debe a la diferencia de exactitud entre las técnicas para determinar azúcares. Debido a que esta diferencia no es significativa, para fines de este estudio se determina que todos los azúcares totales presentes son equivalentes azúcares reductores (Tabla 5.7).

Tabla 5.7: Contenido de AT y AR presentes en el licor de la digestión ácida de la biomasa. Los resultados se muestran con corrección anhidra y la sustracción de los azúcares solubles.

<b>Material lignocelulósico</b>	<b>Azúcares totales (% p/p)</b>	<b>DS</b>	<b>Azúcares reductores (% p/p)</b>	<b>DS</b>
<b>Corona de la piña</b>	48.03	2.04	38.85	2.44
<b>Residuo del nopal</b>	30.24	0.45	32.04	0.68

### 5.2.6 Perfil de carbohidratos

El tipo y contenido de azúcares presentes en la hidrólisis ácida de cada muestra se determinaron por un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplado un detector de dispersión de luz (ELSD). En la corona de la piña se identificó la presencia de xilosa y de glucosa, asimismo para el residuo del nopal incluye la presencia de xilosa, fructosa y glucosa. Se puede observar que el

contenido de glucosa es mayor en la digestión ácida de la corona de piña con 46.29 % p/p en comparación con el 17.53 % p/p del residuo del nopal (Tabla 5.8). El perfil de carbohidratos de ambos materiales presenta azúcares potencialmente fermentables, igualmente no presentó ningún disacárido confirmando una hidrólisis completa del material por la digestión ácida.

Tabla 5.8: Perfil de carbohidratos obtenidos del licor de la digestión ácida del material lignocelulósico.

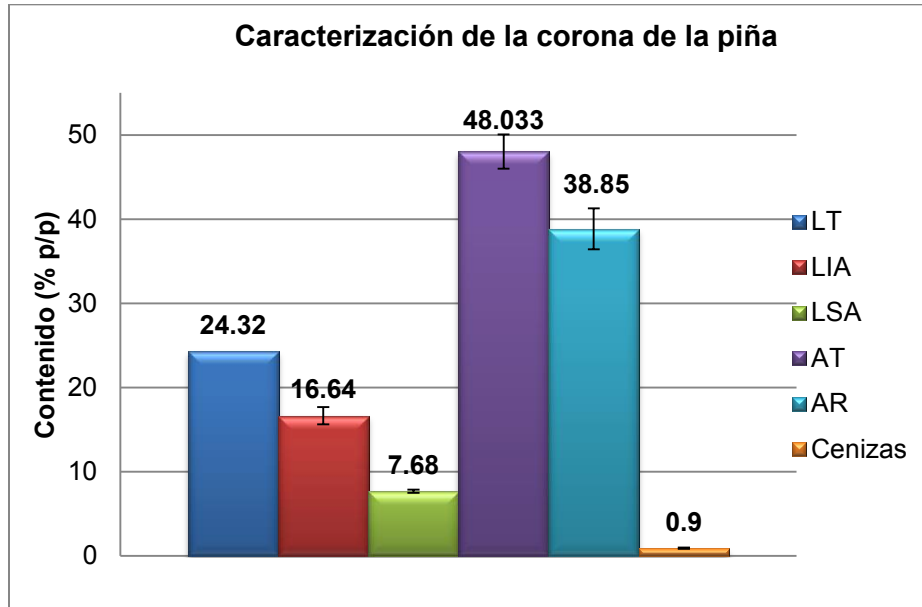
<b>Material lignocelulósico</b>	<b>Xilosa (% p/p)</b>	<b>DS</b>	<b>Fructosa (% p/p)</b>	<b>DS</b>	<b>Glucosa (% p/p)</b>	<b>DS</b>
<b>Corona de la piña</b>	7.66	0.03	No presenta		46.29	0.03
<b>Residuo del nopal</b>	2.23	0.05	3.14	0.07	17.53	0.16

En el caso del cromatograma del residuo del nopal presentó señales en el detector de UV-vis lo cual significa que existen compuestos que no son carbohidratos.

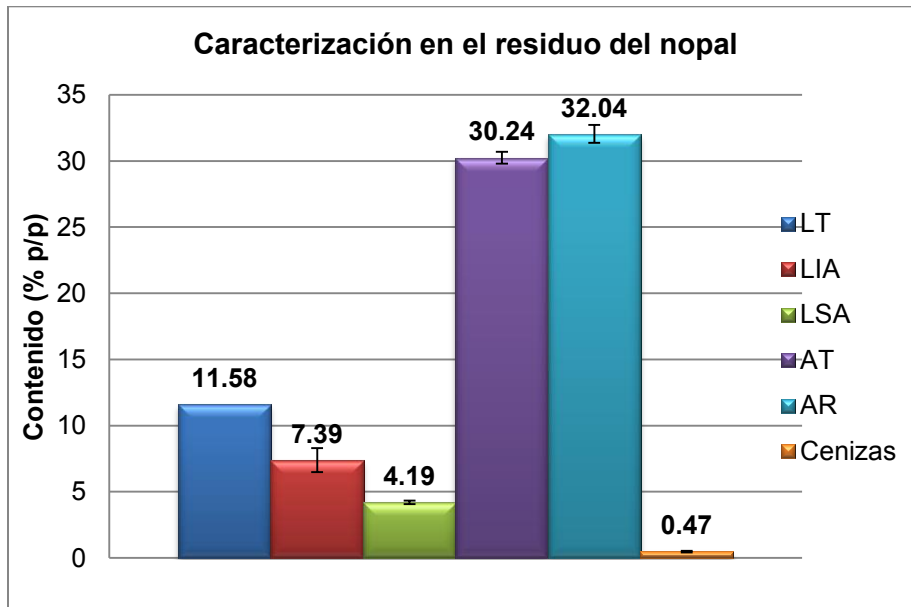
#### *5.2.7 Resumen de la caracterización de la corona de la piña y el residuo del nopal*

Los resultados obtenidos en la digestión ácida sirven como parámetro del máximo contenido de lignina, azúcares totales, reductores y cenizas, generando así un perfil del material lignocelulósico (Gráficas 5.3 y 5.4).

Gráfica 5.3: Caracterización de la corona de la piña. Contenido de lignina, azúcares totales, reductores y cenizas.



Gráfica 5.4: Caracterización del residuo del nopal. Contenido de lignina, azúcares totales, reductores y cenizas.



### **5.3 Sacarificación del material lignocelulósico sin pretratamiento**

Una vez caracterizado el material lignocelulósico para obtener las cantidades máximas de los componentes como los azúcares y lignina [Sluiter et al., 2011], se prosiguió a realizar una hidrólisis enzimática la cual se llevó a cabo como se indica en el apartado 4.10; se utilizaron cuatro cocteles comerciales con los cuales cuenta el equipo de trabajo y que están decodificados como E6, E7, E9 y E10. Subsiguientemente a la hidrólisis se determinó el contenido de azúcares totales y reductores presentes en el jarabe de la sacarificación. La prueba se llevó a cabo con el propósito de obtener la eficiencia de la sacarificación en la biomasa sin pretratar y así mostrar la validez de aplicar un pretratamiento sobre esta. La eficiencia de sacarificación, se obtuvo considerando que la cantidad de AT y AR obtenidos en la caracterización como el 100 % en ambos materiales.

En la corona de piña presentó la mayor generación de azúcares a partir de la hidrólisis con el cóctel E9 donde se lograron 37.94 % p/p de AT y 21.97 % p/p de AR con una eficiencia de 77.99 % y 56.60 % respectivamente, mientras que la hidrólisis enzimática realizada con el cóctel E10 se obtuvieron menores resultados de AT con 19.4 % p/p y 12.27 % p/p de AR del grupo de los cuatros enzimas. En los cocteles E7 y E6 se presentaron resultados semejantes entre sí (Tabla 5.9 y Gráfica 5.5).

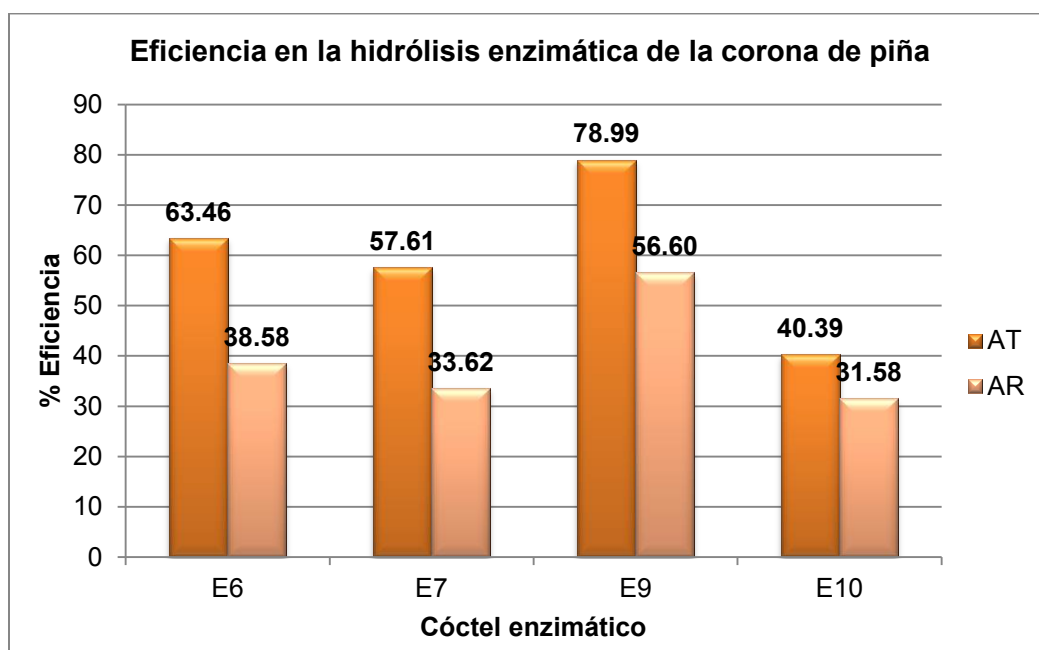
En el residuo del nopal se obtuvieron la mayor cantidad de AT utilizando el cóctel E9 con el 33.71 % p/p con una eficiencia del 111.47 % y 18.93 % p/p de AR con una eficiencia del 59.08 %, sin embargo en la producción de AR no es muy diferente a los resultados obtenidos con E6 y E7 ya que se cuantificaron 16.70 % p/p con E6 y 17.31 % p/p con E7 con una eficiencia del 52.12 % al 54.03 % (Tabla 5.9 y Gráfica 5.6).



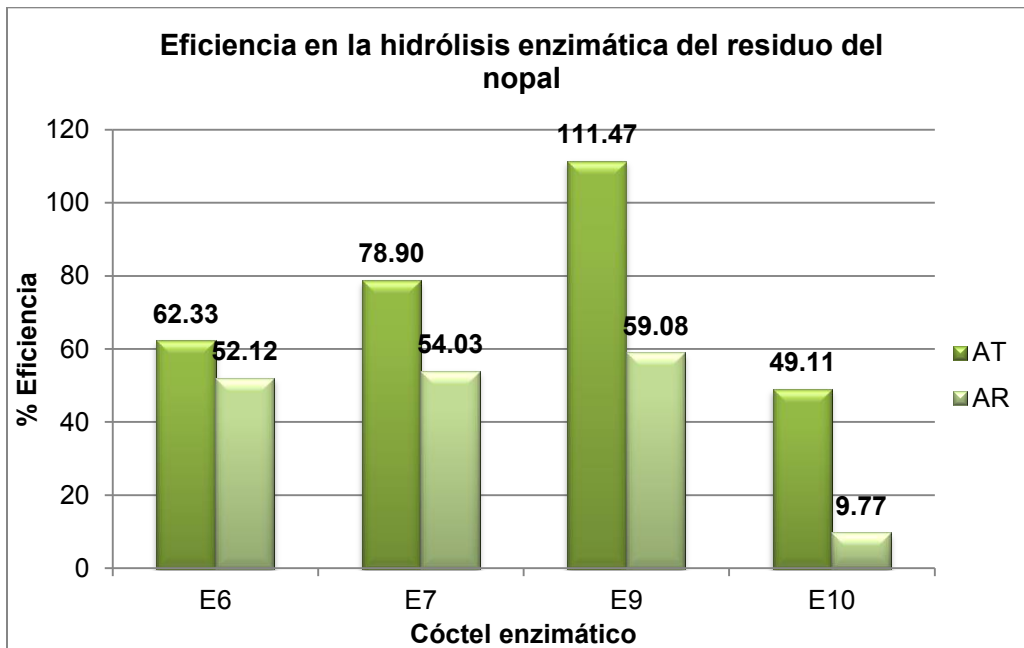
Tabla 5.9: Contenido de AR y AT presentes en el jarabe de la hidrólisis enzimática de la corona de piña y el residuo del nopal sin pretratar.

Corona de piña								
	E6	DS	E7	DS	E9	DS	E10	DS
<b>Azúcares totales</b> (% p/p)	30.48	2.12	27.67	1.47	37.94	1.64	19.40	1.68
<b>Azúcares reductores</b> (% p/p)	14.99	0.14	13.06	0.88	21.99	1.48	12.27	0.65
Residuo del nopal								
	E6	DS	E7	DS	E9	DS	E10	DS
<b>Azúcares totales</b> (% p/p)	18.85	0.25	23.86	0.01	33.71	0.75	18.93	0.01
<b>Azúcares reductores</b> (% p/p)	16.70	0.49	17.31	0.01	18.93	0.01	3.13	0.15

Gráfica 5.5: Eficiencia de la hidrólisis enzimática en la corona de la piña sin pretratar.



Gráfica 5.6: Eficiencia de la hidrólisis enzimática en el residuo del nopal sin pretratar.

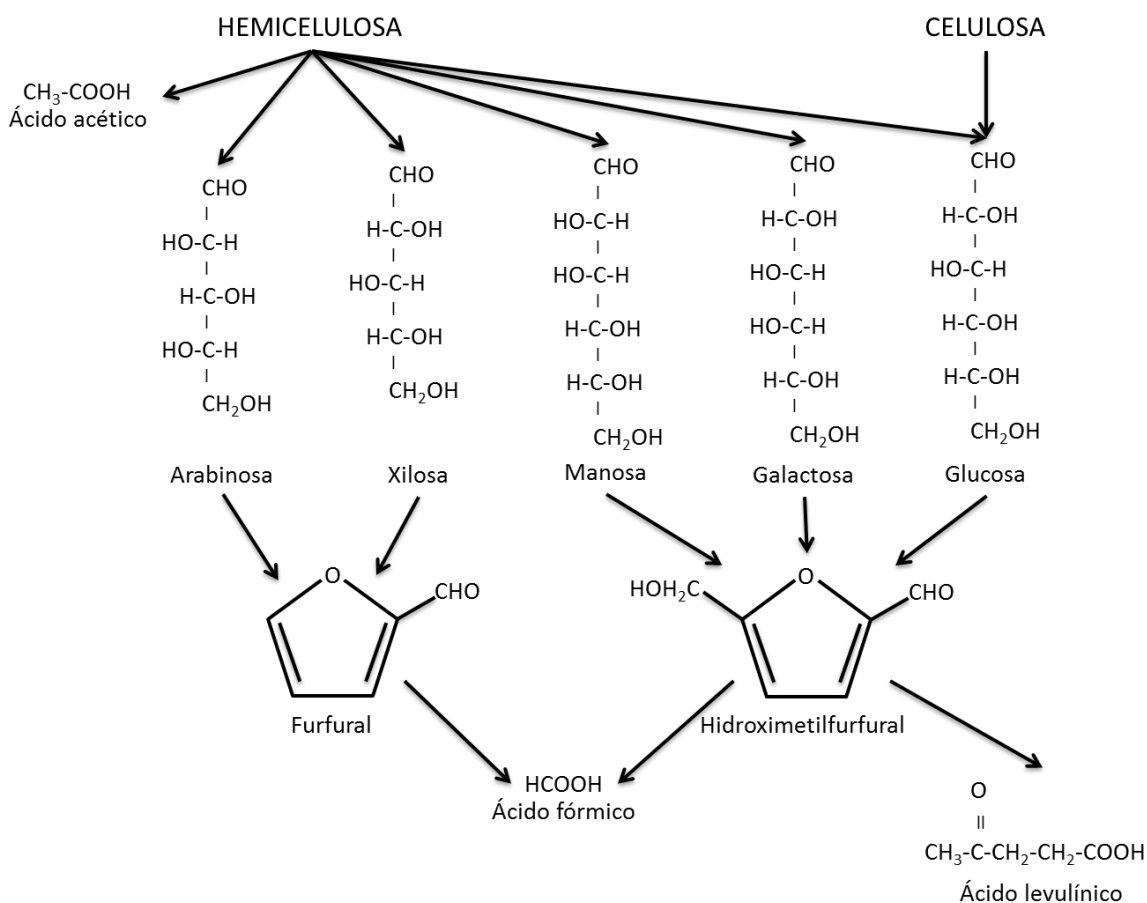


Al comenzar el tratamiento para la hidrólisis enzimática se observó que el residuo del nopal presentaba viscosidad en el medio acuoso, esto se debió a la rehidratación del mucilago, al terminar el proceso de hidrólisis el jarabe obtenido aun presentaba esta propiedad por lo que se puede afirmar que la sacarificación enzimática no fue suficiente para hidrolizar la estructura polimérica del mucilago que es una fuente importante de carbohidratos [Olivares et al., 2012].

Una eficiencia mayor al 100 % se debe a que en la digestión ácida no sólo se obtienen los azúcares provenientes de la hidrólisis y solubilización de la celulosa y hemicelulosa, sino también debido a las altas temperaturas y condiciones ácidas, se originan compuestos de degradación a partir de los carbohidratos ya hidrolizados, como los compuestos derivados de furano: el furfural, formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa), que pueden actuar como inhibidores de la fermentación. A su vez, estos dos compuestos se pueden oxidar a otros

productos como ácido fórmico, ácido levulínico y ácido acético procedente de la hidrólisis de los restos acetilos de la hemicelulosa (Figura 5.2). La naturaleza y concentración de estos compuestos depende del tipo de materia prima (maderas duras, blandas o herbáceas) [Olivia, 2003].

Figura 5.2: Productos de la oxidación de la hemicelulosa y celulosa provenientes de la digestión ácida.



A pesar de lo anterior la eficiencia obtenida en la sacarificación es eficaz en ambos materiales mostrando su alta biodisponibilidad para un ataque enzimático.

## 5.4 Diseño de experimentos en el residuo lignocelulósico

### 5.4.1 Pretratamiento hidrotérmico/alcalino

El pretratamiento hidrotérmico/alcalino fue aplicado a ambos materiales utilizando un reactor Parr de 100 mL, el incremento de temperatura se realizó mediante rampas de calentamiento, una vez llegada a la temperatura de trabajo se respetó una variación no mayor a  $\pm 10$  °C para aprobar el pretratamiento. Durante este proceso existió un aumento en la presión en el sistema correspondiente a cada temperatura, la cual a pesar de que no ser una variable a evaluar en el diseño de experimentos, si afecta directamente a la biomasa (Tabla 5.10)

Tabla 5.10: Presión absoluta del sistema a las temperaturas de trabajo del pretratamiento en ambos materiales.

	Presión absoluta del sistema (atm)		
	100 °C	120 °C	140 °C
<b>Corona de piña</b>	1.27 – 1.41	1.89 – 2.11	3.55 – 3.85
<b>Residuo del nopal</b>	1.14 -1.21	1.94 – 2.13	3.51 – 3.84

Después del pretratamiento se obtuvo el licor el cual fue caracterizado determinando el contenido de lignina soluble y los azúcares totales.

En la corona de piña la lignina soluble se presentó en mayor cantidad en las pruebas donde se incluía hidróxido de sodio en el pretratamiento (pruebas 2, 4, 6, 8, 9, 10 y 11) con un 9.93-12.54 % p/p de LS y una eficiencia máxima de deslignificación presente en el pretratamiento 8 de 51.56 % con respecto al contenido de LT de 24.32 % p/p (Tabla 6.12). En el residuo del nopal la cantidad de lignina soluble va desde 0.9 % p/p en el prueba 1 a 4.59 % p/p del 4 no obstante no se nota una diferencia tan notable como en el material anterior con respecto a la adición de NaOH, el proceso mostró una eficiencia del deslignificación máxima del 39.64 % con respecto al contenido de LT (Tabla 5.11).

Los AT obtenidos en el líquido filtrado de la corona de piña van del 5.3 % al 7.78 % p/p, mientras que en el residuo del nopal se obtuvo un máximo del 13.55 % p/p (Tabla 5.11).

Tabla 5.11: Dominio experimental decodificado del pretratamiento hidrotérmico/alcalino, contenido de lignina soluble y azúcares totales de ambos materiales posterior al pretratamiento.

Prueba	Dominio experimental			Corona de la piña		Residuo del nopal	
	X1	X2	X3	LS (% p/p)	AT (% p/p)	LS (% p/p)	AT (% p/p)
<b>1</b>	-1	-1	-1	1.37	7.78	0.90	1.63
<b>2</b>	-1	-1	1	10.89	6.88	3.11	9.85
<b>3</b>	-1	1	-1	2.50	5.30	3.14	3.93
<b>4</b>	-1	1	1	11.37	5.64	4.59	13.55
<b>5</b>	1	-1	-1	1.60	5.32	1.47	2.48
<b>6</b>	1	-1	1	11.64	7.30	1.95	4.44
<b>7</b>	1	1	-1	2.92	5.96	1.45	5.82
<b>8</b>	1	1	1	12.54	5.74	3.76	7.70
<b>9 (C)</b>	0	0	0	10.27	6.55	3.72	7.52
<b>10 (C)</b>	0	0	0	9.93	5.91	3.35	7.84
<b>11 (C)</b>	0	0	0	10.07	6.33	3.65	7.82
X1= Tiempo (min), X2 = Temperatura (° C), X3 = NaOH (% p/V)							

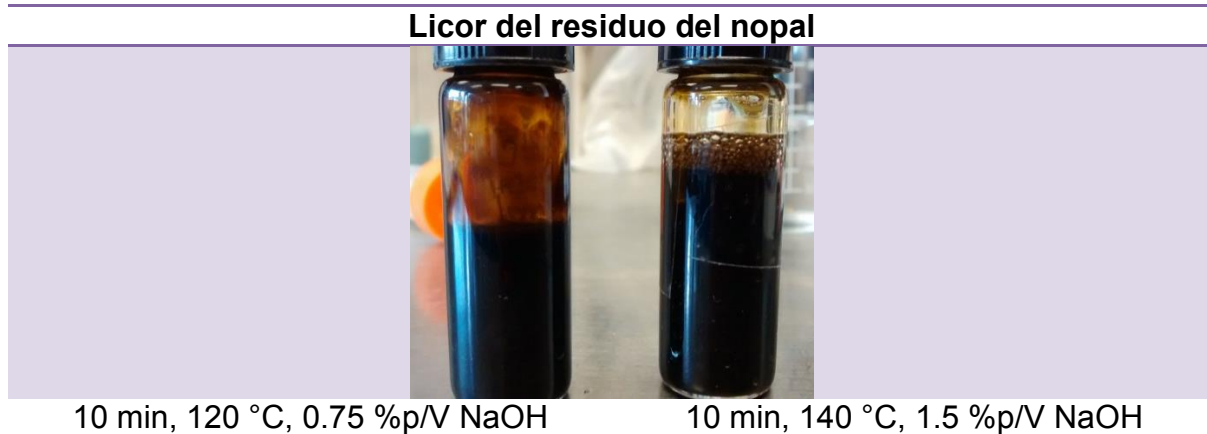
En la figura 5.3 se muestra las características físicas del líquido filtrado del pretratamiento en ambos materiales

Figura 5.3: Licor obtenido después del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en las pruebas en el residuo agroindustrial. (Corona de la piña de izquierda a derecha prueba: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9(C), 10(C) y 11(C). Residuo del nopal de izquierda a derecha prueba: 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9(C), 10(C) y 11(C)).



