



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DERIVATIZACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS PARA LA
OBTENCIÓN DE NUEVOS MATERIALES DEL TIPO ÉSTER A BASE DE
ANHÍDRIDOS, SUSTENTADOS A LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOLES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA:

ALBERTO ALEJANDRO FAJARDO DE LA ROSA



Ciudad De México

2016



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: Eduardo Bárzana García
VOCAL: Profesor: José De Jesús García Valdés
SECRETARIO: Profesor: Oscar Hernández Meléndez
1er. SUPLENTE: Profesor: Carolina Peña Montes
2º SUPLENTE: Profesor: Carmina Montiel Pacheco

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE INGENIERÍA QUÍMICA (LABORATORIO INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL) FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

DR. OSCAR HERNÁNDEZ MELÉNDEZ

SUSTENTANTE (S):

ALBERTO ALEJANDRO FAJARDO DE LA ROSA

ÍNDICE GENERAL.		
1	INTRODUCCIÓN.	2
2	ANTECEDENTES	3
3	El bioetanol.	3
4	Inmovilización.	3
5	Residuos lignocelulósicos.	4
5.1	Estructura y composición química de los materiales lignocelulósicos.	5
6	Espectroscopía ATR-FTIR.	7
7	Levaduras.	8
7.1	Fermentación.	9
8	OBJETIVO.	10
8.1	Objetivos específicos:	10
9	MATERIALES Y MÉTODOS.	10
9.1	Materia prima	10
9.2	Tratamiento químico con anhídridos.	11
9.3	Esterificación de la materia prima.	11
9.4	Determinaciones analíticas.	12
9.5	Determinación de densidad.	12
9.6	Pruebas de actividad de agua (AW).	13
9.7	Pruebas de fermentación en reactores tubulares.	13
10	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	18
10.1	Tratamiento con anhídrido acético.	18
10.2	Tratamiento con anhídrido maléico.	19
10.3	Morfología de los residuos. Microscopía electrónica de barrido (SEM).	22
10.4	Ganancias en peso.	24
10.5	Grafting ATR-FTIR.	28
10.6	Pruebas de densidad.	32
10.6.1	Pruebas de densidad para caña de azúcar.	32
10.6.2	Pruebas de densidad para olote de maíz.	33
10.7	Pruebas AW.	33
10.8	Sistema de reactores tubulares para la producción de etanol.	35
11	Producción de biomasa	40
11.1	Caña sin tratamiento (producción de etanol).	41
11.2	Caña tratada con anhídrido acético (producción de etanol).	42
11.3	Caña tratada con anhídrido maléico (producción de etanol).	44
11.4	Olote sin tratamiento (producción de etanol).	46
11.5	Olote tratado con AA (producción de etanol).	48
11.6	Olote tratado con AM (producción de etanol).	50
11.7	Corrida blanco (sin soporte).	52

12	ANÁLISIS DE RESULTADOS.	54
12.1	Tratamientos químicos en residuos lignocelulósicos.	54
12.2	Planta piloto para la producción de cerveza.	55
12.3	Inmovilización de levaduras en soportes lignocelulósicos.	56
13	CONCLUSIONES.	56
	REFERENCIAS:	60
	ANEXO 1: Descripción de materiales y equipos utilizados.	64
	ANEXO 2. Operación de la planta productora de cerveza.	65
	ANEXO 3: ESPECTROS DE IR	66