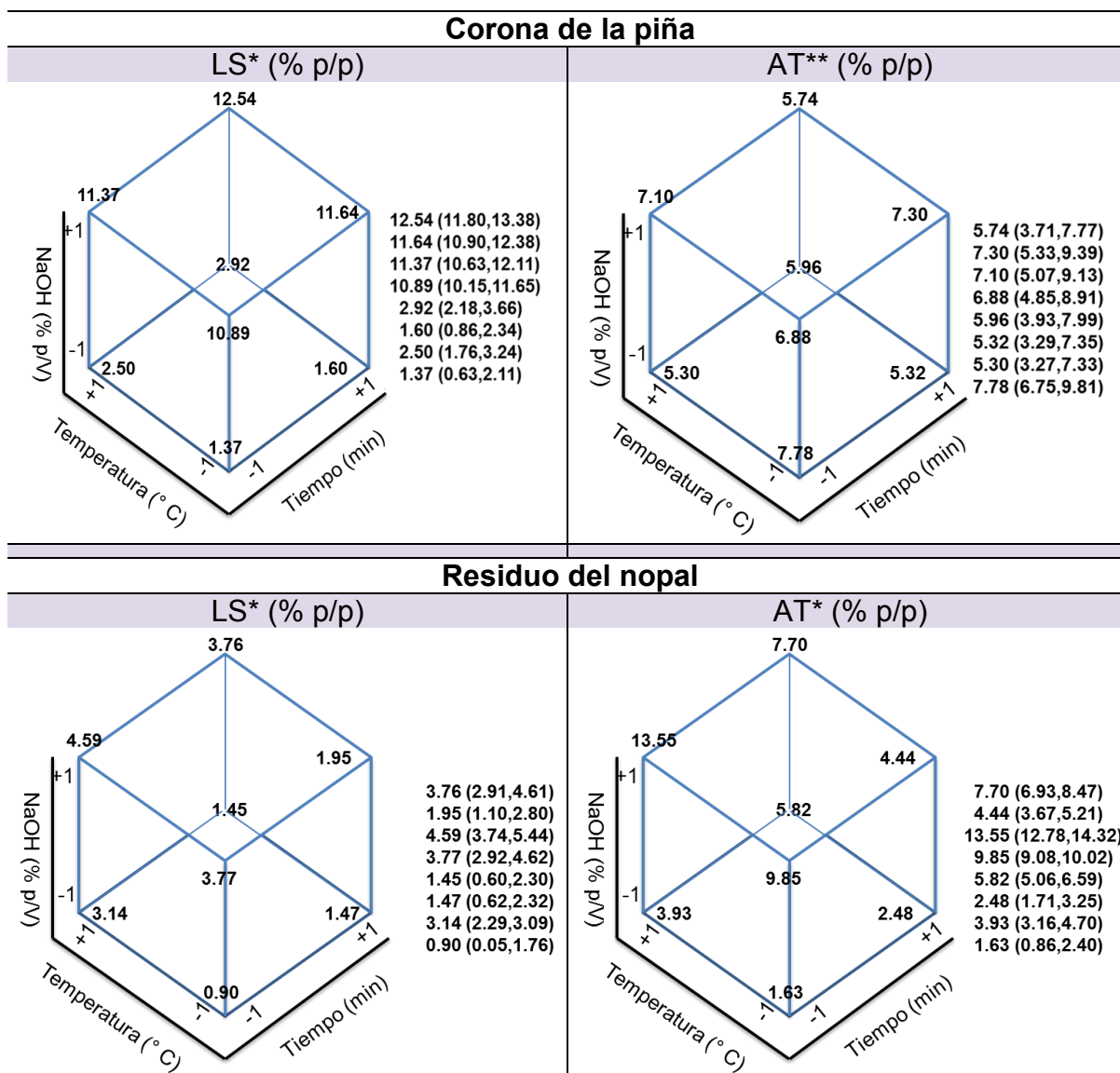
El líquido recuperado de cada pretratamiento posee diferencias entre sí en color y fluidez, en el caso de la corona de la piña el licor obtenido posee diferentes tonalidades de café donde los viales con una tonalidad más intensa presentaron una cantidad mayor de lignina soluble (Figura 5.3). Por otra parte en el residuo del nopal los jarabes donde en el pretratamiento se utilizó 0 % y 0.75 %p/V de hidróxido de sodio se observó la presencia de mucilago, como se puede observar en la figura 5.3 donde se compara el licor obtenido en la prueba 11(C) (izquierda) en la cual se puede observar el mucilago y la prueba 4 (derecha) donde no se observa, por lo que hidróxido de sodio puede hidrolizar la estructura polimérica del mucilago de nopal en concentraciones de 1.5 % p/V.

Figura 5.4: Presencia de Licores obtenidos después del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo agroindustrial.



El análisis del diseño de experimentos permite determinar las condiciones adecuadas para llevar a cabo el pretratamiento hidrotérmico/alcalino y lograr la deslignificación de la biomasa, en consecuencia un aumento en la biodisponibilidad de la celulosa para realizar una hidrólisis enzimática eficiente, además de que indica qué factores poseen un impacto significativo ya fuere este negativo y/o positivo. Como se explicó en la sección de metodología se optó trabajar con un diseño de experimental factorial completo de dos niveles, tres parámetros y tres puntos centrales para evaluar el error experimental. Este método es un diseño cúbico con triple interacción y los resultados pueden ser representados geoméricamente en un cubo (Figura 5.5).

Figura 5.5: Representación geométrica de las variables LS y AT, el modelo incluye los efectos de entre 2 y 3 variables. Los intervalos de confianza con el 95%\* y el 90%\*\* se muestran entre paréntesis.



Para comprobar la idoneidad del modelo matemático se realizaron gráficos de probabilidad normal contra residuales, valores predichos contra valores observados y valores predichos contra residuales (Anexo B, Gráficas B1-B6). Las gráficas de probabilidad normal contra residuales muestra una tendencia en línea recta y la mayoría de los puntos se ubican en el centro y no en los extremos, lo cual indica que la distribución del error es normal. Los valores observados son



muy cercanos a los valores predichos con una tendencia a lineal mientras que los gráficos de residuales contra valores predichos no existe un patrón definido por lo que se puede concluir que las varianzas son iguales para todas las pruebas valor. Asimismo se confirma que el modelo es idóneo con una confianza del 95% [Vázquez, 2012; Guzmán, 2013].

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) en un modelo de triple interacción para cada biomasa con un intervalo de confianza del 95% para las variables a estudiar (Anexo B: Tabla B1 a B4). Se analizó el efecto de tiempo, temperatura y concentración de NaOH sobre la cantidad de LS y AT, mediante el programa STATISTICA versión 12 obteniendo cuales son variables que afectan significativamente al sistema. Se ajustó la matriz experimental a un modelo de regresión multivariante por el método de mínimos cuadrados [Ferré, 2004], obteniendo así los coeficientes de regresión que demuestra, de forma matemática, los efectos significativos de las variables independientes y si estas son favorables o no para las componentes de respuesta. Para un diseño  $2^3$  el modelo se ajusta:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1*2} X_1 X_2 + \beta_{1*3} X_1 X_3 + \beta_{2*3} X_2 X_3 + \beta_{1*2*3} X_1 X_2 X_3$$

Dónde:

$\beta_0$  = coeficiente de regresión del promedio

$\beta_n$  = coeficientes de regresión de los efectos de cada variable independiente y sus respectivas interacciones

X1 = tiempo (min)

X2 = Temperatura (°C)

X3 = [NaOH] %p/v

X1, X2 y X3 dentro de los valores codificados en la Tabla 4.5.

Los coeficientes de regresión se localizan en la tabla 5.12 para ambas biomásas, los efectos significativos se encuentran resaltados en la tabla.

En la corona de la piña las variables que poseen mayor efecto en la solubilización de lignina son el tiempo, la temperatura y la concentración de hidróxido de sodio siendo este último el que más afecta, no obstante para la obtención de azúcares totales en un intervalo de confianza del 90% existe una diferencia significativa en la triple interacción de forma negativa (Tabla 5.12).

En el residuo de nopal se puede observar que los factores que afectan para la obtención de la mayor cantidad de lignina soluble y azúcares totales son el tiempo, la temperatura y el hidróxido de sodio; por otra parte la triple interacción afecta solo a la obtención de lignina soluble y la interacción tiempo/concentración de NaOH a los AT (Tabla 5.12).

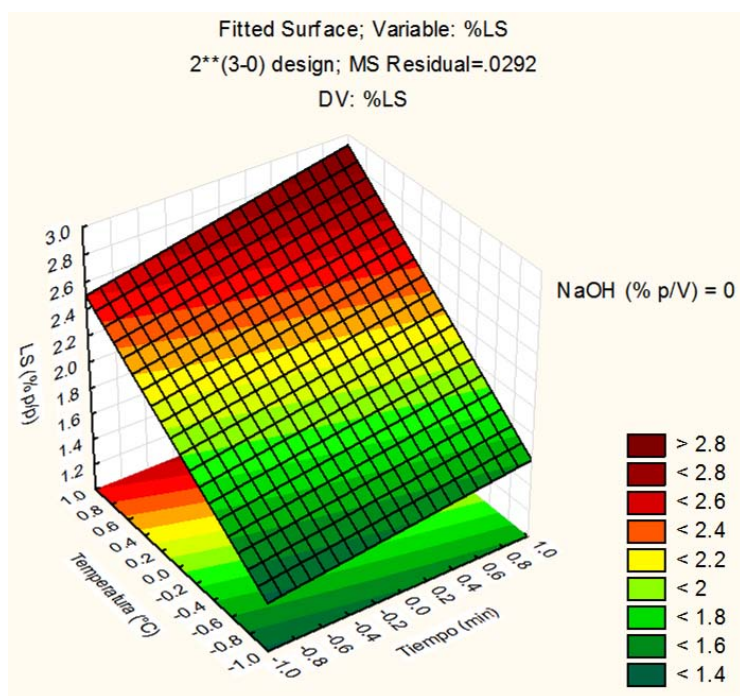
Tabla 5.12: Coeficientes de regresión lineal del modelo  $y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1*2} X_{1*2} + \beta_{1*3} X_{1*3} + \beta_{2*3} X_{2*3} + \beta_{1*2*3} X_{1*2*3}$ . \* Con un 95% de confianza y \*\*con un 90% de confianza. Los efectos significativos se encuentran resaltados.

Factor	Coeficientes	Corona de la piña		Residuo del nopal	
		*LS (% p/p)	**AT (% p/p)	*LS (% p/p)	*AT (% p/p)
	$\beta_0$	<b>6.8538</b>	<b>6.4300</b>	<b>2.6288</b>	<b>6.1750</b>
<b>(1) Tiempo (min)</b>	$\beta_1$	<b>0.3213</b>	-0.3350	<b>-0.4713</b>	<b>-1.0650</b>
<b>(2) Temperatura (°C)</b>	$\beta_2$	<b>0.4788</b>	-0.4050	<b>0.6063</b>	<b>1.5750</b>
<b>(3) NaOH (% p/v)</b>	$\beta_3$	<b>4.7563</b>	0.3400	<b>0.8883</b>	<b>2.7100</b>
<b>Interacción 1*2</b>	$\beta_{1*2}$	0.0763	0.1600	-0.1588	0.0750
<b>Interacción 1*3</b>	$\beta_{1*3}$	0.1583	0.1150	-0.1913	<b>-1.7500</b>
<b>Interacción 2*3</b>	$\beta_{2*3}$	-0.1338	0.0550	0.0513	0.1650
<b>Interacción 1*2*3</b>	$\beta_{1*2*3}$	0.0288	<b>-0.6200</b>	<b>0.4063</b>	-0.1850
	$R^2$	0.9997	0.9394	0.9948	0.9995

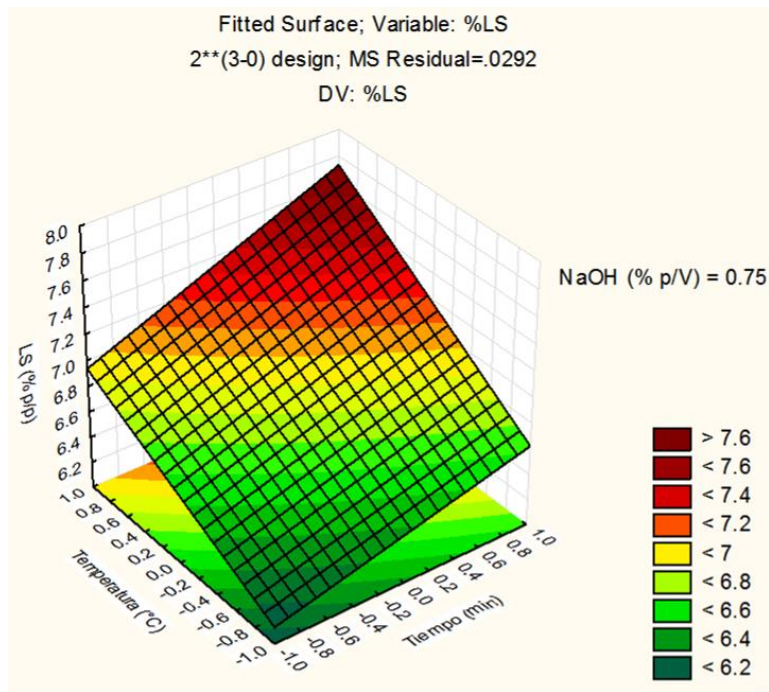
Para observar de mejor manera el comportamiento de las variables independientes con respecto a las variables de respuesta son útiles las gráficas de superficie.

Con respecto al comportamiento de la corona de piña en el pretratamiento en la gráficas 5.7 a 5.9 se puede observar el incremento de la lignina soluble cuando aumentan las tres variables independientes durante el pretratamiento, estas variables por si solas afectan de forma favorable para la solubilización de lignina. La concentración de NaOH es la que más afecta de forma positiva, esto quiere decir que entre mayor sea la cantidad de hidróxido de sodio será mayor la deslignificación en la corona de la piña (dentro del dominio experimental).

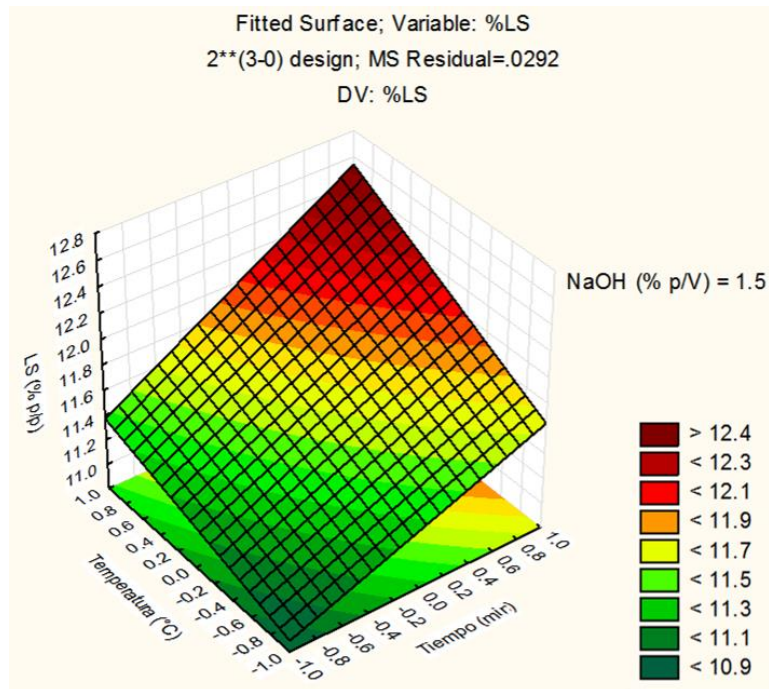
Gráfica 5.7: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en la corona de la piña sobre el contenido de lignina (% p/p) a 0 % de NaOH.



Gráfica 5.8: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en la corona de la piña sobre el contenido de lignina (% p/p) a 0.75 % de NaOH.

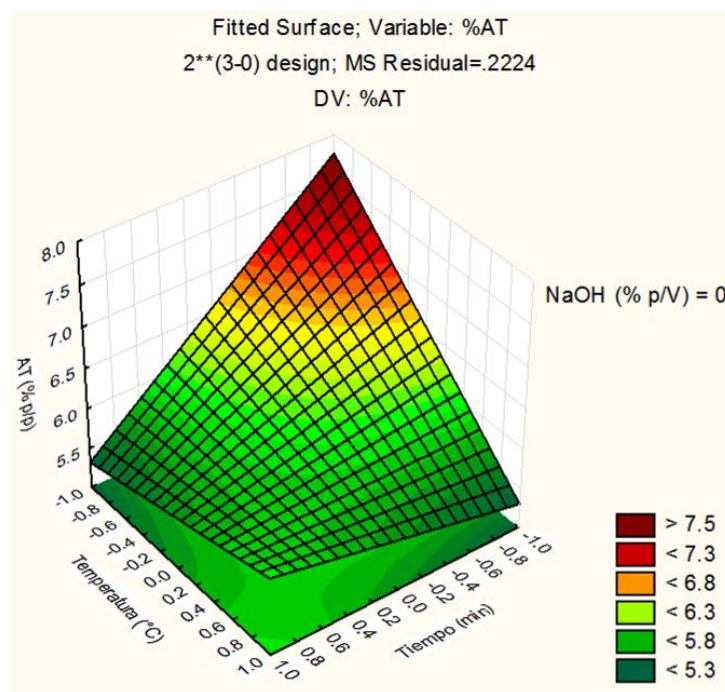


Gráfica 5.9: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en la corona de la piña sobre el contenido de lignina (% p/p) a 1.5 % de NaOH.



En la corona de piña también se evaluó el comportamiento con respecto a la obtención de azúcares totales en el licor del pretratamiento, como se observó en la tabla 5.12 el único efecto significativo es la triple interacción la cual actúa de forma negativa esto se traduce que la interacción de las variables independientes no son favorables para la obtención de una mayor cantidad de azúcares. En la gráfica 5.10 se muestra el mejor comportamiento donde las variables de tiempo, temperatura y concentración de hidróxido de sodio se encuentran en el rango mínimo.

Gráfica 5.10: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en la corona de la piña sobre el contenido de azúcares totales (% p/p) a 0 % de NaOH.



El objetivo de esta etapa es poder obtener la mayor cantidad de lignina soluble, ya que así aumentará los rendimientos en la sacarificación enzimática con el cóctel comercial, los efectos que afectan positivamente para ello son las tres variables independiente, con esta primicia y con el análisis del diseño de

experimento las mejores condiciones dentro del dominio experimental son los del experimento 8:

Tiempo (min): 30

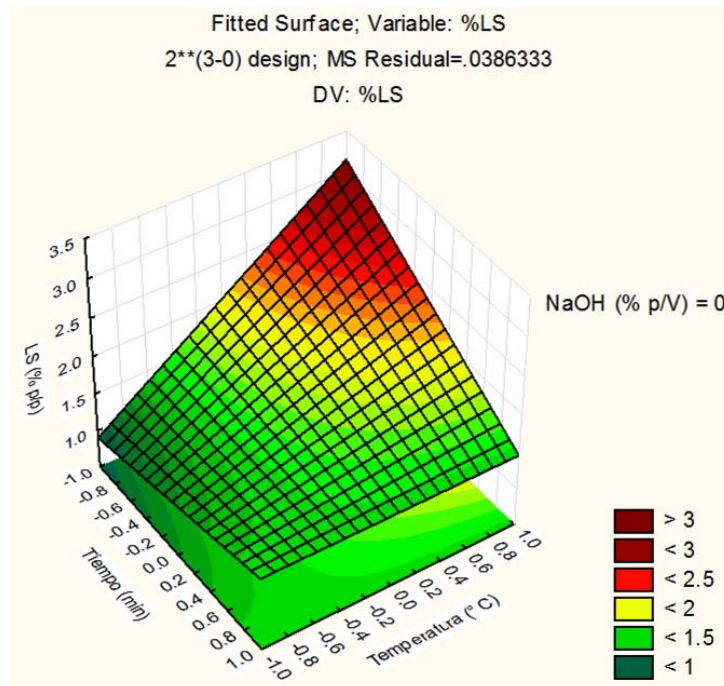
Temperatura (°C): 140

NaOH (% p/V): 1.5

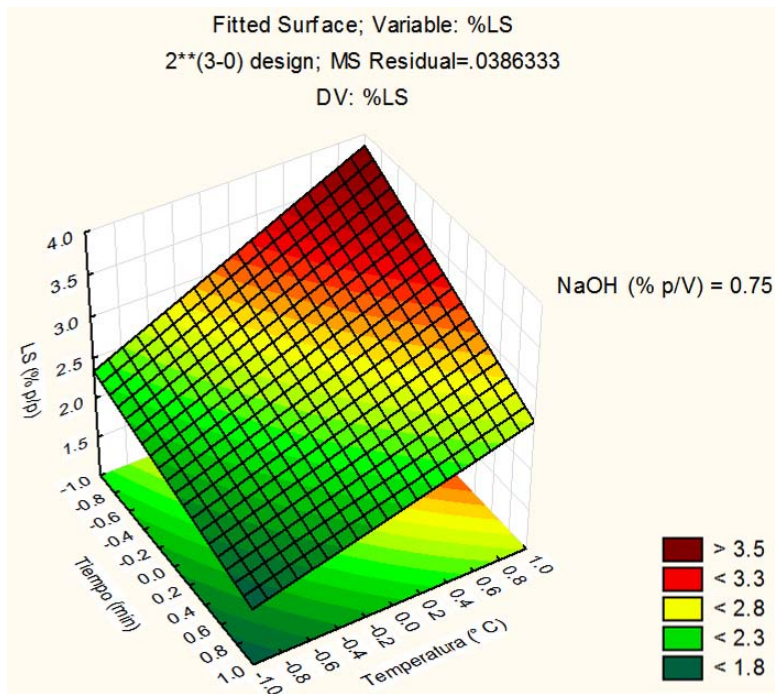
Resultados: 12.54 % p/p LS y 5.74 % p/p AT

El efecto que tiene mayor significancia en el pretratamiento del residuo del nopal es la concentración de NaOH el cual tiene un efecto favorable, de esta forma entre mayor sea la concentración hidróxido de sodio se obtendrá mayor cantidad de lignina soluble; como se muestra en la graficas de superficie 5.11 a 5.13.

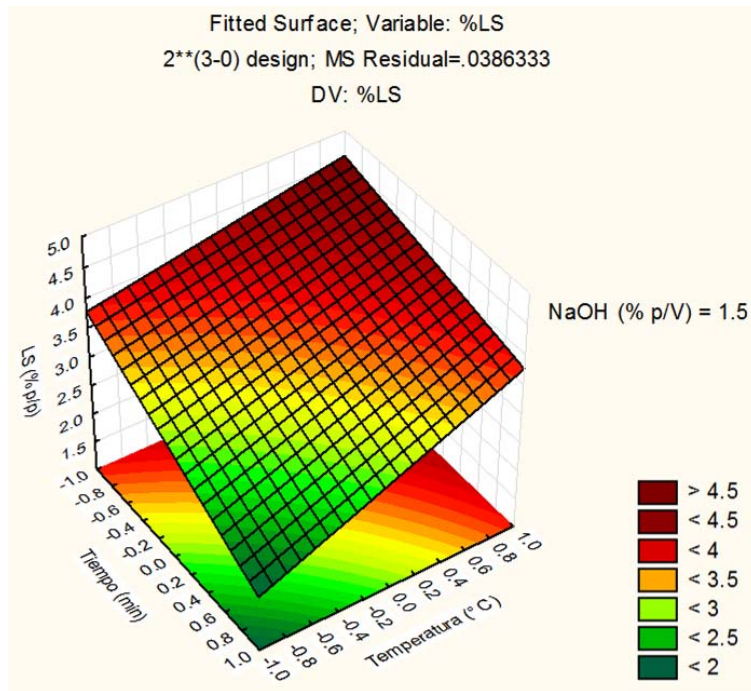
Gráfica 5.11: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 0 % de NaOH.



Gráfica 5.12: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 0.75 % de NaOH.

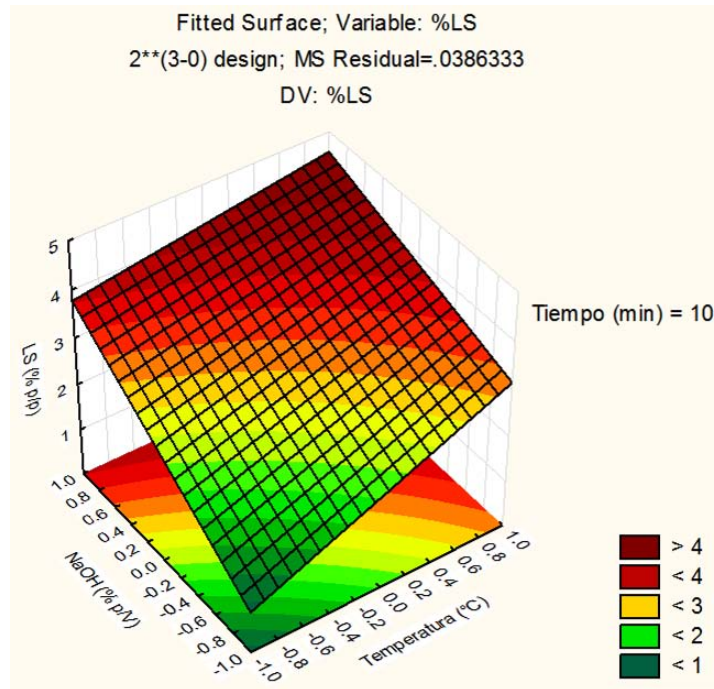


Gráfica 5.13: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 1.5 % de NaOH.



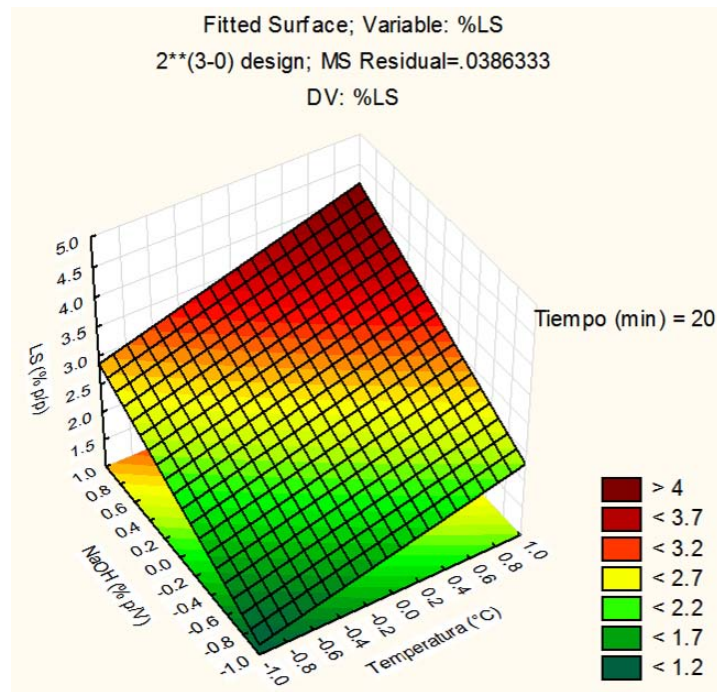
Sin embargo el tiempo posee un efecto significativo desfavorable en la deslignificación del residuo del nopal lo que significa que al aumentar el tiempo se obtendrá menor cantidad de lignina en el líquido recuperado, la disminución de esta se puede observar en las gráficas 5.14 a 5.16.

Gráfica 5.14: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 10 min.

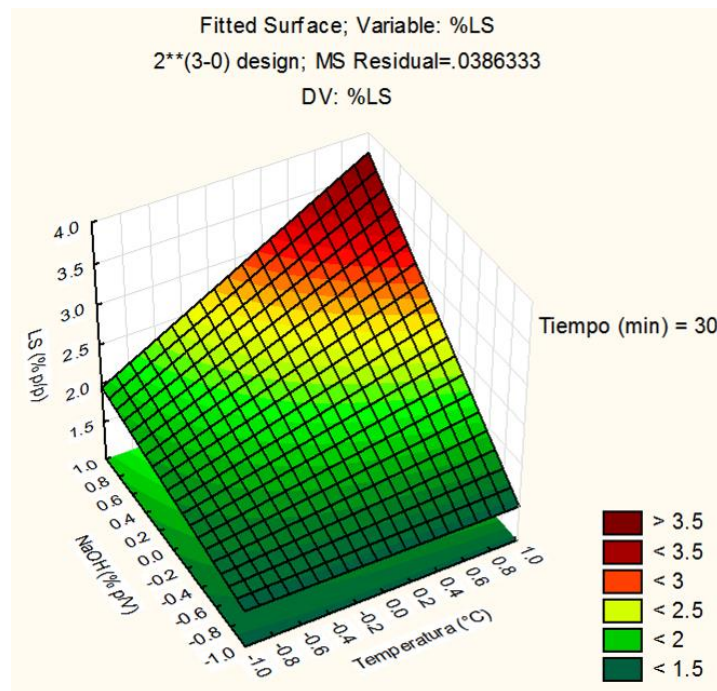




Gráfica 5.15: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 20 min.



Gráfica 5.16: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 30 min.



La triple interacción posee un efecto positivo para la solubilización de lignina, sin embargo el tiempo *in situ* ya es un factor negativo, por lo que solo el aumento de la temperatura y la concentración de hidróxido son favorables para la deslignificación en la biomasa.

En la obtención de azúcares totales del residuo del nopal los efectos significativos corresponden a los mismos que en la lignina soluble pues la concentración de hidróxido de sodio posee un efecto favorable y el tiempo un efecto negativo.

Siguiendo la misma primicia que para la corona de la piña el mejor pretratamiento para la mayor solubilización de lignina en el residuo del nopal corresponde a la prueba cuatro logrando los siguientes resultados:

Tiempo (min): 10

Temperatura (°C): 140

NaOH (% p/V): 1.5

Resultados: 4.59 % p/p LS y 13.55 % p/p AT.

En este caso las condiciones del pretratamiento elegido son favorables para las dos variables de respuesta.

En ambos materiales la concentración de hidróxido de sodio posee un efecto favorable en la solubilización de lignina, esto se debe a que el compuesto es más soluble en presencia de álcalis fuertes como el usado en el pretratamiento.

Para fines de este estudio el licor obtenido del pretratamiento fue separado de la biomasa para caracterizarlo y no fue incluido en la sacarificación.

#### 5.4.2 Hidrólisis enzimática en el material lignocelulósico pretratado

Para evaluar el efecto que tiene el pretratamiento hidrotérmico/alcalino se optó por realizar una hidrólisis enzimática en la biomasa pretratada, tomando ahora como variables de respuesta los AT y AR posteriores a esta sacarificación. En la corona de la piña se decidió trabajar con el cóctel E7 que tuvo un desempeño intermedio en la hidrólisis del material sin pretratar y E9 que presentó la mejor eficiencia (Gráfica 5.5). En el residuo del nopal se seleccionó el cóctel E7 de donde se obtuvo una sacarificación del material sin pretratar de 17.31 % p/p de AR (Tabla 5.9) el cual es un valor intermedio de a los obtenidos con E6 y E9. El tratamiento se ejecutó siguiendo la misma aleatorización que se usó para realizar en el pretratamiento y se utilizaron las mismas condiciones que para la biomasa sin pretratar con un porcentaje del 10 % de sólido seco y  $0.9 \frac{\text{mL de coctel enzimático}}{\text{mg de biomasa seca}}$

En la corona de piña hidrolizada con el cóctel E7 se observa que los resultados de AR obtenidos en los experimentos 4 y 6 son semejantes entre sí, los cuales presentan el 33.73 % p/p y 31.97 % p/p respectivamente. En estas pruebas se obtuvieron las mayores cantidades de AR de todos los experimentos (Tabla 5.13).

En la hidrólisis con el cóctel enzimático E9 se obtuvieron resultados muy satisfactorios en donde incluso algunos exceden la cuantificación conseguida en la caracterización del material, como son las pruebas 4, 6, 8, 9, 10 y 11 para los azúcares totales y reductores (Tabla 5.13); este comportamiento es semejante al que presentó el nopal en la hidrolisis enzimática de la biomasa sin pretratar (Figura 5.2). Los mejores resultados se obtuvieron en el experimento 4 con un 69.36 % p/p de AR.

En el residuo del nopal los mejores resultados se obtuvieron con la biomasa proveniente de la prueba 4 con 24.36 % p/p de AT y 24.11 % p/p utilizando el

cóctel E7. El licor obtenido en el residuo del nopal ya no presentaba apariencia viscosa, confirmando que el mucilago fue retirado en el pretratamiento aplicado.

Tabla 5.13: Cantidad de azúcares totales y azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis enzimática en la biomasa pretratada con los cocteles comerciales

Prueba	Corona de la piña				Residuo del nopal	
	AT E7 (% p/p)	AR E7 (% p/p)	AT E9 (% p/p)	AR E9 (% p/p)	AT E7 (% p/p)	AR E7 (% p/p)
<b>1</b>	18.39	9.73	20.03	13.70	7.06	6.96
<b>2</b>	21.22	18.01	36.31	27.72	14.72	13.56
<b>3</b>	12.42	9.49	29.58	19.98	12.14	11.47
<b>4</b>	44.08	33.73	76.78	69.36	24.36	24.11
<b>5</b>	10.43	5.10	25.57	16.62	10.73	9.99
<b>6</b>	39.68	31.97	70.74	64.06	9.44	8.17
<b>7</b>	28.73	16.52	23.12	14.21	12.96	10.88
<b>8</b>	37.75	24.98	73.82	65.03	14.32	12.97
<b>9 (C)</b>	44.86	28.77	66.01	54.17	15.77	13.26
<b>10 (C)</b>	43.18	27.73	66.84	54.80	15.84	13.90
<b>11 (C)</b>	43.25	27.79	67.97	53.97	15.25	13.63

Se comprobó la idoneidad del modelo matemático realizando las respectivas gráficas de probabilidad normal contra residuales, valores observados contra valores predichos y valores predichos contra residuales (Anexo B Gráfica B7-B15). Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 % (Anexo B: Tabla B5-B10). De la misma manera se evaluó el efecto del tiempo, temperatura y concentración de NaOH aplicadas en el pretratamiento sobre la obtención de AT y AR posterior a una sacarificación y de esta forma obtener los efectos significativos o coeficientes de regresión (Tabla 5.14). El análisis se llevó a cabo mediante el programa STATISTIA versión 12.

En la sacarificación de la corona de piña con cóctel E7 los factores que afecta significativamente en la obtención de AT y AR es el tiempo, la temperatura, la concentración de hidróxido de sodio y la triple interacción, además solo para obtención de AR afecta la interacción tiempo/temperatura (Tabla 5.14).

Por otro lado, en la corona de piña pretratada sacarificada con E9 los factores que perturban significativamente en la obtención de AT y AR son todas las variables independientes y sus respectivas interacciones (Tabla 5.14).

En el residuo del nopal de acuerdo a los coeficientes de regresión (Tabla 5.14) el único parámetro que no afecta significativamente a la sacarificación es la triple interacción en la obtención de AT y AR.

Tabla 5.14: Coeficientes de regresión lineal del modelo  $y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{1*2}X_{1*2} + \beta_{1*3}X_{1*3} + \beta_{2*3}X_{2*3} + \beta_{1*2*3}X_{1*2*3}$ . \* Con un 95% de confianza. Los efectos significativos se encuentran resaltados.

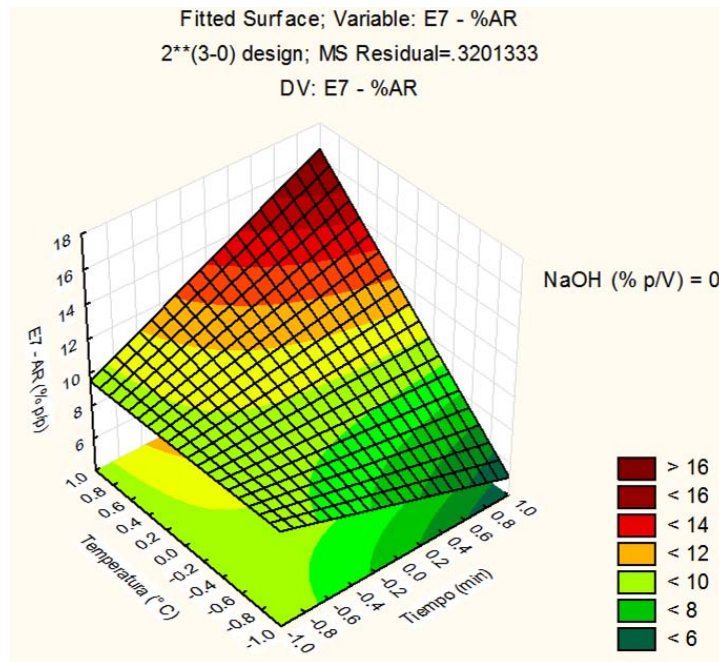
Coeficientes	Corona de la piña				Residuo del nopal	
	*AT E7 (% p/p)	*AR E7 (% p/p)	*AT E9 (% p/p)	*AR E9 (% p/p)	*AT E7 (% p/p)	*AR E7 (% p/p)
$\beta_0$	<b>26.5875</b>	<b>18.6913</b>	<b>44.4938</b>	<b>36.3354</b>	<b>13.2162</b>	<b>12.2636</b>
$\beta_1$	<b>2.5600</b>	<b>0.9513</b>	<b>3.8188</b>	<b>3.6446</b>	<b>-1.3551</b>	<b>-1.7606</b>
$\beta_2$	<b>4.1575</b>	<b>2.4888</b>	<b>6.3313</b>	<b>5.8104</b>	<b>2.7293</b>	<b>2.5936</b>
$\beta_3$	<b>9.0950</b>	<b>8.4813</b>	<b>19.9188</b>	<b>20.2079</b>	<b>2.4936</b>	<b>2.4389</b>
$\beta_{1*2}$	-0.0650	<b>-1.3813</b>	<b>-6.1736</b>	<b>-6.1704</b>	<b>-0.9503</b>	<b>-1.1687</b>
$\beta_{1*3}$	0.4725	0.3513	<b>4.0488</b>	<b>4.3571</b>	<b>-2.4758</b>	<b>-2.3719</b>
$\beta_{2*3}$	1.0750	-0.3063	<b>4.5563</b>	<b>4.8429</b>	<b>0.9002</b>	<b>1.2446</b>
$\beta_{1*2*3}$	<b>-6.1325</b>	<b>-4.2963</b>	<b>-3.1738</b>	<b>-3.9979</b>	-0.2365	-0.2662
$R^2$	0.9990	0.9993	0.9997	0.9999	0.9989	0.9989
	X1= Tiempo (min), X2 = Temperatura (° C), X3 = NaOH (% p/V)					

Al igual que en el análisis del diseño experimental del pretratamiento a continuación se presentan las gráficas de superficie más significativas que muestran los comportamientos de las variables de respuesta en la sacarificación enzimática (azúcares totales y azúcares reductores) con respecto a las variables independientes que poseen efecto significativo.

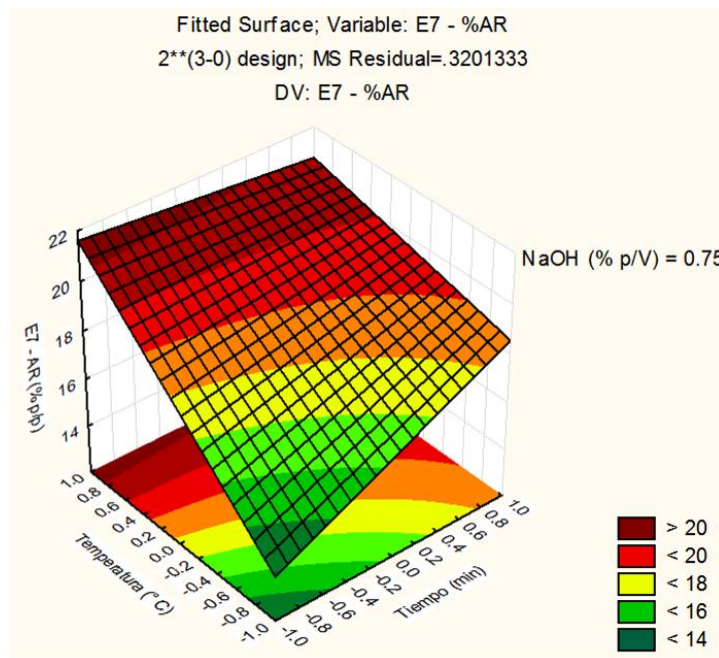
En la hidrólisis con el cóctel E7 de la corona de piña pretratada los coeficientes de regresión muestran que el factor que más afecta de forma positiva es la concentración de NaOH seguido por la temperatura y el tiempo así que el aumento de cada factores por separado favorece a una obtención mayor de AT y AR pero su triple interacción es negativa por lo que el aumento al mismos tiempo de todas las variables independientes durante el pretratamiento no es favorable para esta hidrolisis enzimática. Por otro lado la interacción temperatura/ tiempo no es favorable para la obtención de AR después de la hidrolisis así que solo uno de estos dos factores puede estar en un máximo dentro del dominio experimental para obtener la mayor eficiencia.

A continuación en las gráficas 5.17 a 5.19 se muestra el comportamiento sobre la obtención de AR pero es similar para la producción de AT con excepción de la interacción antes mencionada la cual no afecta a esta última rúbrica.

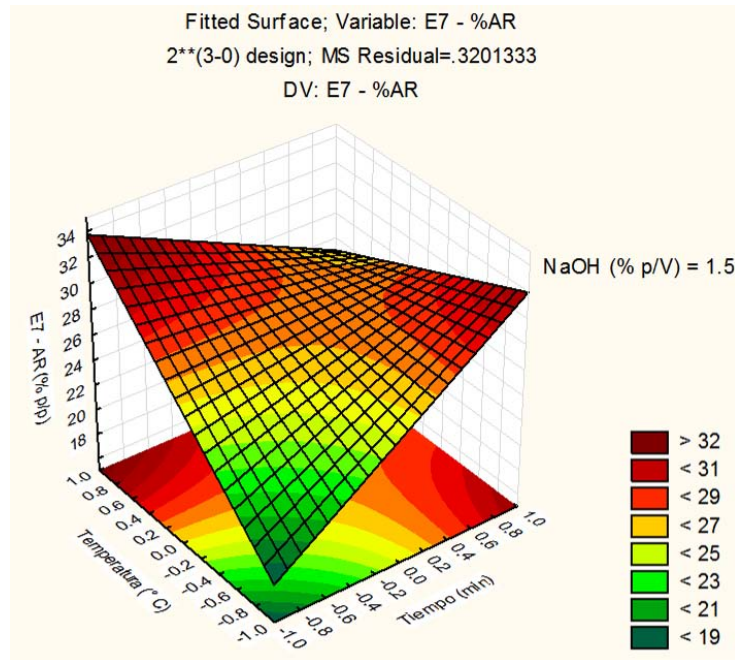
Gráfica 5.17: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.



Gráfica 5.18: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0.75 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.



Gráfica 5.19: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 1.5 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.



En la gráfica 5.19, donde la concentración de NaOH es de 1.5 p/V%, presenta dos puntos máximos cercanos con las siguientes combinaciones:

**Prueba 4**

Tiempo (min): 10

Temperatura (°C): 140

NaOH (% p/V): 1.5

Resultados: 44.08 % p/p AT y 33.73 % p/p AR.

**Prueba 6**

Tiempo (min): 30

Temperatura (°C): 100

NaOH (% p/V): 1.5

Resultados: 39.68 % p/p AT y 31.97 % p/p AR



De los jarabes obtenidos en la sacarificación se realizaron los perfiles de carbohidratos mediante HPLC (Anexo A.1) y se muestran en la tabla 5.15. En amarillo se presentan los dos perfiles que pueden ser seleccionados. El perfil del experimento 4 presenta una cantidad de glucosa con un 22.21 % p/p siendo el más alto de todos, mientras que la prueba 6 presentó el 19.05 % p/p. La presencia de celobiosa indica que la hidrólisis enzimática fue incompleta.

Tabla 5.15: Perfil de carbohidratos obtenidos después de sacarificación con el cóctel E7 la Corona de la piña pretratada.

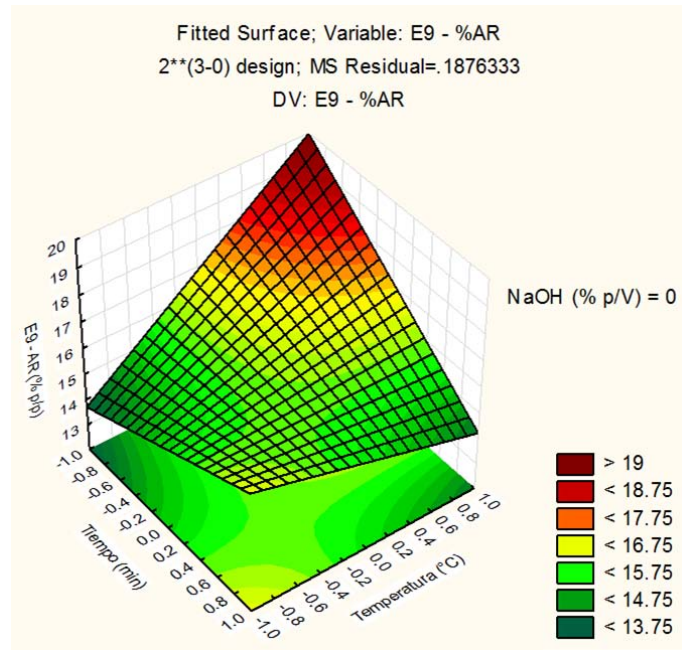
Prueba	Suma AT (% p/p)	Xilosa (% p/p)	Glucosa (% p/p)	Galactosa (% p/p)	Sacarosa (% p/p)	Celobiosa (% p/p)
1	21.61	1.06	8.80	0.00	9.11	2.64
2	26.84	3.58	11.05	7.43	2.53	2.24
3	14.99	1.65	8.77	0.00	2.40	2.17
4	46.66	1.88	22.21	8.95	10.36	3.26
5	11.01	0.58	5.82	0.00	3.15	1.46
6	43.39	4.07	19.05	10.49	6.88	2.90
7	28.69	2.93	13.68	0.00	9,75	2.34
8	40.05	2.67	18.97	5.79	10.34	2.28
9 (C)	47.28	3.72	18.63	8.38	13.23	2.72
10 (C)	45.66	3.95	19.39	7.06	12.59	2.67
11 (C)	46.58	3.54	18.90	7.46	14.28	2.40

Al tener dos condiciones que son favorables para la obtención de AT y AR dentro del dominio experimental es necesario analizar los beneficios que nos ofrece cada uno. En el punto de vista químico es favorable obtener cantidad altas de glucosa ya que así serán fermentadas por *Saccharomyces* nativa produciendo etanol, de la misma forma se puede obtener a partir de sacarosa a pesar de que presenta un costo energético mayor. Este tipo de microorganismos no fermenta las pentosas a etanol por lo que la xilosa no es útil en la fermentación posterior. En el punto de vista de proceso los dos pretratamientos requieren rampas de

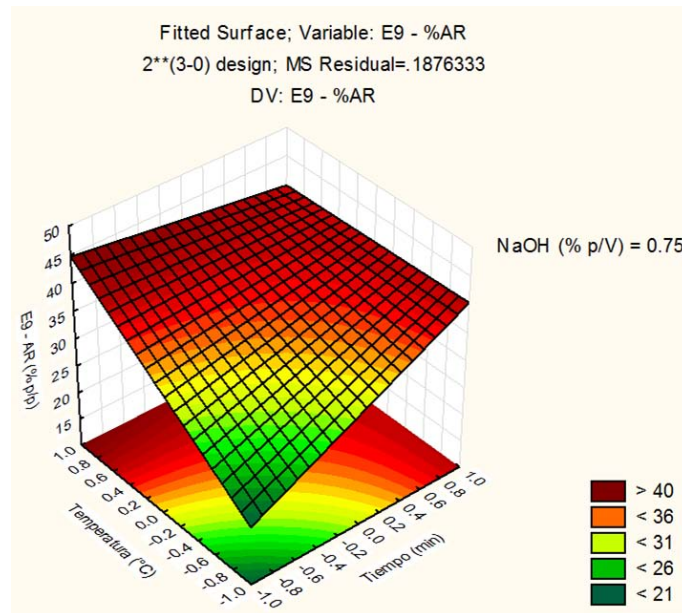
calentamiento y enfriamiento que toman tiempo, de acuerdo a los datos experimentales que se recabaron durante el estudio, hay una diferencia de 10 min siendo el experimento 6 el que toma más tiempo. El hecho de poder obtener buenos resultados en un tiempo corto es una idea atractiva ya que así será más eficiente la producción de los jarabes, además de acuerdo a los coeficientes de regresión presentados en la tabla 5.14 el aumento de temperatura posee un efecto más favorable que el tiempo sobre la obtención de AT y AR, por lo que la prueba 4 será la más óptima en la hidrólisis con el cóctel E7.