ÍNDICE DE FIGURAS.		
FIGURA 1	<i>Matriz lignocelulósica. Fuente: Bidalck, y cols., 1992</i>	4
FIGURA 2	<i>Representación molecular de la celulosa.</i>	5
FIGURA 3	<i>Representación molecular de la hemicelulosa.</i>	6
FIGURA 4	<i>Representación molecular de la lignina.</i>	7
FIGURA 5	<i>Aspecto del medio de reacción y del residuo tratado químicamente.</i>	12
FIGURA 6	<i>Unidad de extracción soxhlet.</i>	12
FIGURA 7	<i>Sistema de reactores.</i>	15
FIGURA 8	<i>Modelo de sustitución completa del acetato de celulosa al ser derivatizado con anhídrido acético.</i>	18
FIGURA 9	<i>Análisis realizados por USAI-UNAM (A). Residuo lignocelulósico (bagazo de caña) sin tratamiento químico. (B) residuo lignocelulósico tratado químicamente con anhídrido acético a 130°C.</i>	19
FIGURA 10	<i>Análisis realizados por USAI-UNAM (A) Residuo lignocelulósico (olote de maíz) sin tratamiento químico, (B) residuo lignocelulósico tratado químicamente con anhídrido acético a 130°C.</i>	19
FIGURA 11	<i>Modelo de injerto de ésteres maléicos a la celulosa, donde R representa la sustitución del anhídrido maléico.</i>	20
FIGURA 12	<i>Análisis realizados por USAI-UNAM (A). Residuo lignocelulósico (bagazo de caña) sin tratamiento químico. (B) residuo lignocelulósico tratado químicamente con anhídrido maléico a 200°C.</i>	21
FIGURA 13	<i>Análisis realizados por USAI-UNAM. (A) residuo lignocelulósico (olote de maíz) sin tratamiento químico, (B) residuo lignocelulósico tratado químicamente con anhídrido maléico a 200°C.</i>	22
FIGURA 14	<i>Imágenes realizadas por USAI-UNAM. Bagazo de caña de azúcar. (A) Bagazo de caña sin tratamiento, (B) bagazo de caña tratado con anhídrido acético, (C) bagazo de caña tratado con anhídrido maléico.</i>	23
FIGURA 15	<i>Imágenes realizadas por USAI-UNAM. Olote de maíz. (A) Olote de maíz sin tratamiento, (B) olote de maíz tratado con anhídrido acético, (C) olote de maíz con anhídrido maléico.</i>	24
FIGURA 16	<i>Grafica para Bagazo de caña tratado con anhídrido acético.</i>	25
FIGURA 17	<i>Grafica para Bagazo de caña tratado con anhídrido maléico.</i>	26
FIGURA 18	<i>Grafica para olote de maíz tratado con anhídrido acético.</i>	26
FIGURA 19	<i>Grafica para olote de maíz tratado con anhídrido maléico</i>	27
FIGURA 20	<i>Gráfica de injerto o "grafting" para caña de azúcar tratada con anhídrido acético.</i>	29
FIGURA 21	<i>Gráfica de injerto o "grafting" para caña de azúcar tratada con anhídrido maléico.</i>	29

FIGURA 22	<i>Gráfica de injerto o “grafting” para olote de maíz tratado con anhídrido acético.</i>	30
FIGURA 23	<i>Gráfica de injerto o “grafting” para olote de maíz tratado con anhídrido maléico.</i>	31
FIGURA 24	<i>Densidad de la caña</i>	32
FIGURA 25	<i>Densidad del olote</i>	33
FIGURA 26	<i>AW para los residuos lignocelulósicos.</i>	34
FIGURA 27	<i>AW para los residuos lignocelulósicos (amplificación).</i>	35
FIGURA 28	<i>Arreglo en serie de reactores tubulares.</i>	36
FIGURA 29	<i>Tinción de gram en la activación de la levadura.</i>	37
FIGURA 30	<i>Arreglo único para cada reactor tubular.</i>	37
FIGURA 31	<i>Cromatograma para una muestra de alcohol etílico.</i>	39
FIGURA 32	<i>Curva patrón para determinación cuantitativa de etanol.</i>	40
FIGURA 33	<i>Gráfica de consumo de glucosa vs tiempo (primer ciclo).</i>	40
FIGURA 34	<i>Soporte de caña sin tratamiento plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala.</i>	41
FIGURA 35	<i>Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en caña sin tratamiento (segundo ciclo).</i>	42
FIGURA 36	<i>Soporte de caña con AA plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala (primer ciclo).</i>	43
FIGURA 37	<i>Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en caña AA (segundo ciclo).</i>	43
FIGURA 38	<i>Soporte de caña con AM plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala (primer ciclo).</i>	45
FIGURA 39	<i>Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en caña AM (segundo ciclo).</i>	46
FIGURA 40	<i>Soporte de olote sin tratamiento plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala (primer ciclo).</i>	47
FIGURA 41	<i>Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en olote sin tratamiento (segundo ciclo).</i>	48
FIGURA 42	<i>Soporte de olote tratado con AA plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala (Primer ciclo).</i>	49
FIGURA 43	<i>Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en olote tratado con AA (segundo ciclo).</i>	50
FIGURA 44	<i>Soporte de olote tratado con AM plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala (primer ciclo).</i>	51
FIGURA 45	<i>Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en olote tratado con AM (segundo ciclo) .</i>	52
FIGURA 46	<i>Reactor tubular sin soporte y evidencia en microscopía a escala (primer ciclo).</i>	53
FIGURA 47	<i>Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en reactor sin soporte (segundo ciclo).</i>	54
FIGURA 48	<i>Planta piloto productora de cerveza.</i>	55
FIGURA 49	<i>Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en la planta de cerveza</i>	56
FIGURA 50	<i>(A) Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo reportado por Escobar, 2012. (B) Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo reportada en este trabajo experimental.</i>	57