En la sacarificación con E9 de la corona de piña pretratada el factor que más afecta es la concentración de hidróxido de sodio de forma favorable para una mayor obtención de azúcares totales y reductores, sin embargo la triple interacción posee un efecto negativo así que las variables independientes no pueden estar en su máximo nivel dentro del dominio experimental al mismo tiempo. La interacción tiempo/temperatura posee un efecto negativo por lo que no puede aumentar los dos parámetros al mismo tiempo, para evitar este efecto desfavorable se requiere utilizar una de estas variables en su nivel máximo dentro del dominio experimental y la otra en su nivel mínimo. El comportamiento con respecto a los AR de presentan en las gráficas 5.20 a 5.22, para los AT el comportamiento es similar al presentado en los AR.

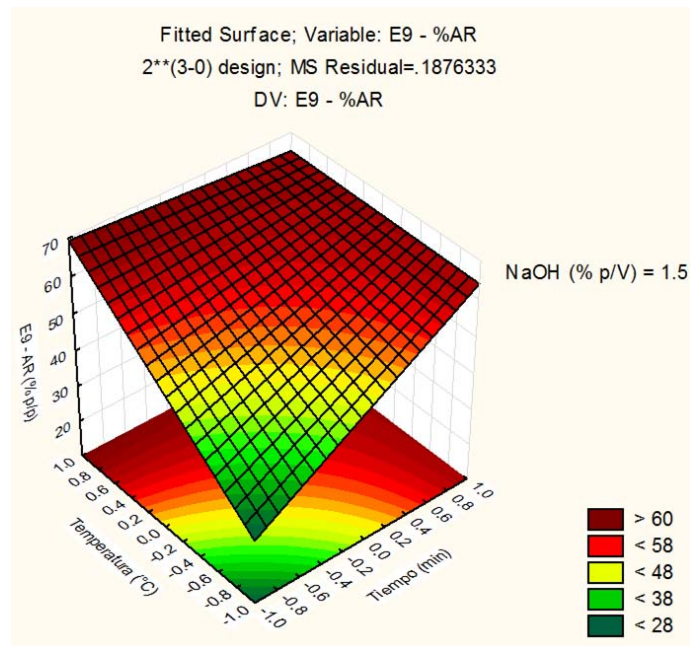
Gráfica 5.20: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E9.



Gráfica 5.21: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0.75 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E9.



Gráfica 5.22: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 1.5 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E9.



De acuerdo a los coeficientes de regresión y a las gráficas de superficie para generar la mayor cantidad de azúcares totales y reductores es indispensable el aumento la concentración de NaOH. Con respecto a la temperatura y el tiempo como se mencionó esta interacción posee un efecto negativo sobre las variables de respuesta (AT y AR) que inclusive es mayor que el efecto desfavorable de la triple interacción, por otro lado la temperatura in situ posee un efecto más positivo que el tiempo y de la misma manera la interacción de temperatura/NaOH es más favorable que la interacción tiempo/NaOH. Así las mejores condiciones lo posee el experimento 4 con las siguientes condiciones:

Tiempo (min): 10

Temperatura (°C): 140

NaOH (% p/V): 1.5

Resultados: 76.78 % p/p AT y 69.36 % p/p AR

La condición seleccionada cumple con las restricciones que tiene el efecto negativo en la interacción tiempo/temperatura, donde el tiempo está en el nivel mínimo del dominio y la temperatura en su nivel máximo.

Los jarabes obtenidos fueron caracterizados por HPLC (Anexo A.1) y se muestran en la tabla 5.16. En amarillo se muestra el perfil de carbohidratos del pretratamiento elegido con un contenido de glucosa del 56.88 % p/p el cual es el que presenta un mayor contenido de este azúcar.

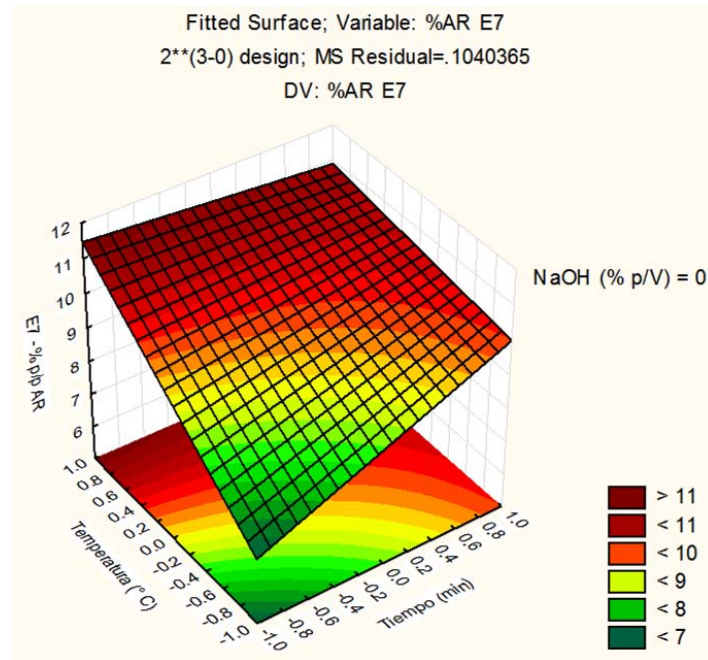
Tabla 5.16: Perfil de carbohidratos obtenidos después de sacarificación con el cóctel E9 la Corona de la piña pretratada.

<b>Prueba</b>	<b>Suma AT (% p/p)</b>	<b>Xilosa (% p/p)</b>	<b>Glucosa (% p/p)</b>	<b>Sacarosa (% p/p)</b>
<b>1</b>	<b>23.09</b>	4.36	11.26	7.47
<b>2</b>	<b>32.07</b>	9.10	15.32	7.65
<b>3</b>	<b>27.45</b>	4.11	18.39	4.95
<b>4</b>	<b>77.23</b>	<b>10.96</b>	<b>56.88</b>	<b>9.39</b>
<b>5</b>	<b>23.30</b>	3.32	15.32	7.65
<b>6</b>	<b>69.46</b>	13.52	48.79	7.15
<b>7</b>	<b>21.65</b>	5.57	9.42	6.61
<b>8</b>	<b>74.98</b>	14.71	54.77	5.50
<b>9 (C)</b>	<b>62.52</b>	11.14	39.67	11.71
<b>10 (C)</b>	<b>63.09</b>	12.25	40.90	9.94
<b>11 (C)</b>	<b>62.81</b>	11.65	40.87	10.29

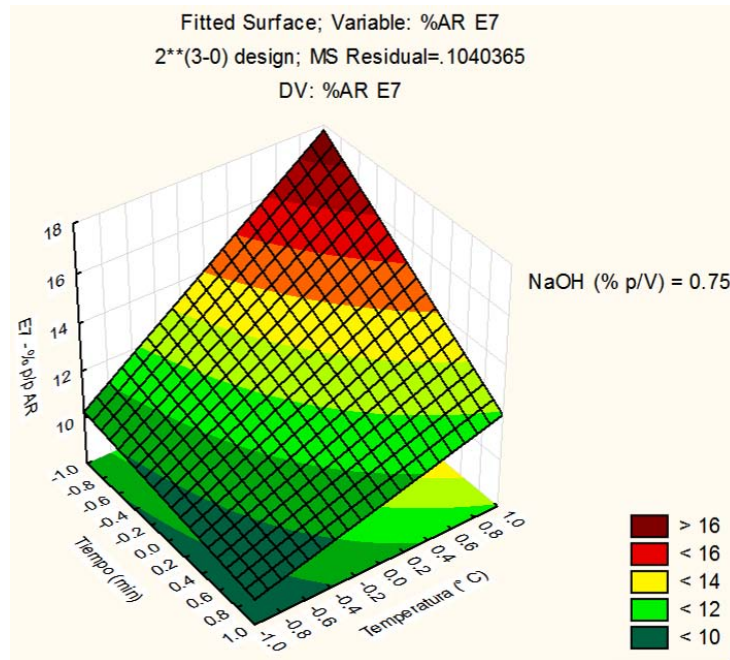
En el residuo del nopal de acuerdo a la tabla 5.14 los coeficientes de regresión muestra que los factores que más afectan son la temperatura y la concentración de hidróxido de sodio de forma favorable, la interacción temperatura/NaOH, por otro lado al igual que en la evaluación del licor del pretratamiento el tiempo afecta de manera negativa así como las interacciones

donde este factor interviene. El comportamiento con respecto a los AR se muestran en las gráficas 5.23 a 5.25.

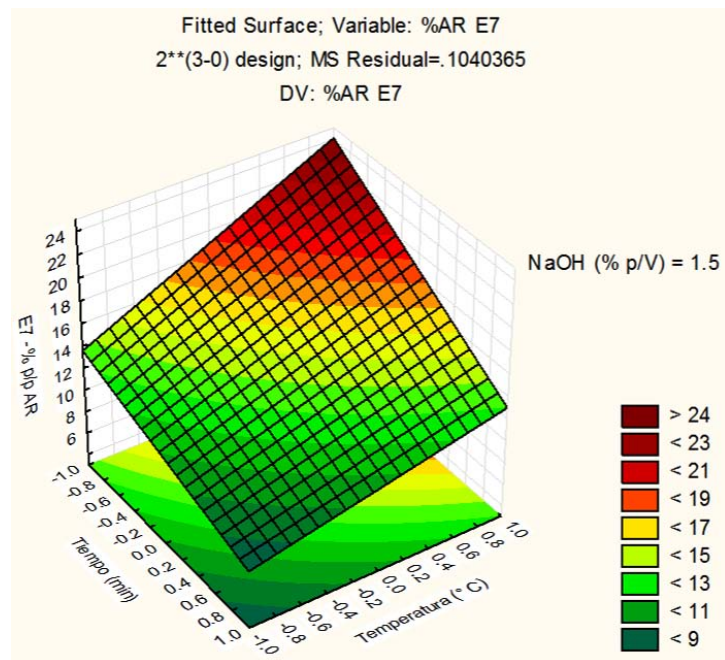
Gráfica 5.23: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en el residuo del nopal posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.



Gráfica 5.24: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0.75 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en el residuo del nopal posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.



Gráfica 5.25: Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 1.5 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en el residuo del nopal posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.



El comportamiento en la obtención de los AT es similar a los presentados

Con el análisis del comportamiento de la sacarificación con E7 después de pretratar el material se puede concluir que las mejores condiciones dentro del dominio experimental para la obtención de azúcares totales y reductores son:

Tiempo (min): 10

Temperatura (°C): 140

NaOH (% p/V): 1.5

Resultados: 24.36 % p/p AT y 24.11 % p/p AR

En la tabla 5.17 se muestra el perfil de carbohidratos obtenidos por medio de HPLC (Anexo A.1), donde en amarillo se muestra el pretratamiento elegido para una eficiente sacarificación.

Tabla 5.17: Perfil de carbohidratos obtenidos después de sacarificación con el cóctel E7 en el residuo del nopal pretratado.

<b>Prueba</b>	<b>Suma AT (% p/p)</b>	<b>Glucosa (% p/p)</b>	<b>Celobiosa (% p/p)</b>
<b>1</b>	6.84	5.02	1.82
<b>2</b>	12.64	9.48	3.16
<b>3</b>	11.79	9.16	2.63
<b>4</b>	<b>22.15</b>	<b>13.37</b>	<b>8.78</b>
<b>5</b>	9.76	8.39	1.37
<b>6</b>	8.11	2.28	5.83
<b>7</b>	11.41	8.86	2.55
<b>8</b>	13.18	3.10	10.08
<b>9 (C)</b>	13.92	9.54	4.38
<b>10 (C)</b>	14.03	9.36	4.67
<b>11 (C)</b>	13.67	9.56	4.11



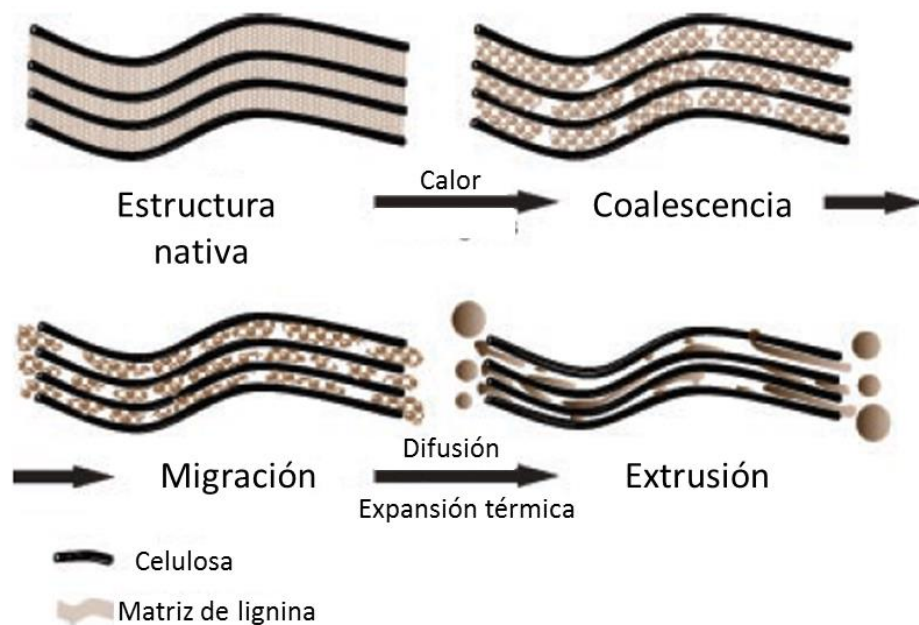
Así como en el pretratamiento, el tiempo también tiene un efecto negativo en la sacarificación y lo mismo sucede con la interacción tiempo/NaOH. Este comportamiento se puede observar en los pretratamientos 6 y 8 (Tabla 5.17) donde a pesar de no presentar una suma de AT diferentes a los demás experimentos del diseños, si presentan un contenido de glucosa notablemente menor siendo de 2.28 % y 3.10 % respectivamente. Además contiene celobiosa que aunque es un azúcar reductor, su presencia nos indica una hidrólisis enzimática incompleta. De este modo al aumentar la concentración de NaOH y el tiempo de pretratamiento aumenta la presencia de celobiosa.

Bajo la primicia de que el pretratamiento aumenta la biodisponibilidad del material para un posterior ataque enzimático se confirma que el pretratamiento es ineficiente para el residuo del nopal en tiempos mayores a 10 minutos y concentraciones de hidróxido de sodio de 1.5 % p/V. Los obtenidos en la prueba 8 con un tiempo de pretratamiento de 30 min (14.32 % de AT y 12.97 % de AR donde el 3.12 % es glucosa) son menos favorables comparados a los obtenidos en la prueba 4 con 10 min de pretratamiento (24.36 % de AT, 24.11 % de AR y 13.37 % de glucosa) con la misma concentración de hidróxido de sodio al 1.5 % p/V y 140 °C en ambas pruebas, la diferencia de lignina soluble entre los dos experimentos es de un 0.83 % p/p.

Una hipótesis para el comportamiento de los azúcares producidos en la sacarificación de residuo del nopal pretratado es una reorganización de la lignina durante el tiempo del pretratamiento debido a las condiciones de presión y temperatura. Ya que durante un pretratamiento hidrotérmico la pared celular se rompe por la acción del agua a alta temperatura y presión, lo que provoca la hidrólisis de la hemicelulosa y la lignina la cual a su vez se puede recondensar, este comportamiento se ha presentado en paja y en rastrojo de maíz [Donoheo *et al.*, 2008; Ibbett *et al.*, 2013].

Lo que ocurre en la pared celular es que durante el pretratamiento hidrotérmico/alcalino la lignina es solubilizada y retirada de la biomasa, pero no en su totalidad ya que una parte aún se encuentra en el material, sin embargo la fracción que se logra hidrolizar presenta diferentes tamaños en las cadenas de lignina, pues algunas serán de menor tamaño lográndose solubilizar por completo y otras más grandes que son insolubles, estas fracciones presentan coalescencia formando así pequeños agregados que se ubican en su mayoría en la superficie de la biomasa donde se van acumulando en altas densidades con el paso del tiempo en el pretratamiento (Figura 5.6) y finalmente reorganizándose mediante puentes de hidrogeno durante la rampa de enfriamiento lo que impide una posterior hidrólisis enzimática eficiente [Donoheo et al., 2008; Trajano et al., 2013]. Como se ha remarcado la conducta de los materiales dependerá de su origen así como su composición, igualmente diversos estudios han demostrado que aún no se tiene el conocimiento suficiente para sobre el efecto que tiene el pretratamiento sobre la pared celular y sus tres componentes.

Figura 5.6: Modelo del mecanismo de la formación de los agregados de lignina en la superficie de la biomasa [Donoheo et al., 2008.]



### **5.5 Eficiencia del pretratamiento en el residuo agroindustrial**

Uno de los objetivos de este estudio es evaluar el efecto que tiene el pretratamiento en la deslignificación y la sacarificación en la biomasa.

Con el pretratamiento hidrotérmico/alcalino se logró obtener una eficiencia en la deslignificación de 51.56 % en la corona de la piña provenientes del experimento 8 que fue seleccionada como el que posee las mejores condiciones y en el residuo del nopal de 39.64 % proveniente de la prueba 4. Estos resultados se obtienen tomando a la LT obtenida en la caracterización de cada material como el 100 %.

El principal objetivo del estudio es conocer el efecto que tiene el pretratamiento sobre la biomasa. Para la evaluación o se requiere la comparación de los azúcares cuantificados en la hidrólisis enzimática del material sin pretratar contra los glúcidos obtenidos en el licor del pretratamiento y en la sacarificación que se sumaran de la siguiente forma:

$$\%ATf = \%AT \text{ en el pretratamiento} + \%AT \text{ en la sacarificación}$$

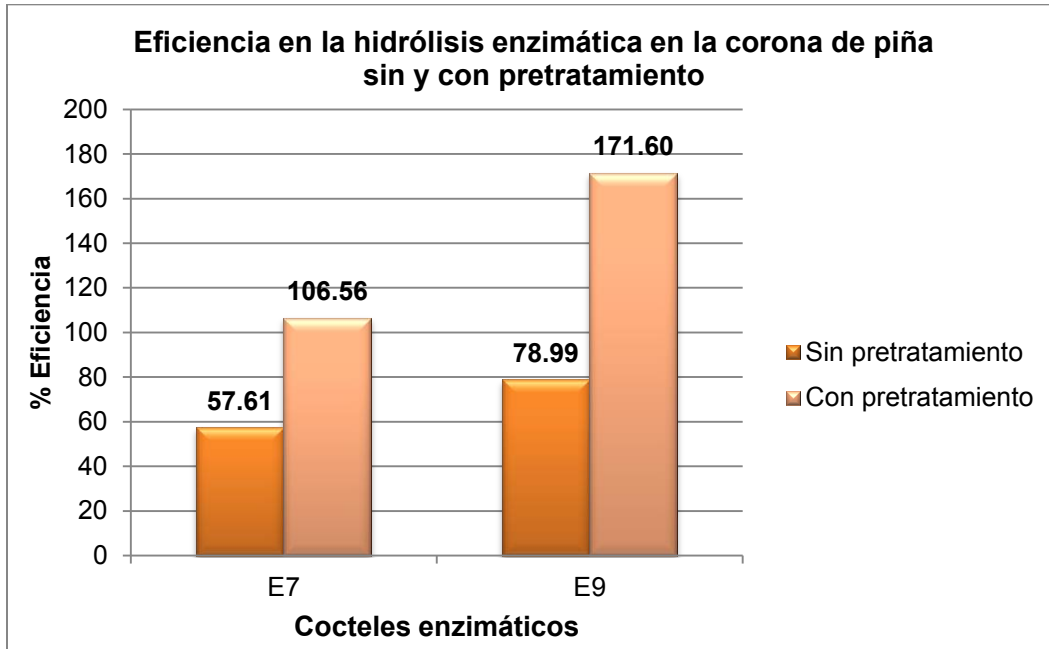
En la tabla 5.18 se incluyen los datos de eficiencia de la sacarificación después del pretratamiento, este se obtiene tomando a los AT obtenidos en la caracterización de cada material como el 100 %. En Amarillo se muestra los pretratamientos elegidos. En la corona de la piña hidrolizado con el cóctel E7 se obtuvo el 51.58 % p/p de AT con una eficiencia de 106.56 %; en la hidrólisis con E9 se logró el 82.42 % p/p con una eficiencia del 171.60 %. En el residuo del nopal se consiguió el 37.92 % p/p de AT y 125.36 % de eficiencia.

Tabla 5.18: Cantidad de azúcares totales obtenidos en los licores del pretratamiento y sacarificación con el cóctel E7 y E9 de la corona de la piña y de la sacarificación con el cóctel E7 en el residuo del nopal.

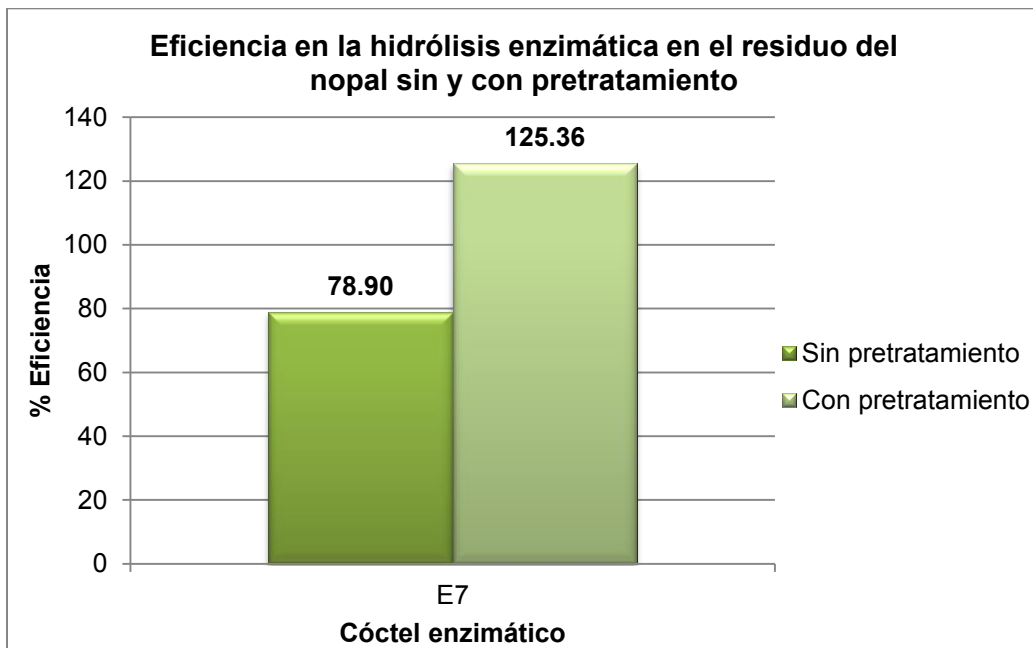
Prueba	Corona de piña				Residuo de nopal	
	ATf E7 (% p/p)	Eficiencia con E7 (%)	ATf E9 (% p/p)	Eficiencia con E9 (%)	ATf E7 (% p/p)	Eficiencia con E7 (%)
1	26.17	54.49	27.81	57.90	8.68	28.70
2	28.40	59.13	43.19	89.92	24.57	81.25
3	17.72	36.89	34.88	72.62	16.07	53.14
4	51.18	106.56	82.42	171.60	37.91	125.36
5	15.75	32.79	30.89	64.31	13.21	43.68
6	47.04	97.94	78.10	162.61	13.88	45.90
7	34.69	72.23	29.08	60.55	18.78	62.10
8	43.49	90.55	79.56	165.65	22.02	72.82
9 (C)	51.41	107.04	72.56	151.07	23.29	77.02
10 (C)	49.09	102.21	72.75	151.47	23.68	78.31
11 (C)	49.58	103.23	74.30	154.69	23.07	76.29

Para demostrar que el pretratamiento elegido tuvo un efecto significativo en los residuos agroindustriales se presentan las gráficas 5.26 y 5.27 donde se muestra la eficiencia de una hidrólisis enzimática en una biomasa sin pretratar contra una que si fue pretratada. Los pretratamientos presentados en cada gráfica son los que fueron seleccionados por tener las condiciones más adecuadas para la hidrólisis enzimática, se puede observar una importante mejoría en la obtención de carbohidratos.

Gráfica 5.26: Comparación de la eficiencia de la corona de la piña con y sin pretratamiento.



Gráfica 5.27: Comparación de la eficiencia en el residuo del nopal con y sin pretratamiento.



La elección del pretratamiento adecuado en ambos residuos lignocelulósicos tiene un efecto específico en la eficiencia de una hidrólisis enzimática para la obtención de la mayor cantidad de azúcares potencialmente fermentables, si este no se escoge de manera adecuada los resultados no serán satisfactorios. Es fundamental tener en cuenta el origen de la biomasa a pretratar así como la viabilidad tanto química como económica que implica utilizar algún pretratamiento ya que debe ser factible económicamente para poder ser aplicado a grandes escalas.

## 6. CONCLUSIONES

Mediante un diseño de experimentos factorial completo  $2^3$ , se indagaron las condiciones óptimas para aplicar un pretratamiento hidrotérmico/alcalino a la corona de la piña y el residuo del nopal y así obtener el mayor eficiencia de deslignificación ocasionando el aumento a la susceptibilidad de una hidrólisis enzimática, esto dentro del dominio experimental. Las condiciones seleccionadas después del proceso experimental son: 10 minutos, 140 °C y una concentración de 1.5 % p/V de NaOH, las cuales son favorables para ambos materiales.

Los resultados obtenidos bajo las condiciones seleccionada en el pretratamiento fueron para la corona de piña una deslignificación del 47.86 % y en el residuo del nopal se logró el 39.64 % de deslignificación.

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática en ambos materiales pretratados; en la corona de piña que se hidrolizó con el cóctel E7 se obtuvo el 41.52 % p/p de azúcares potencialmente fermentables (glucosa, galactosa y sacarosa) y en la hidrólisis con el cóctel E9 el 66.27 % p/p (glucosa y sacarosa) los cuales fueron los mejores resultados entre las dos enzimas utilizadas, mientras que en el residuo del nopal se consiguió el 13.23 % p/p solo de glucosa.

En ambos materiales se obtuvieron resultados favorables en la sacarificación después de aplicar el pretratamiento, ya que en comparación con la hidrólisis enzimática del material sin pretratar hubo un aumento en la obtención de AT como se presentan en las gráficas 6.27 y 6.28. En la corona de piña se obtuvo un incremento en el cóctel E7 del 48.95 % y 92.61 % con el cóctel E9, mientras que en el residuo del nopal del 46.46 %.

En ambos materiales, la presencia de celobiosa obtenida en la sacarificación con el cóctel E7 después del pretratamiento, confirma una hidrólisis incompleta. Se sugiere estudiar esta hidrólisis enzimática en un intervalo de

tiempo mayor a una hora después de aplicar el pretratamiento en las condiciones seleccionadas.

Con el propósito de tener puntos de control, el licor obtenido del pretratamiento fue retirado de la biomasa antes de ser sacarificada, sin embargo para futuras pruebas es recomendado incluir el jarabe, sobretodo en el caso del residuo del nopal en donde en algunas pruebas se presentó el mucilago, de esta forma se podrán obtener los glúcidos que conforman a este polímero y llevar a cabo la hidrólisis de los AT que presenta el líquido filtrado.

Como se puede observar en el caso de la corona de la piña, no necesariamente las condiciones adecuadas para la deslignificación fueron seleccionadas como las condiciones óptimas para llevar a cabo en la sacarificación debido a que es importante enfocar el estudio hacia la obtención de la mayor cantidad de azúcares potencialmente fermentables.

Los dos materiales presentaron un sobrerendimiento en la cuantificación de azúcares después de ser pretratados y sacarificados, esto en comparación a las cantidades que se obtuvieron en la caracterización del material, la causa es que la digestión ácida es un método excesivamente agresivo para estos materiales lo que provoca la degradación de las pentosas y hexosa a furfural, HMF, ácido fórmico, ácido levulínico y ácido acético. Se sugiere la reevaluación de la técnica utilizada para la caracterización de este tipo de materiales ya que como se observó durante el estudio estos dos materiales no son recalcitrantes para la obtención de azúcares.

Someter a la corona de piña y al residuo del nopal a un pretratamiento, incrementa de manera potencial el rendimiento de azúcares fermentables. Además se puede observar la gran biodisponibilidad de ambos materiales para la obtención de azúcares siendo de esta forma candidatos para la producción de bioetanol carburante.



## BIBLIOGRAFÍA

Adler, E. (1977). Lignin chemistry - past, present and future. En: *Wood Science and Technology*, 11, pp. 169-218.

Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M. y Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. En: *Bioresourcse Technology*, 101 (13), pp. 4851-4861.

Barrera, I. C.; Gualo, N. y Aburto, J. A. (2012). *Manual e técnicas analíticas para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos*. Instituto Mexicano del Petróleo. Distrito Federal, México.

Banco Nacional de Desarrollo Económico y Social (BNDES), y Centro de Gestión y Estudios Estratégicos (CGEE) (2008). *Bioetanol de Caña de Azúcar. Energía para el Desarrollo Sostenible. Banco Nacional de Desenvolvimento Económico y Social (BNDES)* [versión electrónica]. Río de Janeiro, Brasil. pp. 39-65. Consultado el 12 de enero de 2015. Disponible en: [http://www.cggee.org.br/arquivos/bioetanol\\_esp.pdf?idProduto=4809](http://www.cggee.org.br/arquivos/bioetanol_esp.pdf?idProduto=4809).

Brodeur, G.; Yau, E.; Badal, K., et. al. (2011). Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. En: *Enzyme Research*, 2011, pp. 1-17.

Carreón, O. E.; Ramos, A. S.; Centeno, S., et. al. (2009). Etanol Carburante [versión electrónica]. En: *BioTecnología*, 13 (3), pp. 79-102. Consultado el 22 de septiembre de 2014. Disponible en: [http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2009\\_3/Etanol\\_Carburante.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Etanol_Carburante.pdf).

Chundawat, S.; Beckhman, G. T.; Himmel, M. E. y Dale, B. (2011). Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuel and Chemicals [versión electrónica]. En:

*Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2 (6), pp. 1-25.  
Consultado el 1 de septiembre de 2014. Disponible en:  
[http://bioenergycenter.org/besc/publications/chundawat\\_deconstruction.pdf](http://bioenergycenter.org/besc/publications/chundawat_deconstruction.pdf).

Diez, F.; Garrido, N. (2008). *Bagazo de caña de azúcar: ¿energía o etanol carburante? Dos casos de estudio*. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). La Habana, Cuba.  
Consultado el 4 de septiembre de 2014. Disponible en:  
<http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar31/HTML/Articulo02N.htm>.

Donoheo, B. S.; Decker, S. R.; Tucker, M. P. *et. al.* (2008) Visualizing Lignin Coalescence and Migration Through Maize Cell Walls Following Thermochemical Pretreatment. En: *Biotechnology and Bioengineering*. 101 (5), pp. 913-925.

Esquivel, P. (2004). Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima [versión electrónica]. En: *Agronomía Mesoamericana*, 15 (2), pp. 215-219.  
Consultado el 20 de septiembre de 2014. Disponible en:  
[http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v15n02\\_215.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v15n02_215.pdf).

Ferré, J. (2004). Diseño factorial completo 2k. En: *Técnicas de Laboratorio*. (pp. 434-445). España. Editorial Pública, S.A.

Guzmán, N. I. (2013). *Evaluación del pretratamiento químico y biológico de substratos lignocelulósicos en la obtención de azúcares fermentables*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Morelos. Morelos, México.

Gomis, V. (2008). Tema 2. Cromatografía: principios generales y Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. En: *Técnicas Instrumentales*

en el *Análisis Industrial* [versión electrónica]. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Alicante. España. pp. 1-16. Consultado el 21 de julio de 2014. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10045/8246>.

Hahn-Hägerdal, B.; Himmel, M. E.; Somerville, C. y Wyman, C. (2008). Welcome to Biotechnology for fuel. En: *Biotechnology for biofuels*, 1, pp. 1-4.

Hendriks, A.; Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. En: *Bioresource Technology*, 100 (1), pp. 10-18.

Hernández, M. (1997). *Decoloración de efluentes alcalinos de industrias papeleras por Streptomyces spp.,: aspectos químicos y enzimáticos*. Tesis doctoral. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid, España.

Hernández, M. (2008). *Elaboración y caracterización del papel artesanal de la corona del fruto de dos variedades de piña Ananas comosus (L.) Merr.* Tesis de Licenciatura. Universidad de Chapingo. Estado de México, México.

Higuchi, T. (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. En: *Wood Science and Technology*, 24, pp. 23-63.

Ibbett, R.; Gaddipati, S.; Hill, S. y Tucker, G. (2013). Structural reorganisation of cellulose fibrils in hydrothermally deconstructed lignocellulosic biomass and relationships with enzyme digestibility [versión electrónica]. En: *Biotechnology for Biofuels*, 6 (33), pp. 1-15. Consultado el 16 de agosto de 2014. Disponible en: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/pdf/1754-6834-6-33.pdf>.

Iturbe, F. y Sandoval, J. (2013). *Análisis de alimentos, fundamentos y técnicas*. Departamento de alimentos y biotecnología. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Mata, T. M.; Martins, A. y Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. En: *Renewable and Sustainable Energy Review*, 14 (1), pp. 217-232.
- McMurry, J. (2008). *Química orgánica* (7a ed.). Pp. 99-100. México: Ediciones Cengage Learning.
- Malainine, M. E.; Dufresne, A.; Vignon, M. R. y Mahrouz, M. (2003). First evidence for the presence of weddellite crystallites in *Opuntia ficus-indica* parenchyma. En: *Z. Naturforsch. C*, 58, pp. 812-815.
- Montgomery, D. (2014). *Diseño y análisis de experimentos* (2da ed.). México: Ediciones Limusa Wiley.
- Nielsen, S. (2007). *Análisis de los alimentos: manual de laboratorio* (2da ed.). España: Ediciones Zaragoza Acribia.
- Olivares, A.; Toxqui, S. y Padilla, A. L. (2012). Nopal Cactus (*Opuntia Ficus-Indica*) as a Holographic Material. En: *Journal Materials*. 5, pp 2383-2402.
- Olivia, J. (2003). *Efecto de los productos de los Productos de Degradación Originados en la Explosión por vapor de Biomasa de Chopo sobre Kleuveromyces marxianus* [versión electrónica]. Tesis Doctoral Facultad de Ciencia biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. Consultado el 31 de julio de 2014. Disponible en: <http://www.ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucm-t26833.pdf>.
- PEMEX. (2013). *Principales Elementos del Plan de Negocios de Petróleos Mexicanos y sus Organismos Subsidiarios 2014-2018* [versión electrónica]. Petróleos Mexicanos. Distrito Federal, México. Consultado el 20 de julio de

2014. Disponible en:  
[http://www.pemex.com/acerca/informes\\_publicaciones/Documents/pn\\_14-18\\_131031.pdf](http://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Documents/pn_14-18_131031.pdf).

Peña, A.; Cervera, E. y Labastida, C. (2011). *Colección de Ejercicios de Análisis Cuantitativo por Cromatografía de Gases*. Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, UNAM. Distrito Federal, México. Ediciones Comité Editorial de la Facultad de Química.

Quesada, K.; Alvarado P.; Sibaja, R. *et. al.* (2005). Utilización de las fibras del rastrojo de piña (*Ananas comusus*, variedad *champaka*) como material de refuerzo en resinas de poliéster. En: *Revista Iberoamericana de polímeros*. 6, pp.157-179.

Quiroz, R. E.; Pérez, N.; Martínez, C.; Acosta, L. y Folch, J. (2011). Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. En: *Biodegradation*, 22 (3), pp. 565-572.

Ritter, S. (2011). Race to The Pump: Biofuel technologies vie to provide a sustainable supply of transportation fuels [versión electrónica]. En: *Chemical & Engineering News*. 89, pp 11-17. Consultado el 28 de agosto de 2014. Disponible en: <https://pubs.acs.org/cen/coverstory/89/8907cover.html>.

SAGARPA (2011). *Bioetanol: Fuentes de la que puede producirse* [versión electrónica]. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Distrito Federa, México. Consultado el 1 de septiembre de 2014. Disponible en:  
<http://www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/bioetanol/fuentes-de-als-que-puede-producirse>.

Sánchez, O. y Cardona, C. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Department of Chemical Engineering, National University of Colombia. En: *Bioresource Technology*, 99, pp. 5270-5290.

SENER (2006). *Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México*. SENER/BID/GTZ (Edit.) [versión electrónica]. Secretaría de Energía. Distrito Federal, México. Consultado el 28 de agosto de 2014. Disponible en: [http://www.sener.gob.mx/res/PE\\_y\\_DT/pub/Biocombustibles\\_en\\_Mexico\\_Estudio\\_Completo.pdf](http://www.sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf).

SENER (2010). *Recomendaciones de especificaciones técnicas para el etanol y mezclas (E6), y la infraestructura para su manejo en México* [versión electrónica]. Secretaría de Energía. Distrito Federal, México. Consultado el 29 de agosto de 2014. Disponible en: [http://beta.energia.gob.mx/res/169/sp\\_RecomendacionesTecEtanolMezclas.pdf](http://beta.energia.gob.mx/res/169/sp_RecomendacionesTecEtanolMezclas.pdf).

SENER (2012). *Prospectiva de energías renovables 2012-2026* [versión electrónica]. Secretaría de Energía. Distrito Federal, México. Consultado el 26 de agosto de 2014. Disponible en: [http://sener.gob.mx/res/PE\\_y\\_DT/pub/2012/PER\\_2012-2026.pdf](http://sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/2012/PER_2012-2026.pdf).

Sluiter, A.; Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Croker, D. (2011). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). En: *Technical Report, National Renewable Energy Laboratory /TP*.

- Stintzing, F. y Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia spp.*): A review on their chemistry, technology, and uses. En: *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, pp. 175-194.
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. En: *Bioresourcse Technology*, 83, pp. 1-11.
- Trajano, H. L.; Engle, N. L.; Foston, M., *et. al.* (2013) The fate of lignin during hydrothermal pretreatment [versión electrónica]. En: *Biotechnology for Biofuels*, 6 (110), pp. 1-27. Consultado el 20 de julio de 2014. Disponible en: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/110>.
- Vázquez, T. R. (2012). *Evaluación de la hidrólisis enzimática de bagazo de sorgo para la obtención de Azúcares fermentables a etanol y efecto de diferentes pretratamientos*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Yang, B.; Wyman, C. E. (2008). Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. University of California. En: *Biofuels, bioproducts and biorefining*, 2, pp. 26-40.
- Zheng, Y. Z.; Lin, H. y Tsao G.T. (1998). Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. En: *Biotechnology Progress*, 14, pp. 890-896.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Composición de la corona de piña en base seca [Quesada et al., 2005].

Tabla 1.2: Composición del cladodio del nopal [Malainine et al., 2003].

Tabla 1.3: Potencial productivo de cultivos aptos para la producción de biocombustibles (Miles de hectáreas).

Tabla 4.1: Constante de absortividad para medir lignina soluble al ácido para distintos tipos de biomasa [Sluiter et al., 2011].

Tabla 4.2: Condiciones usadas en el HPLC durante el estudio al inicio.

Tabla 4.3: Condiciones usadas en el HPLC durante el estudio después del cambio de columna.

Tabla 4.4: Cantidad de AT, AR y el perfil de HPLC presentes en los cocteles enzimáticos E6, E7, E9 y E10.

Tabla 4.5: Variables independientes del diseño factorial completo utilizadas en el pretratamiento alcalino para la corona de la piña y el residuo del nopal.

Tabla 4.6: Aleatorización de las pruebas del diseño factorial completo y tres puntos centrales para el pretratamiento alcalino de los residuos agroindustriales.

Tabla 5.1: Porcentaje de humedad contenido en el material lignocelulósico fresco y seco.

Tabla 5.2: Contenido de azúcares solubles presentes en el agua de lavado del material lignocelulósico.

Tabla 5.3: Concentración de cenizas obtenidas del sólido remanente de la digestión ácida del material lignocelulósico.

Tabla 5.4: Concentración de lignina insoluble en ácido obtenido del sólido remanente de la digestión ácida del material lignocelulósico.

Tabla 5.5: Concentración de lignina soluble en ácido obtenido en el licor de la digestión ácida del material lignocelulósico.

Tabla 5.6: Concentración de lignina total del material lignocelulósico.

Tabla 5.7: Contenido de AT y AR presentes en el licor de la digestión ácida de la biomasa. Los resultados se muestran con corrección anhidra y la sustracción de los azúcares solubles.



Tabla 5.8: Perfil de carbohidratos obtenidos del licor de la digestión ácida del material lignocelulósico.

Tabla 5.9: Contenido de AR y AT presentes en el jarabe de la hidrólisis enzimática de la corona de piña y el residuo del nopal sin pretratar.

Tabla 5.10: Presión absoluta del sistema a las temperaturas de trabajo del pretratamiento en ambos materiales.

Tabla 5.11: Dominio experimental decodificado del pretratamiento hidrotérmico/alcalino, contenido de lignina soluble y azúcares totales de ambos materiales posterior al pretratamiento.

Tabla 5.12: Coeficientes de regresión lineal del modelo  $y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{1*2}X_{1*2} + \beta_{1*3}X_{1*3} + \beta_{2*3}X_{2*3} + \beta_{1*2*3}X_{1*2*3}$ . \* Con un 95% de confianza y \*\*con un 90% de confianza. Los efectos significativos se encuentran resaltados.

Tabla 5.13: Cantidad de azúcares totales y azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis enzimática en la biomasa pretratada con los cocteles comerciales.

Tabla 5.14: Coeficientes de regresión lineal del modelo  $y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{1*2}X_{1*2} + \beta_{1*3}X_{1*3} + \beta_{2*3}X_{2*3} + \beta_{1*2*3}X_{1*2*3}$ . \* Con un 95% de confianza. Los efectos significativos se encuentran resaltados.

Tabla 5.15: Perfil de carbohidratos obtenidos después de sacarificación con el cóctel E7 la Corona de la piña pretratada.

Tabla 5.16: Perfil de carbohidratos obtenidos después de sacarificación con el cóctel E9 la Corona de la piña pretratada.

Tabla 5.17: Perfil de carbohidratos obtenidos después de sacarificación con el cóctel E7 en el residuo del nopal pretratado.

Tabla 5.18: Cantidad de azúcares totales obtenidos en los licores del pretratamiento y sacarificación con el cóctel E7 y E9 de la corona de la piña y de la sacarificación con el cóctel E7 en el residuo del nopal.

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1.1: Reservas de hidrocarburos totales (MMbpc) [PEMEX, 2013].

**Gráfica 1.2:** Producción de piña en México en el 2013. [Tomado y modificado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>].

**Gráfica 1.3:** Producción de nopal en México en el 2013. [Tomado y modificado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>].

**Gráfico 1.4:** Producción de biocombustibles durante el 2011 [SENER, 2012].

**Gráfico 4.1:** Espectros UV-vis de diferentes materiales lignocelulosicos obtenidos en el equipo de trabajo.

**Gráfica 5.1:** Espectro UV-vis de la corona de piña para la determinación de LSA.

**Gráfica 5.2:** Espectro UV-vis del residuo de nopal para la determinación de LSA.

**Gráfica 5.3:** Caracterización de la corona de la piña. Contenido de lignina, azúcares totales, reductores y cenizas.

**Gráfica 5.4:** Caracterización del residuo del nopal. Contenido de lignina, azúcares totales, reductores y cenizas.

**Gráfica 5.5:** Eficiencia de la hidrolisis enzimática en la corona de la piña sin pretratar.

**Gráfica 5.6:** Eficiencia de la hidrólisis enzimática en el residuo del nopal sin pretratar.

**Gráfica 5.7:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en la corona de la piña sobre el contenido de lignina (% p/p) a 0 % de NaOH.

**Gráfica 5.8:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en la corona de la piña sobre el contenido de lignina (% p/p) a 0.75 % de NaOH.

**Gráfica 5.9:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en la corona de la piña sobre el contenido de lignina (% p/p) a 1.5 % de NaOH.

**Gráfica 5.10:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en la corona de la piña sobre el contenido de azúcares totales (% p/p) a 0 % de NaOH.

**Gráfica 5.11:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 0 % de NaOH.

**Gráfica 5.12:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 0.75 % de NaOH.

**Gráfica 5.13:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 1.5 % de NaOH.

- Gráfica 5.14:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 10 min.
- Gráfica 5.15:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 20 min.
- Gráfica 5.16:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo del nopal sobre el contenido de lignina (% p/p) a 30 min.
- Gráfica 5.17:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.
- Gráfica 5.18:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0.75 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.
- Gráfica 5.19:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 1.5 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.
- Gráfica 5.20:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E9.
- Gráfica 5.21:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0.75 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E9.
- Gráfica 5.22:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 1.5 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en la corona de piña posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E9.
- Gráfica 5.23:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en el residuo del nopal posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.
- Gráfica 5.24:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 0.75 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en el residuo del nopal posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.

**Gráfica 5.25:** Efecto del pretratamiento hidrotérmico/alcalino a 1.5 % p/V de NaOH en la cantidad de AR generados en el residuo del nopal posterior a la sacarificación con el cóctel enzimático E7.

**Gráfica 5.26:** Comparación de la eficiencia de la corona de la piña con y sin pretratamiento.

**Gráfica 5.27:** Comparación de la eficiencia en el residuo del nopal con y sin pretratamiento.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Diferentes materiales usados para la obtención de biocombustibles [Ritter, 2011].

Figura 1.2: Diagrama general para la obtención de bioetanol [Diez & Garrido, 2008].

Figura 1.3: Reacción fotosintética en presencia de luz solar.

Figura 1.4: Estructura primaria de la celulosa [Olivia, 2003]

Figura 1.5: Estructura del xilano con ramificaciones de arabinosa y glucosa [Guzmán, 2013].

Figura 1.6: Estructura del galactoglucomanano [Olivia, 2003].

Figura 1.7: Estructura de la lignina [Guzmán, 2013].

Figura 1.8: Alcoholes ciclámicos o monolignoles precursores de lignina [Olivia, 2003].

Figura 1.9: Estructura general de la pared celular [Chundawat et al., 2011]

Figura 1.10: Hidrólisis enzimática de la celulosa [Guzmán, 2013].

Figura 1.11: Plantación de piña en Veracruz.

Figura 1.12: Cultivo de nopal en Morelos.

Figura 4.1: Corona de piña (izquierda) y residuo de nopal (derecho) que fueron empleados para este trabajo. Ambos materiales en forma fresca.

Figura 4.2: Reacción de los carbohidratos con fenol y ácido sulfúrico.

Figura 4.3: Reacción de Carbohidratos con DNS.

Figura 4.4: Hidrólisis de carbohidratos.

Figura 4.5: Dominio experimental del diseño factorial completo  $2^3$  y distribución de las diferentes pruebas dentro de este.

Figura 5.1: Corona de piña y nopal secos con humedad menos al 10%. En esta presentación fueron usados para los trabajos de esta tesis.

Figura 5.2: Productos de la oxidación de la hemicelulosa y celulosa provenientes de la digestión ácida.

Figura 5.3: Licor obtenido después del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en las pruebas en el residuo agroindustrial. (Corona de la piña de izquierda a derecha prueba: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9(C), 10(C) y 11(C). Residuo del nopal de izquierda a derecha prueba: 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9(C), 10(C) y 11(C)).

Figura 5.4: Presencia de Licores obtenidos después del pretratamiento hidrotérmico/alcalino en el residuo agroindustrial.

Figura 5.5: Representación geométrica de las variables LS y AT, el modelo incluye los efectos de entre 2 y 3 variables. Los intervalos de confianza con el 95%\* y el 90%\*\* se muestran entre paréntesis.

Figura 5.6: Modelo del mecanismo de la formación de los agregados de lignina en la superficie de la biomasa [Donoheo et al., 2008].

## ANEXO A

### Espectrofotómetro UV-Vis

Tabla A1: Datos para la elaboración de la curva de calibración de glucosa para la determinación de AT por el método de Fenol-Sulfúrico.

Curva Patrón de Glucosa. Longitud de onda de lectura: 490 nm				
Tubo	Sol. de glucosa (µL)	Agua (µL)	Sol. Fenol al 5% (mL)	Ácido sulfúrico conc. (mL)
Blanco	---	1000	1	5
1	100	900	1	5
2	200	800	1	5
3	300	700	1	5
4	400	600	1	5
5	500	500	1	5
6	600	400	1	5
7	700	300	1	5
8	800	200	1	5
9	900	100	1	5
10	1000	---	1	5

Gráfica A1: Curva de calibración de glucosa para la determinación de AT elaborada por el método de Fenol-sulfúrico. Longitud de onda de lectura: 490 nm.

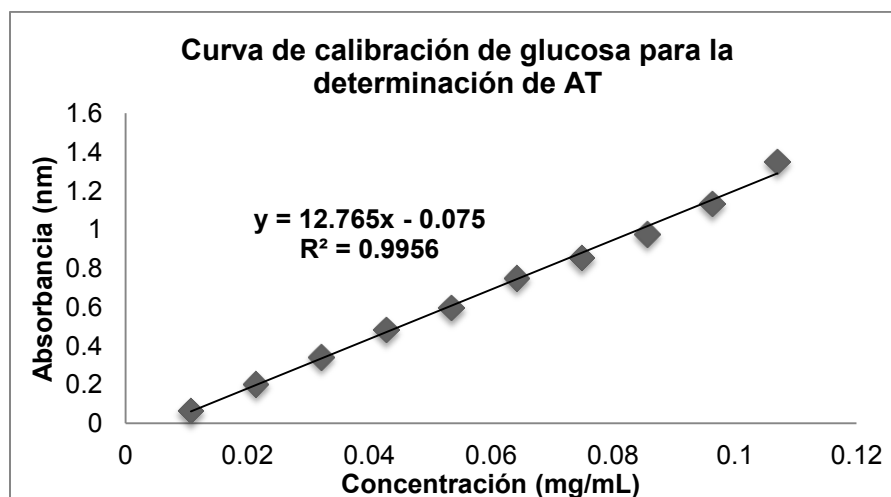


Tabla A2: Datos para la elaboración de la curva de calibración de glucosa para la determinación de AR por el método de DNS.

Curva Patrón de Glucosa. Longitud de onda de lectura: 540 nm			
Tubo	Sol. de glucosa (µL)	Agua (µL)	DNS (mL)
Blanco	---	1000	1
1	100	900	1
2	200	800	1
3	300	700	1
4	400	600	1
5	500	500	1
6	600	400	1
7	700	300	1
8	800	200	1
9	900	100	1
10	1000	---	1

Gráfica A2: Curva de calibración de glucosa para la determinación de AR elaborada por el método de DNS. Longitud de onda de lectura: 540nm.

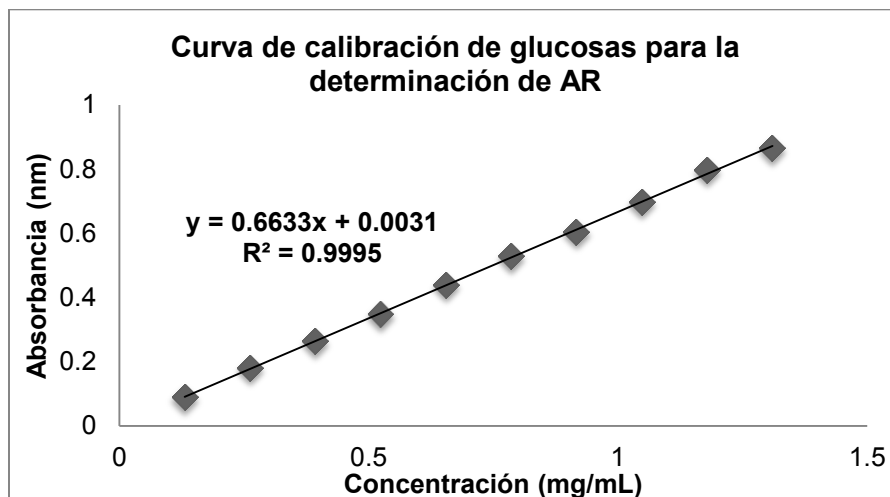
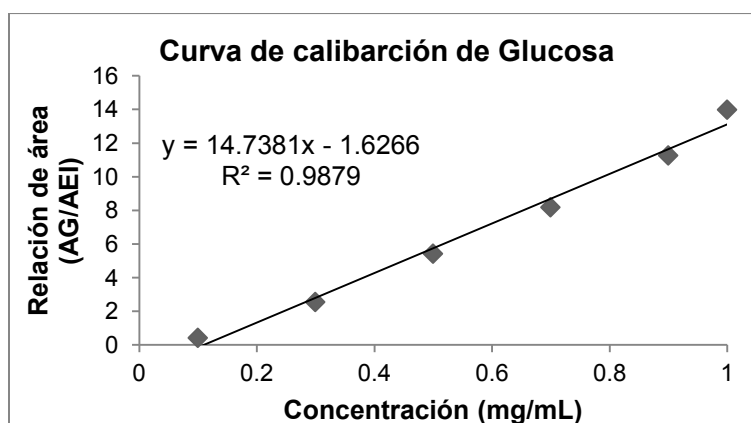


Tabla A3: HPLC. Tiempos de retención de los carbohidratos estándares

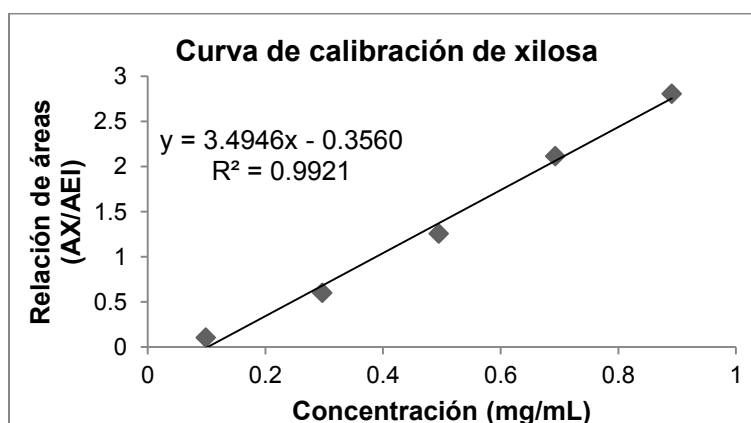
Carbohidratos	Tiempo de retención (min)
Xilosa	3.399
Fructosa	5.777
Manosa	6.371
Glucosa	6.73
Sacarosa	10.43 ó 13.08
Celobiosa	17.945
Maltosa	19.088

Gráficas A3-A9 curvas de calibración de los carbohidratos estándares elaboradas en el HPLC utilizados durante el estudio.

Gráfica A3. Curva de calibración de glucosa en el HPLC

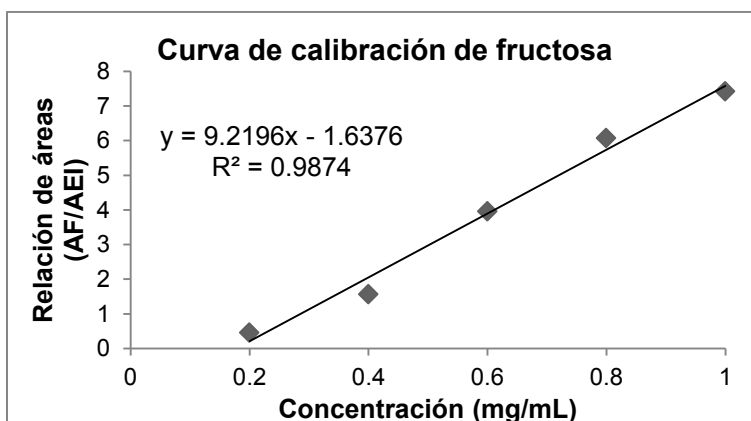


Gráfica A4. Curva de calibración de xilosa en el HPLC

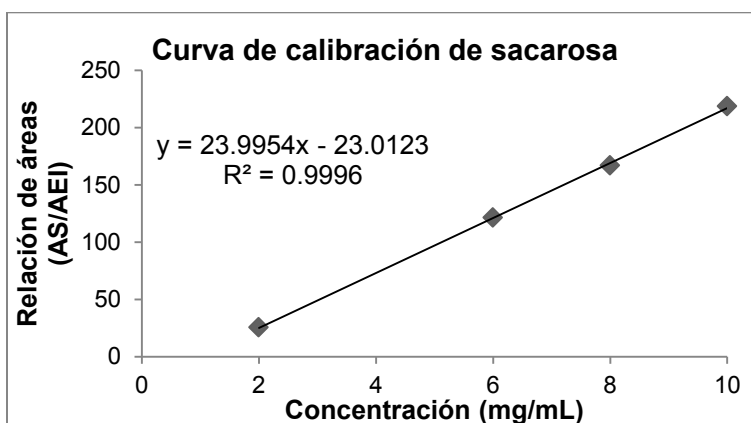




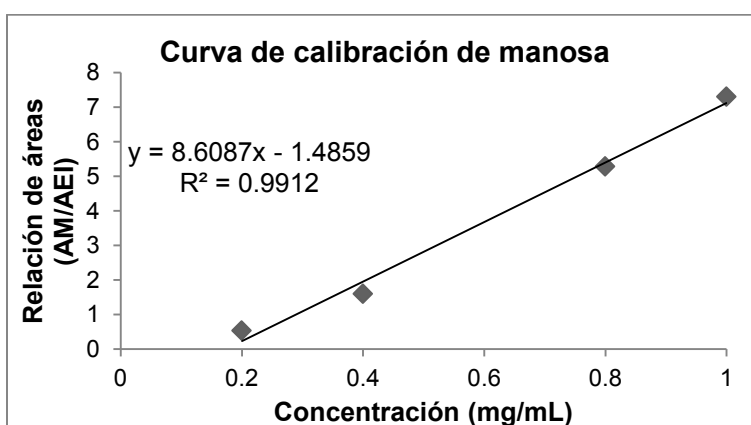
Gráfica A5. Curva de calibración de fructosa en el HPLC



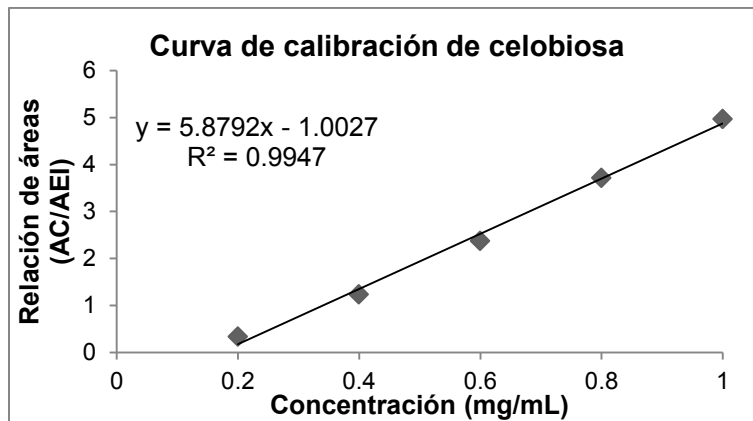
Gráfica A6. Curva de calibración de sacarosa en el HPLC



Gráfica A7. Curva de calibración de manosa en el HPLC



Gráfica A8. Curva de calibración de celobiosa en el HPLC



Gráfica A9. Curva de calibración de maltosa en el HPLC

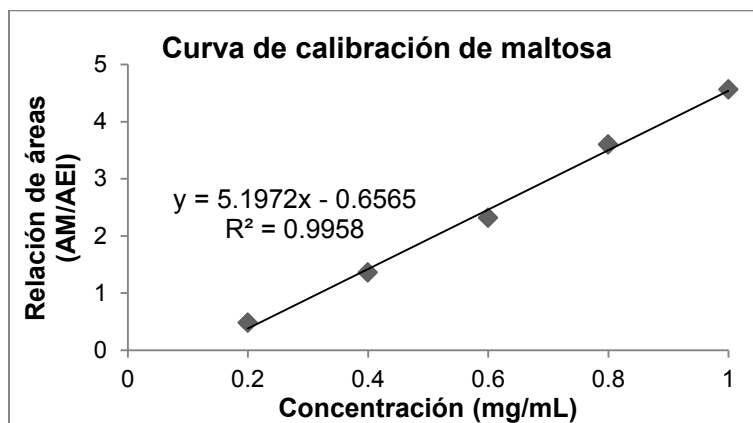
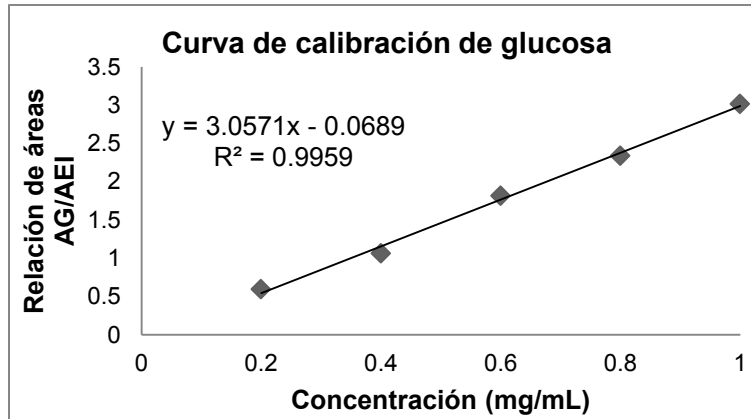


Tabla A4. Tiempos de retención de los carbohidratos estándares

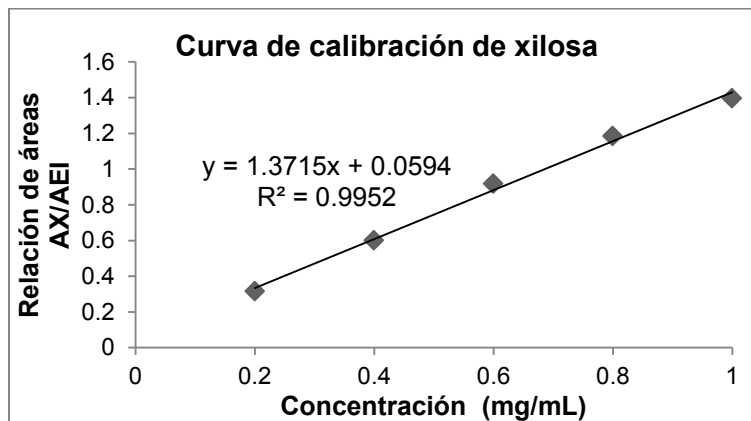
Carbohidratos	Tiempo de retención (min)
Xilosa	6.18
Fructosa	7.14
Manosa	7.37
Glucosa	7.70
Galactosa	8.02
Sacarosa	9.46
Celobiosa	10.42
Alanina	12.48

Gráficas A10-A16 curvas de calibración de los carbohidratos estándares elaboradas en el HPLC utilizados durante el estudio.

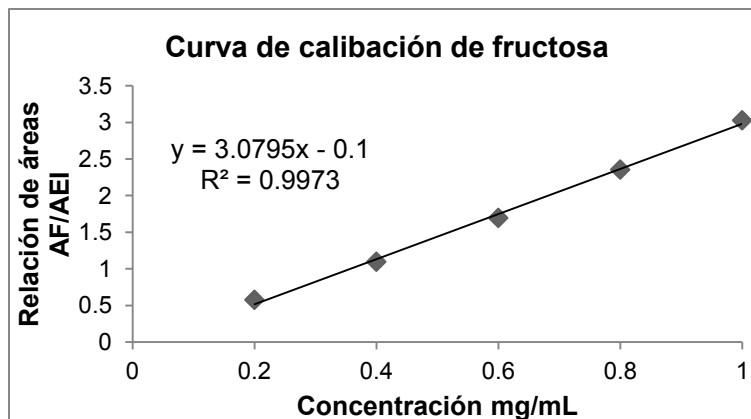
Gráfica A10. Curva de calibración de glucosa en el HPLC



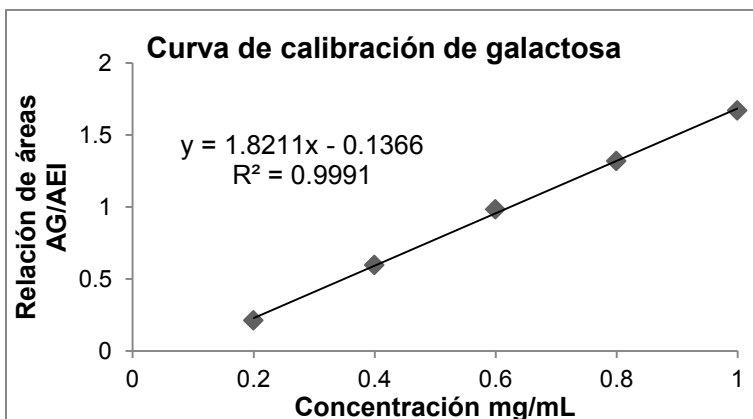
Gráfica A11. Curva de calibración de xilosa en el HPLC



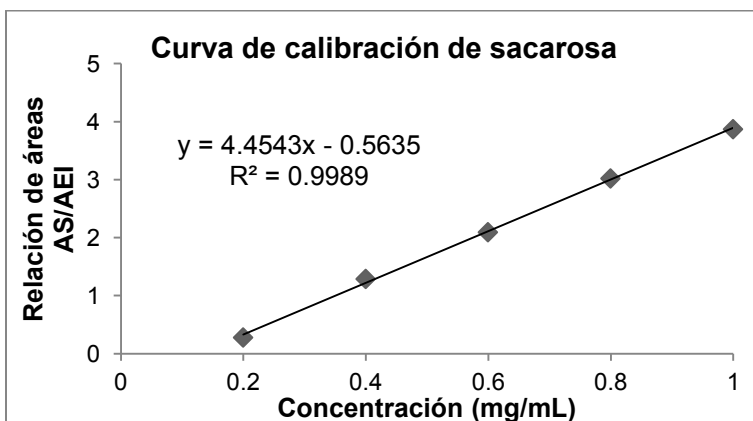
Gráfica A12. Curva de calibración de fructosa en el HPLC



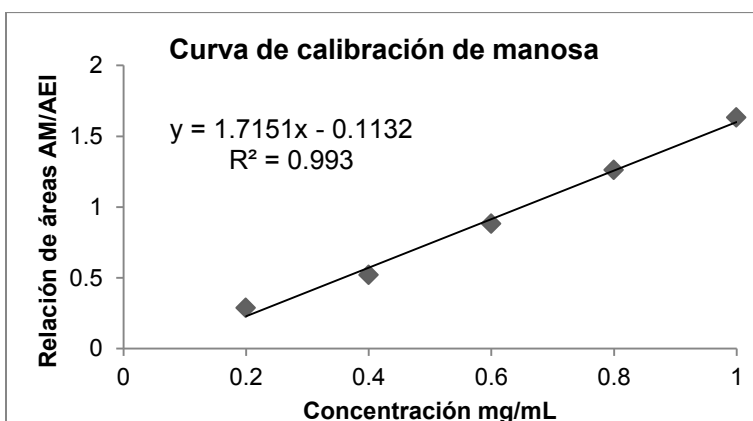
Gráfica A13. Curva de calibración de galactosa en el HPLC



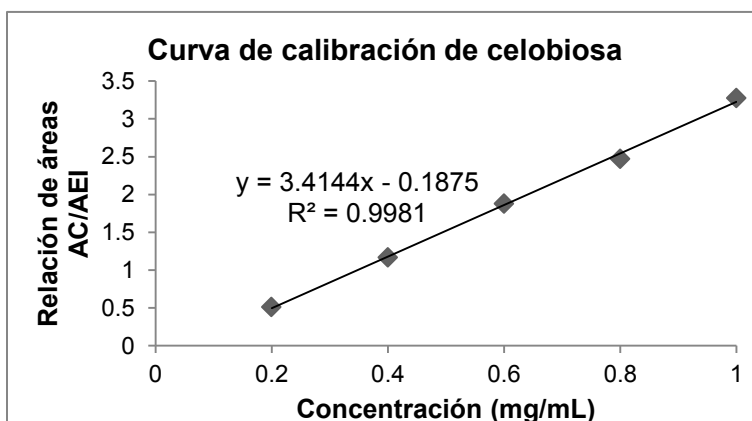
Gráfica A14. Curva de calibración de sacarosa en el HPLC



Gráfica A15. Curva de calibración de manosa en el HPLC



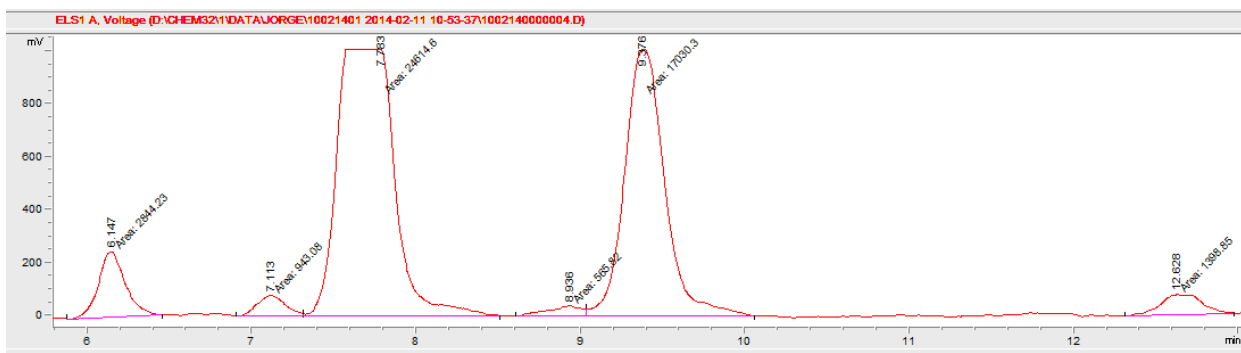
Gráfica A16. Curva de calibración de celobiosa en el HPLC



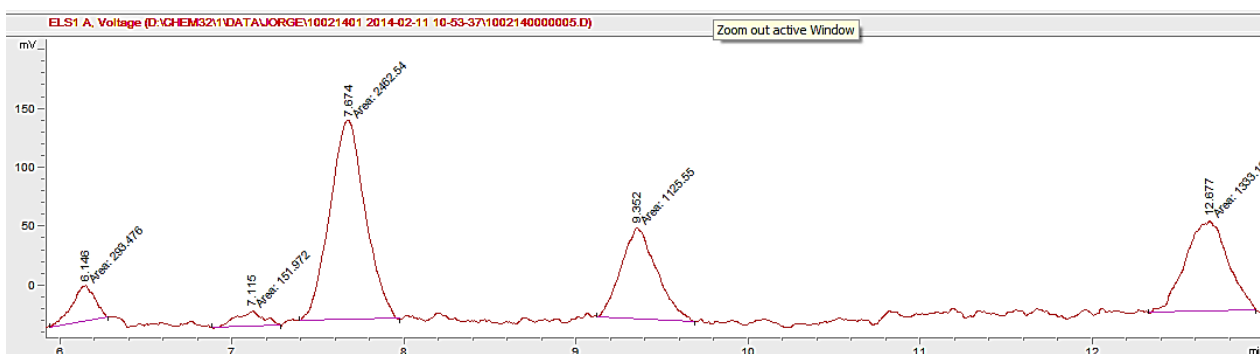
## ANEXO A.1

En este anexo se presentan ejemplos de los cromatogramas obtenidos durante el estudio.

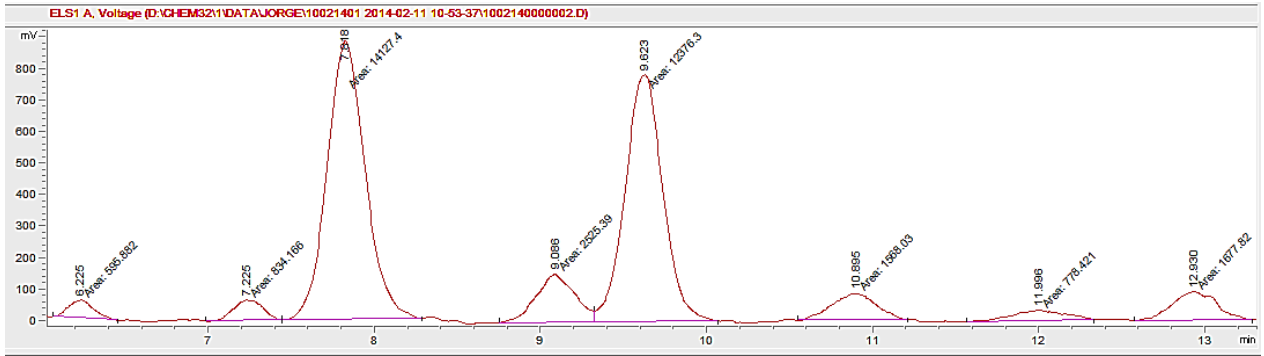
Cromatograma 1. Hidrolisis con el cóctel E9 de la corona de la piña pretratada en las condiciones de la prueba 4. Muestra concentrada.



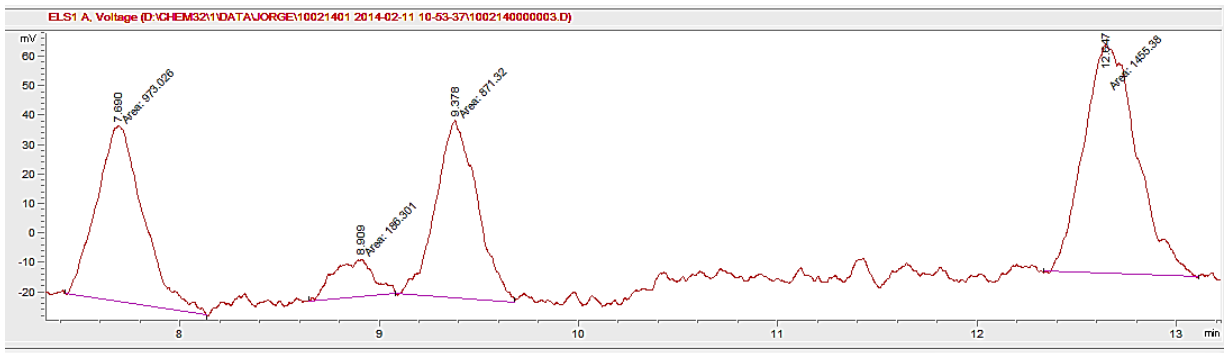
Cromatograma 2. Hidrolisis con el cóctel E9 de la corona de la piña pretratada en las condiciones de la prueba 4. Muestra diluida 1/10.



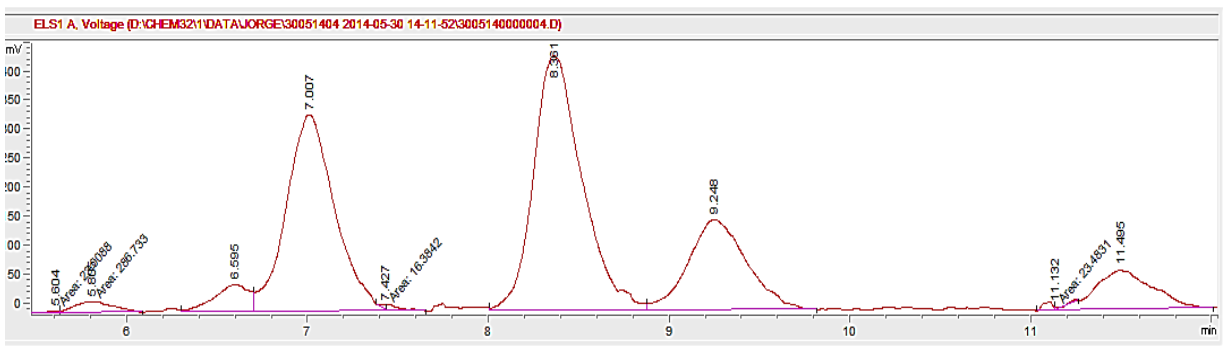
Cromatograma 3. Hidrolisis con el cóctel E7 de la corona de la piña pretratada en las condiciones de la prueba 4. Muestra concentrada.



Cromatograma 4. Hidrolisis con el cóctel E7 de la corona de la piña pretratada en las condiciones de la prueba 4. Muestra diluida 1/10.



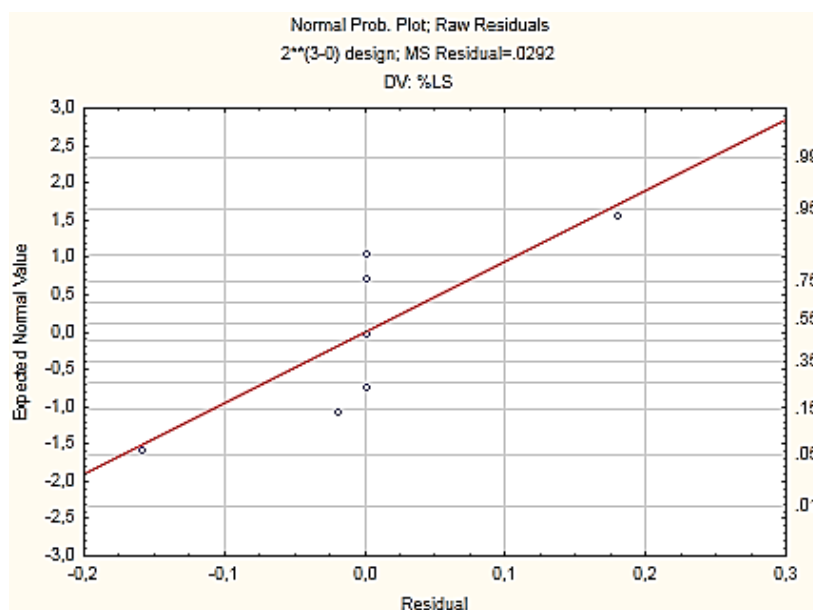
Cromatograma 5. Hidrolisis con el cóctel E7 del residuo del nopal pretratada en las condiciones de la prueba 4. Muestra concentrada.



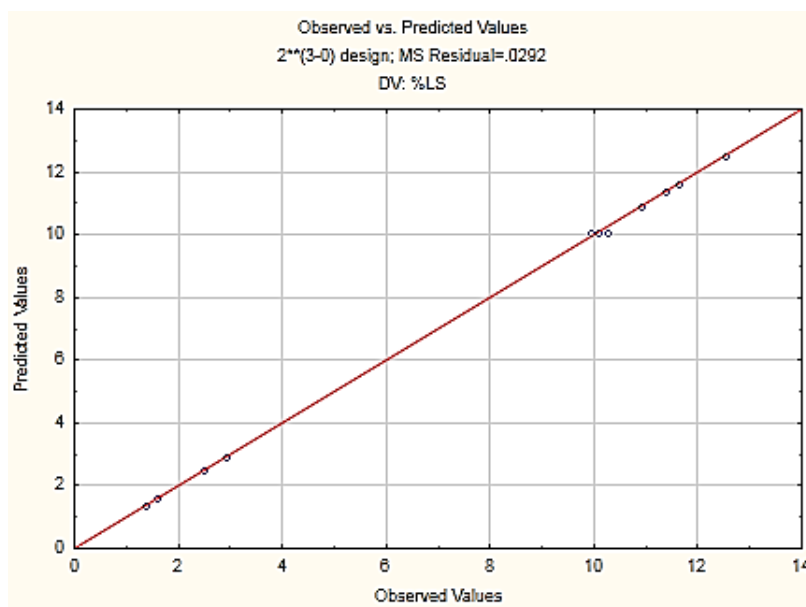
## ANEXO B

Análisis estadístico del diseño factorial completo del pretratamiento hidrotérmico/alcalino.

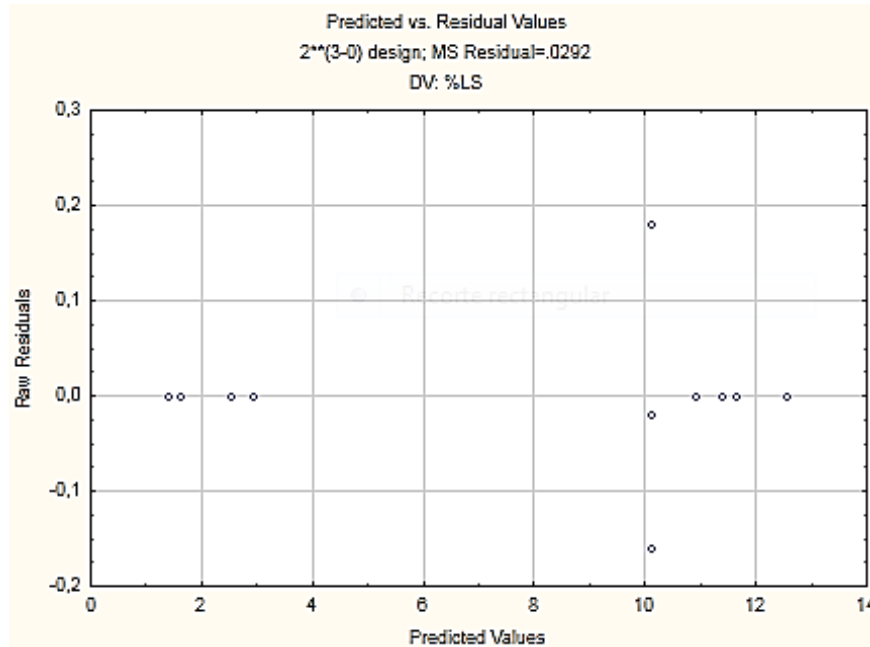
Gráfica B1: Probabilidad normal contra los residuales de lignina soluble en la corona de la piña obtenido del pretratamiento hidrotérmico/alcalino.



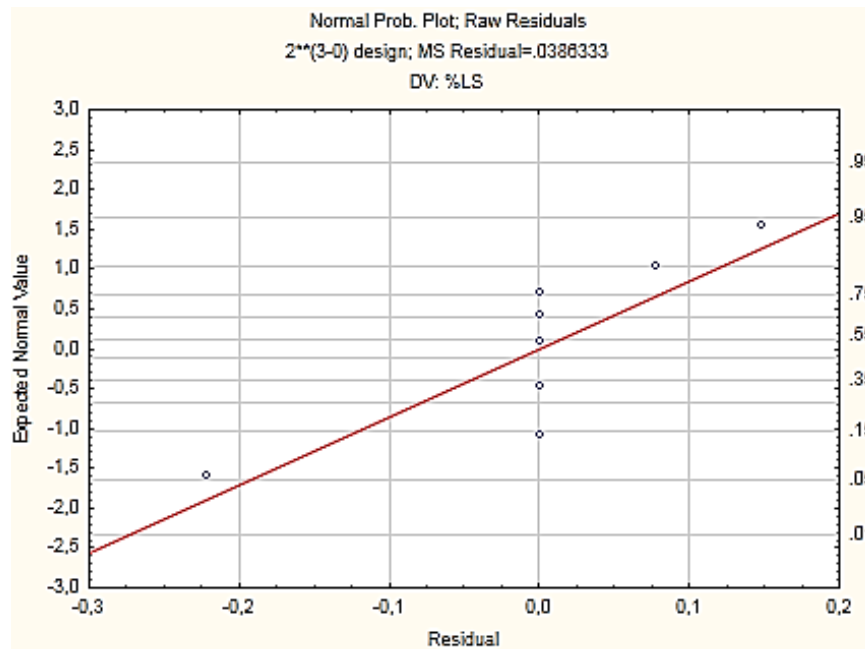
Gráfica B2: Valores predichos contra valores observados en lignina soluble en la corona de la piña obtenido del pretratamiento hidrotérmico/alcalino.



Gráfica B3: Residuales contra valores predichos de lignina soluble en la corona de la piña obtenido del pretratamiento hidrotérmico/alcalino.

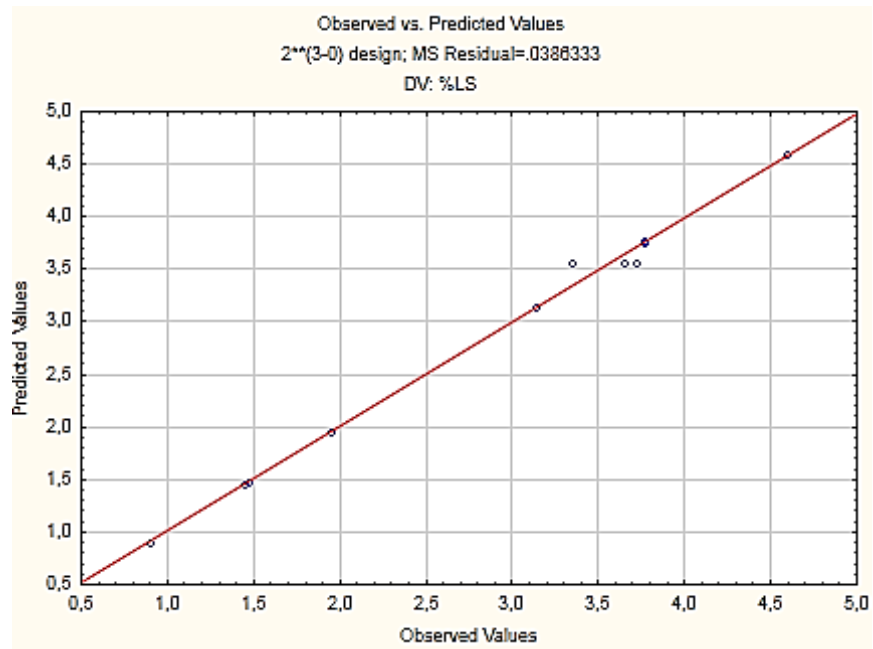


Gráfica B4: Probabilidad normal contra los residuales de lignina soluble en el residuo del nopal obtenido del pretratamiento hidrotérmico/alcalino.

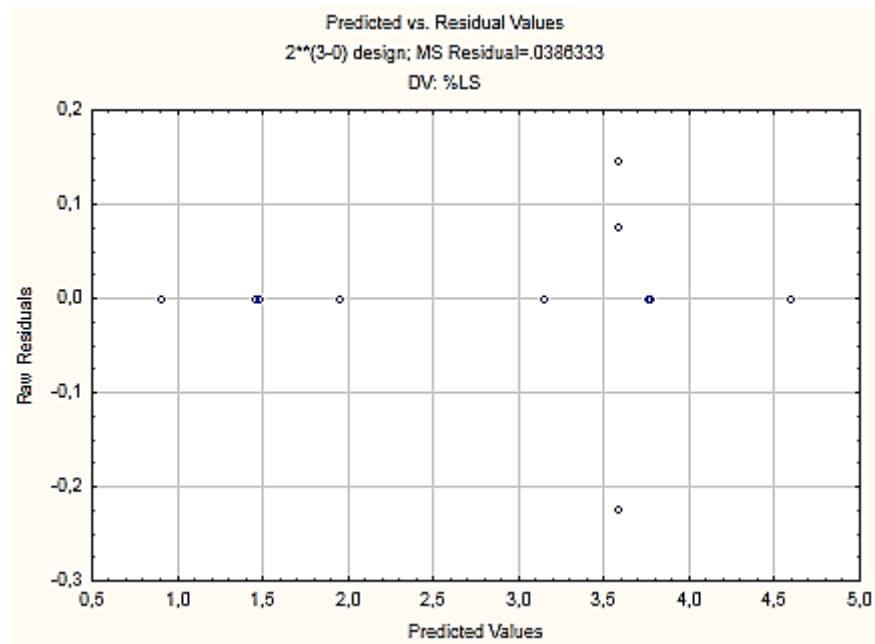




Gráfica B5: Valores predichos contra valores observados en lignina soluble en el residuo del nopal obtenido del pretratamiento hidrotérmico/alcalino.



Gráfica B6: Residuales contra valores predichos de lignina soluble en el residuo del nopal obtenido del pretratamiento hidrotérmico/alcalino.



Con el análisis de varianza (ANOVA) se puede aceptar o rechazar la hipótesis, donde:

- H0: hipótesis nula, no existe diferencia significativa entre los factores
- Ha: hipótesis alternativa, por lo menos un factor es diferente a los demás.

Utilizando el valor de F calculada (Fc) obtenido a partir del análisis y el valor de F crítica (F de tablas), Tomando en cuenta los grados de libertad entre tratamientos y del error, así se obtiene los límites de F valor crítica  $F_{(1,2)} = 18.51$ ;  $\alpha = 0.05$  [Montgomery, 2014], entonces si  $F_c > F$  crítica o  $\alpha > p$ , se rechaza la hipótesis nula, es decir, se acepta que existen una diferencia significativa entre los tratamientos.

A continuación se muestran los el análisis de varianza de las variables de respuesta en el diseño de experimentos con el pretratamiento hdrotérmico/alcalino.

Tabla B1. Análisis de varianza (ANOVA) para la lignina soluble en la corona de la piña. F valor crítico=  $F_{(1,2)} = 18.51$ ;  $\alpha = 0.05$ . Los valores resaltados representan los factores y/o interacciones con diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada (Fc)	P
(1) Tiempo (min)	<b>0.826</b>	<b>1</b>	<b>0.826</b>	<b>28.274</b>	<b>0.037</b>
(2) Temperatura (°C)	<b>1.836</b>	<b>1</b>	<b>1.834</b>	<b>62.795</b>	<b>0.016</b>
(3) [NaOH] %p/V	<b>180.975</b>	<b>1</b>	<b>180.975</b>	<b>6197.785</b>	<b>0.0002</b>
1*2	0.047	1	0.047	1.593	0.334
1*3	0.202	1	0.202	6.905	0.119
2*3	0.143	1	0.143	4.901	0.157
1*2*3	0.007	1	0.007	0.226	0.681
Error	0.058	2	0.029		
Total	206.941	10			

Tabla B2. Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de azúcares totales en la corona de la piña. F valor crítico= F (1,2) = 8.51;  $\alpha$ = 0.1 Los valores resaltados representan los factores y/o interacciones con diferencia significativa (significancia del 90%).

Factor	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada (Fc)	P
(1) Tiempo (min)	0.898	1	0.898	4.037	0.182
(2) Temperatura (°C)	1.312	1	1.312	5.900	0.136
(3) [NaOH] %p/V	0.925	1	0.925	4.158	0.178
1*2	0.205	1	0.205	0.921	0.439
1*3	0.106	1	0.106	0.476	0.562
2*3	0.024	1	0.024	0.109	0.773
1*2*3	<b>3.075</b>	<b>1</b>	<b>3.075</b>	<b>13.827</b>	<b>0.065</b>
Error	0.445	2	0.22		
Total	6.990	10			

Tabla B3. Análisis de varianza (ANOVA) para la lignina soluble en el residuo del nopal. F valor crítico= F (1,2) = 18.51;  $\alpha$ = 0.05. Los valores resaltados representan los factores y/o interacciones con diferencia significativa (significancia del 95%).

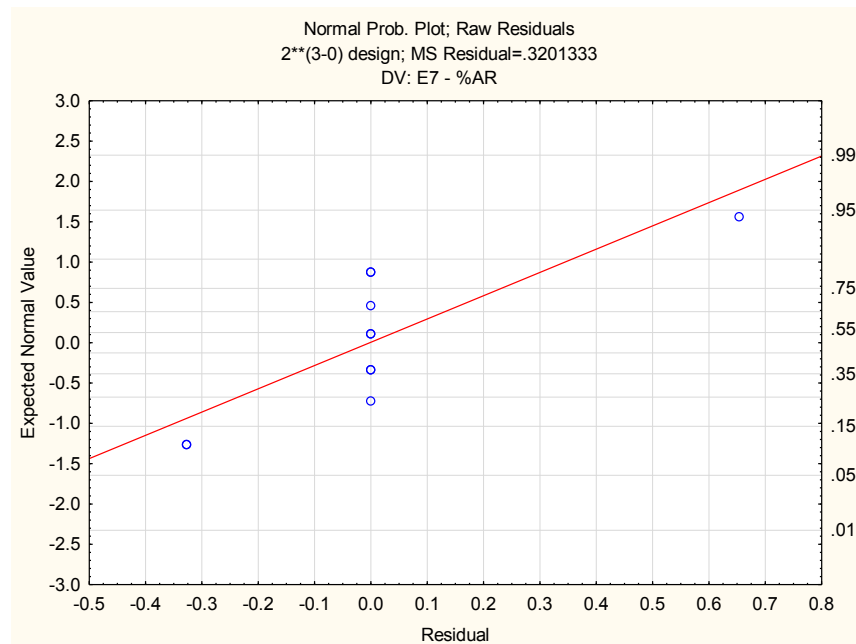
Factor	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada (Fc)	P
(1) Tiempo (min)	<b>1.777</b>	<b>1</b>	<b>1.777</b>	<b>45.987</b>	<b>0.021</b>
(2) Temperatura (°C)	<b>2.940</b>	<b>1</b>	<b>2.940</b>	<b>76.108</b>	<b>0.013</b>
(3) [NaOH] %p/V	<b>6.319</b>	<b>1</b>	<b>6.319</b>	<b>163.564</b>	<b>0.006</b>
1*2	0.202	1	0.202	5.219	0.150
1*3	0.293	1	0.293	7.574	0.111
2*3	0.021	1	0.021	0.544	0.538
1*2*3	<b>1.320</b>	<b>1</b>	<b>1.320</b>	<b>34.176</b>	<b>0.028</b>
Error	0.077	2	0.039		
Total	14.895	10			

Tabla B4. Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de azúcares totales en el residuo del nopal. F valor crítico= F (1,2) = 18.51;  $\alpha$ = 0.05. Los valores resaltados representan los factores y/o interacciones con diferencia significativa (significancia del 95%).

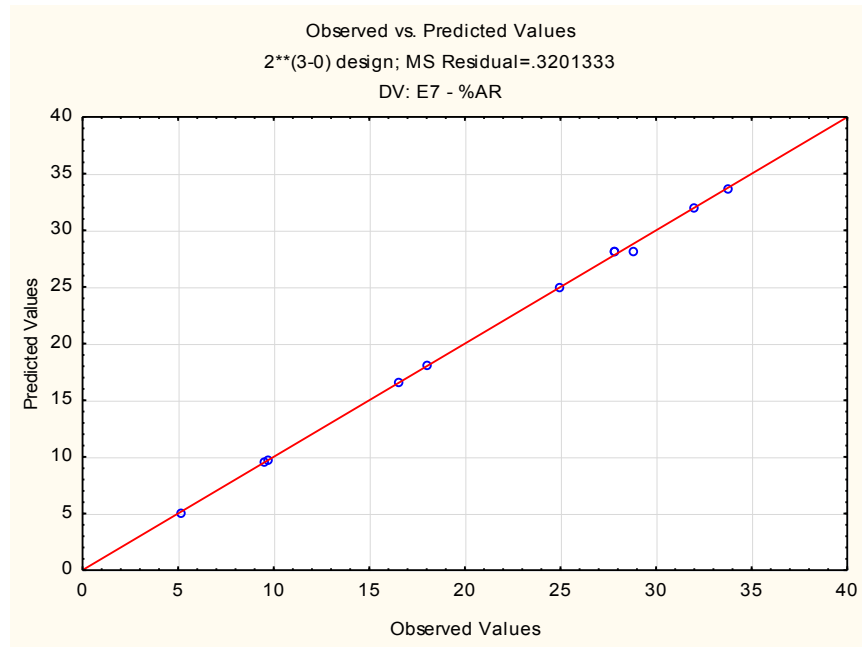
Factor	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada (Fc)	P
(1) Tiempo (min)	<b>9.074</b>	<b>1</b>	<b>9.074</b>	<b>282.380</b>	<b>0.004</b>
(2) Temperatura (°C)	<b>19.845</b>	<b>1</b>	<b>19.845</b>	<b>617.583</b>	<b>0.002</b>
(3) [NaOH] %p/V	<b>58.753</b>	<b>1</b>	<b>58.753</b>	<b>1828.407</b>	<b>0.001</b>
1*2	0.045	1	0.045	1.400	0.358
1*3	<b>24.500</b>	<b>1</b>	<b>24.500</b>	<b>762.448</b>	<b>0.001</b>
2*3	0.218	1	0.218	6.778	0.121
1*2*3	0.274	1	0.274	8.521	0.100
Error	0.064	2	0.032		
Total	112.773	10			

Análisis estadístico del diseño factorial completo de la biomasa pretratada.

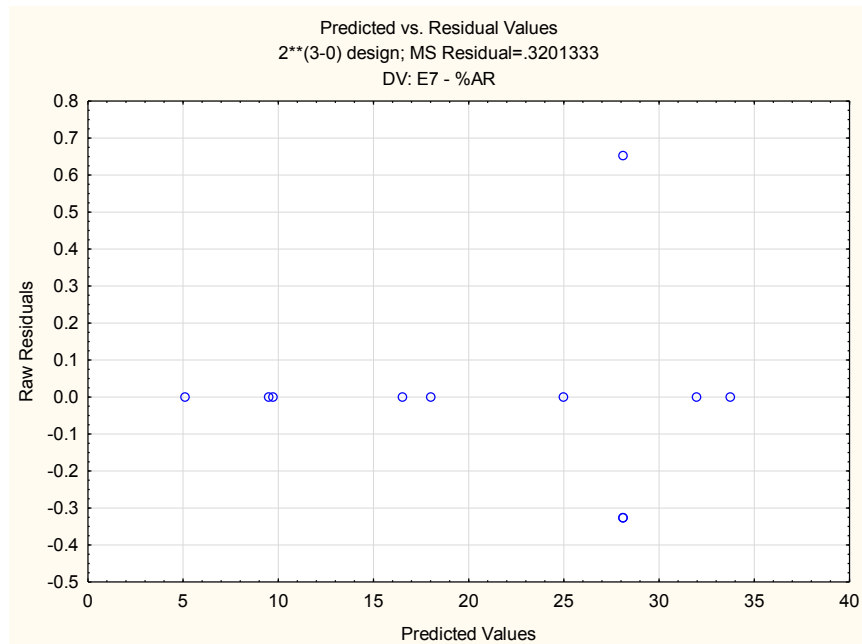
Gráfica B7: Probabilidad normal contra los residuales en azúcares reductores obtenidos de la sacarificación de la corona de la piña con el cóctel E7.



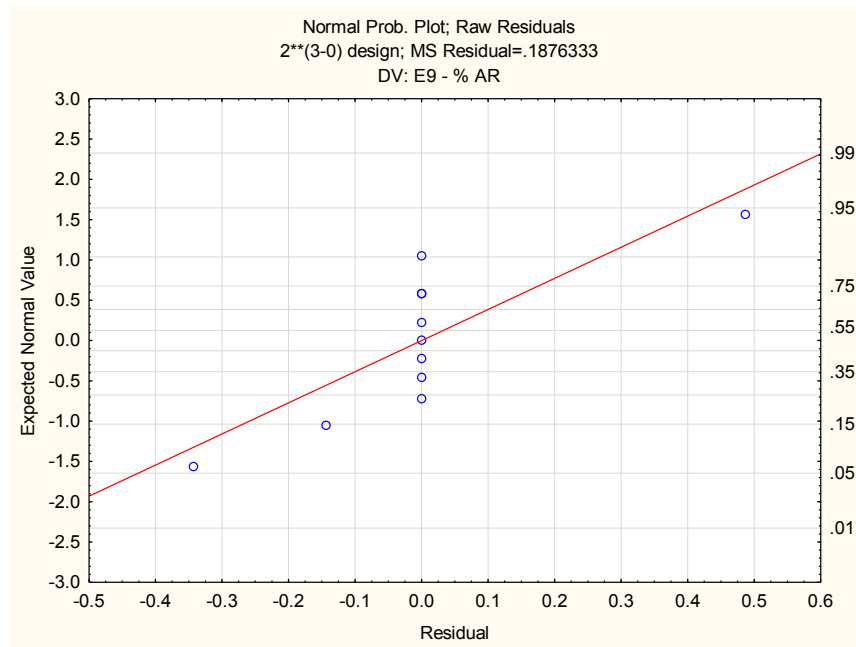
Gráfica B8: Valores predichos contra valores observados en azúcares reductores obtenidos de la sacarificación de la corona de la piña con el cóctel E7.



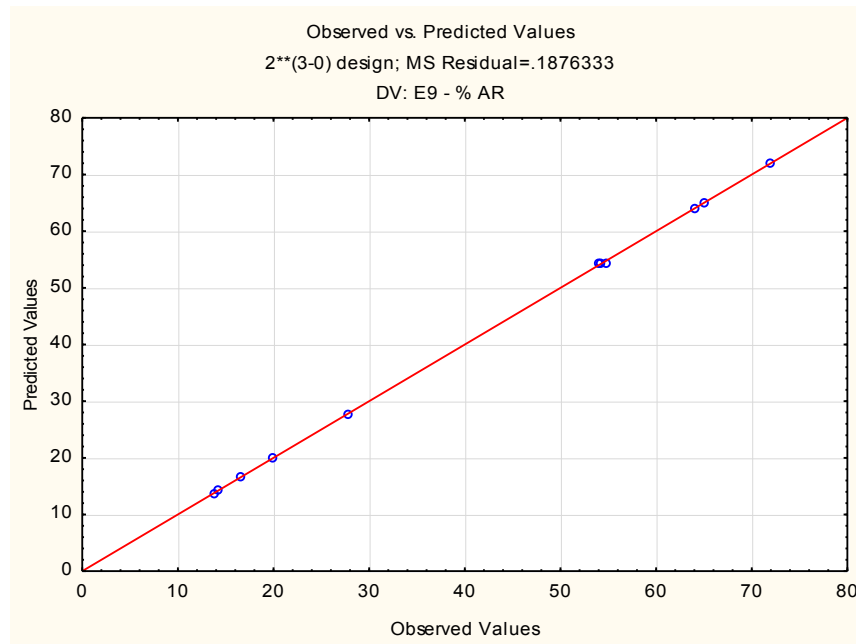
Gráfica B9: Residuales contra valores predichos en azúcares reductores obtenidos de la sacarificación de la corona de la piña con el cóctel E7.



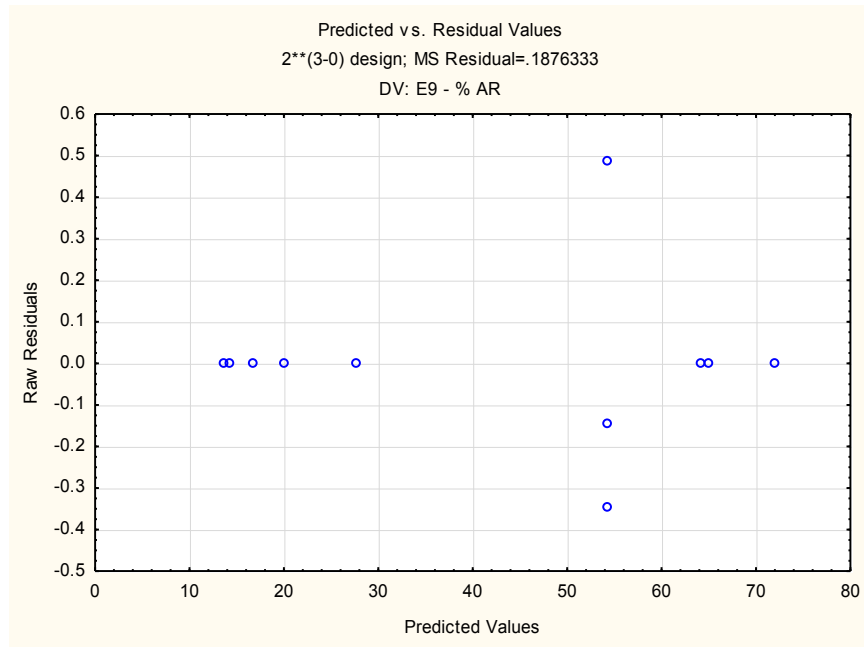
Gráfica B10: Probabilidad normal contra los residuales en azúcares reductores obtenidos de la sacarificación de la corona de la piña con el cóctel E9.



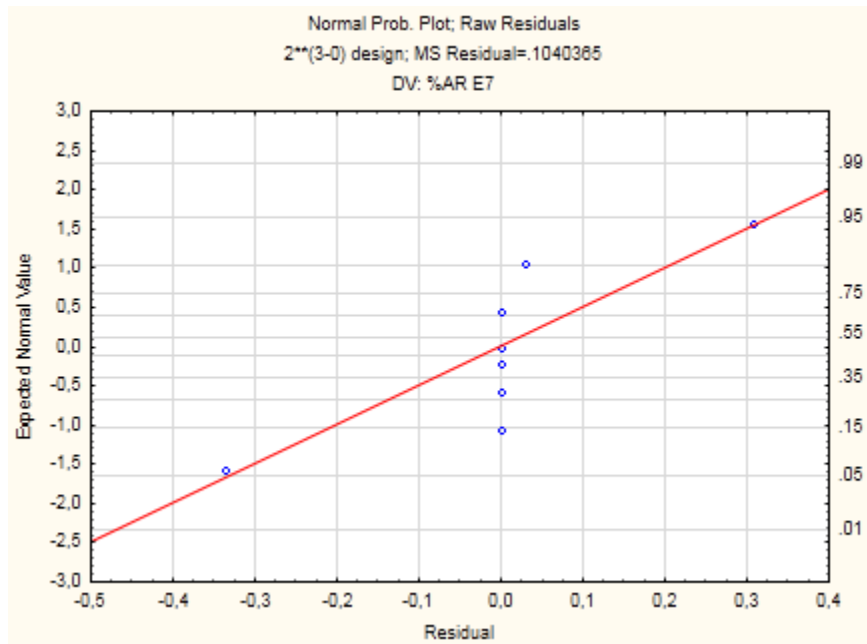
Gráfica B11: Valores predichos contra valores observados en azúcares reductores obtenidos de la sacarificación de la corona de la piña con el cóctel E9.



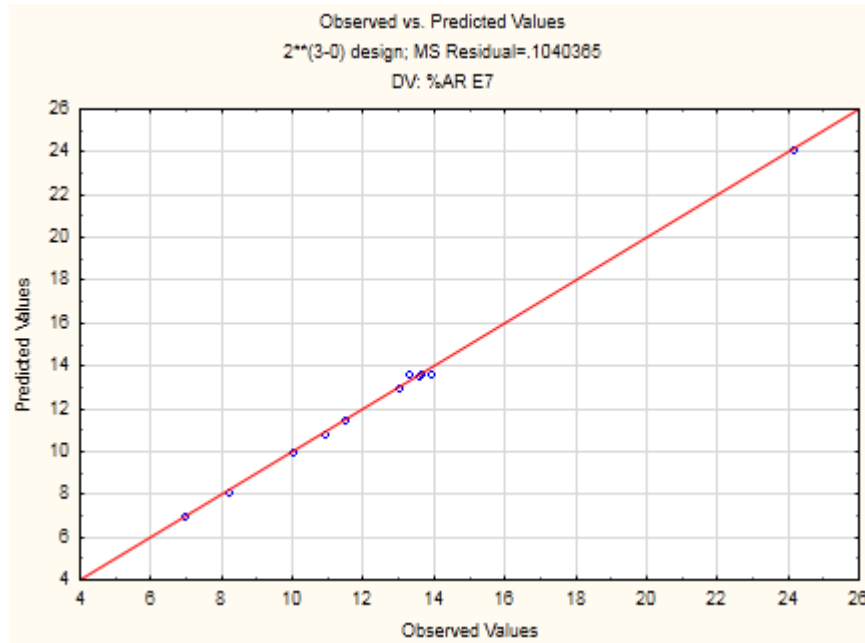
Gráfica B12: Residuales contra valores predichos en azúcares reductores obtenidos de la sacarificación de la corona de la piña con el cóctel E9.



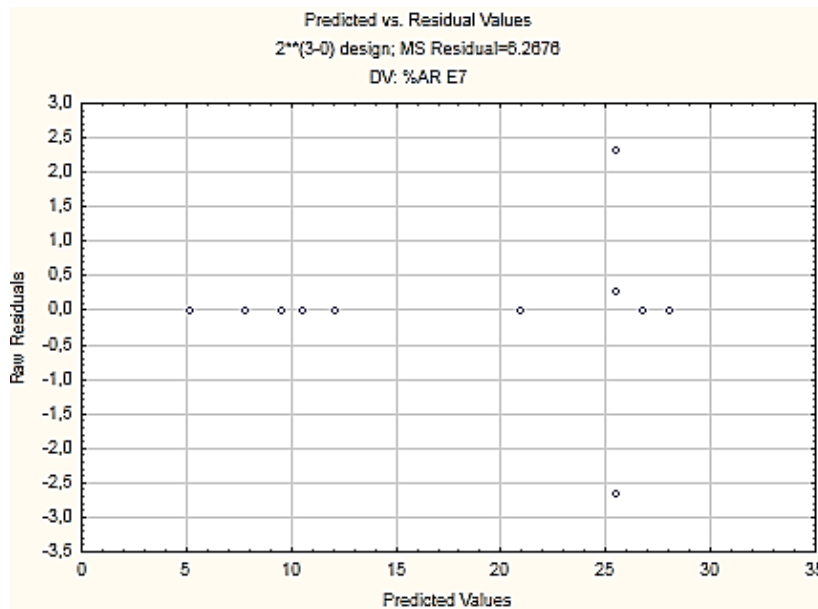
Gráfica B13: Probabilidad normal contra los residuales en azúcares reductores obtenidos de la sacarificación en el residuo del nopal con el cóctel E7.



Gráfica B14: Valores predichos contra valores observados en azúcares reductores obtenidos de la sacarificación en el residuo del nopal con el cóctel E7.



Gráfica B15: Residuales contra valores predichos en azúcares reductores obtenidos de la sacarificación el residuo del nopal con el cóctel E7.



- A continuación se muestran los el análisis de varianza de las variables de respuesta en la biomasa pretratada.



Tabla B5: Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de azúcares totales después de sacarificar en la corona de la piña pretratada (coctel E7). F valor crítico=  $F_{(1,2)} = 18.51$ ;  $\alpha = 0.5$ . Los valores resaltados representan los factores y/o interacciones con diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada (Fc)	P
(1) Tiempo (min)	<b>52.429</b>	<b>1</b>	<b>52.429</b>	<b>58.046</b>	<b>0.017</b>
(2) Temperatura (°C)	<b>138.278</b>	<b>1</b>	<b>138.279</b>	<b>153.093</b>	<b>0.007</b>
(3) [NaOH] %p/V	<b>661.752</b>	<b>1</b>	<b>661.752</b>	<b>732.648</b>	<b>0.001</b>
1*2	0.034	1	0.034	0.037	0.864
1*3	1.786	1	1.786	1.977	0.295
2*3	9.245	1	9.245	10.236	0.085
1*2*3	<b>300.860</b>	<b>1</b>	<b>300.860</b>	<b>333.093</b>	<b>0.003</b>
Error	1.806	2	0.903		
Total	1809.848	10			

Tabla B6: Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de azúcares reductores después de sacarificar en la corona de la piña pretratada (coctel E7). F valor crítico=  $F_{(1,2)} = 18.51$ ;  $\alpha = 0.5$ . Los valores resaltados representan los factores y/o interacciones con diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada (Fc)	P
(1) Tiempo (min)	<b>7.239</b>	<b>1</b>	<b>7.239</b>	<b>22.612</b>	<b>0.042</b>
(2) Temperatura (°C)	<b>49.551</b>	<b>1</b>	<b>49.551</b>	<b>154.782</b>	<b>0.007</b>
(3) [NaOH] %p/V	<b>575.453</b>	<b>1</b>	<b>575.453</b>	<b>1797.541</b>	<b>0.001</b>
1*2	<b>15.263</b>	<b>1</b>	<b>15.263</b>	<b>47.676</b>	<b>0.020</b>
1*3	0.987	1	0.987	3.083	0.221
2*3	0.750	1	0.750	2.344	0.265
1*2*3	<b>147.662</b>	<b>1</b>	<b>147.662</b>	<b>461.252</b>	<b>0.002</b>
Error	0.640	2	0.320		
Total	991.375	10			

Tabla B7: Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de azúcares totales después de sacarificar en la corona de la piña pretratada (cóctel E9). F valor crítico=  $F_{(1,2)} = 18.51$ ;  $\alpha = 0.5$ . Los valores resaltados representan los factores y/o interacciones con diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada (Fc)	P
(1) Tiempo (min)	<b>116.663</b>	<b>1</b>	<b>116.663</b>	<b>120.532</b>	<b>0.008</b>
(2) Temperatura (°C)	<b>320.678</b>	<b>1</b>	<b>320.678</b>	<b>331.313</b>	<b>0.003</b>
(3) [NaOH] %p/V	<b>3174.053</b>	<b>1</b>	<b>3174.053</b>	<b>3279.319</b>	<b>0.0003</b>
1*2	<b>304.922</b>	<b>1</b>	<b>304.922</b>	<b>315.034</b>	<b>0.003</b>
1*3	<b>131.139</b>	<b>1</b>	<b>131.139</b>	<b>135.488</b>	<b>0.007</b>
2*3	<b>166.075</b>	<b>1</b>	<b>166.075</b>	<b>171.583</b>	<b>0.006</b>
1*2*3	<b>80.582</b>	<b>1</b>	<b>80.582</b>	<b>83.254</b>	<b>0.012</b>
Error	1.936	2	0.968		
Total	5395.321	10			

Tabla B8: Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de azúcares reductores después de sacarificar en la corona de la piña pretratada (cóctel E9). F valor crítico=  $F_{(1,2)} = 18.51$ ;  $\alpha = 0.5$ . Los valores resaltados representan los factores y/o interacciones con diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada (Fc)	P
(1) Tiempo (min)	<b>106.266</b>	<b>1</b>	<b>106.266</b>	<b>566.35</b>	<b>0.001</b>
(2) Temperatura (°C)	<b>270.084</b>	<b>1</b>	<b>270.084</b>	<b>1439.43</b>	<b>0.001</b>
(3) [NaOH] %p/V	<b>3266.868</b>	<b>1</b>	<b>3266.868</b>	<b>17410.91</b>	<b>0.000</b>
1*2	<b>304.589</b>	<b>1</b>	<b>304.589</b>	<b>1623.32</b>	<b>0.001</b>
1*3	<b>151.876</b>	<b>1</b>	<b>151.876</b>	<b>809.43</b>	<b>0.001</b>
2*3	<b>187.628</b>	<b>1</b>	<b>187.628</b>	<b>999.97</b>	<b>0.001</b>
1*2*3	<b>127.864</b>	<b>1</b>	<b>127.864</b>	<b>681.46</b>	<b>0.001</b>
Error	0.375	2	0.188		
Total	5120.729	10			

Tabla B9: Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de azúcares totales después de sacarificar en el residuo del nopal pretratada (cóctel E7). F valor crítico=  $F_{(1,2)} = 18.51$ ;  $\alpha = 0.5$ . Los valores resaltados representan los factores y/o interacciones con diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada (Fc)	P
(1) Tiempo (min)	<b>14.691</b>	<b>1</b>	<b>14.691</b>	<b>137.901</b>	<b>0.007</b>
(2) Temperatura (°C)	<b>59.593</b>	<b>1</b>	<b>59.593</b>	<b>559.404</b>	<b>0.002</b>
(3) [NaOH] %p/V	<b>49.744</b>	<b>1</b>	<b>49.744</b>	<b>466.944</b>	<b>0.002</b>
1*2	<b>7.225</b>	<b>1</b>	<b>7.225</b>	<b>67.818</b>	<b>0.014</b>
1*3	<b>49.038</b>	<b>1</b>	<b>49.038</b>	<b>460.317</b>	<b>0.002</b>
2*3	<b>6.483</b>	<b>1</b>	<b>6.483</b>	<b>60.852</b>	<b>0.016</b>
1*2*3	0.448	1	0.448	4.201	0.177
Error	0.213	2	0.107		
Total	200.050	10			

Tabla B10: Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de azúcares reductores después de sacarificar en el residuo del nopal pretratada (cóctel E7). F valor crítico=  $F_{(1,2)} = 18.51$ ;  $\alpha = 0.5$ . Los valores resaltados representan los factores y/o interacciones con diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada (Fc)	P
(1) Tiempo (min)	<b>24.797</b>	<b>1</b>	<b>24.797</b>	<b>238.353</b>	<b>0.004</b>
(2) Temperatura (°C)	<b>53.814</b>	<b>1</b>	<b>53.814</b>	<b>517.262</b>	<b>0.002</b>
(3) [NaOH] %p/V	<b>47.584</b>	<b>1</b>	<b>47.584</b>	<b>457.380</b>	<b>0.002</b>
1*2	<b>10.930</b>	<b>1</b>	<b>10.930</b>	<b>105.057</b>	<b>0.009</b>
1*3	<b>45.007</b>	<b>1</b>	<b>45.007</b>	<b>432.606</b>	<b>0.002</b>
2*3	<b>12.393</b>	<b>1</b>	<b>12.393</b>	<b>119.122</b>	<b>0.008</b>
1*2*3	0.567	1	0.567	5.449	0.145
Error	0.208	2	0.104		
Total	199.174	10			