Resumen.

En la actualidad, los residuos agroindustriales han dejado de ser considerados como desechos, para convertirse en materia prima con alto potencial para diversos procesos tanto para la industria agrícola y en la industria en general. Sin embargo, se presentan diversas limitantes en torno a la obtención de materiales funcionalizados, debido a que su estructura es compleja y de difícil acceso. Para esto se han desarrollado múltiples trabajos e investigaciones, en que se proponen aplicaciones novedosas para estos materiales en procesos sustentables o “verdes”.

En este documento se muestra una alternativa para implementar el uso de estos materiales lignocelulósicos como soportes en la producción de etanol. También se describen los métodos utilizados para la caracterización de los materiales sintetizados, algunas pruebas microbiológicas que permiten el monitoreo y control óptimo del proceso de fermentación, aunado al control del pH, el consumo de azúcares y la producción de etanol.

1. INTRODUCCIÓN.

Las industrias dedicadas al sector agroindustrial generan como subproductos diversos materiales lignocelulósicos, como lo es el bagazo de caña, el olote de maíz, el zacate, entre otros. Estos materiales no se aprovechan completamente y muchas veces son desechados como basura e incinerados, ya que no cuentan con un valor agregado para estas industrias.

Actualmente se intenta obtener un mayor provecho de estos subproductos, tomando en cuenta que estos son materiales renovables y que pueden ser tratados de diversas maneras para generar productos nuevos de alto rendimiento. Una de las nuevas tendencias de uso de estos residuos es la creación de biomateriales compuestos que son tratados químicamente para modificar su estructura y dar propiedades nuevas al residuo lignocelulósico.

En este texto se presentan las ideas generales que sirven de introducción a los estudios realizados en dos residuos en específico (bagazo de caña y olote de maíz). En primer lugar, se plantean los antecedentes y el estado actual referente a los residuos lignocelulósicos, así como los beneficios que se obtendrían al reutilizarlos después de la modificación química. La producción de etanol utilizando los materiales sintetizados como soporte para inmovilización de levaduras, por medio de fermentación anaeróbica, fue realizada por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La inmovilización de levaduras se realizó en los residuos modificados químicamente y también con los no modificados, detallando la producción de etanol, condiciones de crecimiento y de consumo de glucosa.

2. ANTECEDENTES.

El crecimiento exponencial de la población ha generado una demanda de energía, alimentos y el aprovechamiento de diversos productos renovables. Actualmente se consumen 91.6 millones de barriles de petróleo diariamente y 2,400 millones de toneladas de alimentos anuales en todo el mundo, de modo que las estimaciones indican que esta cifra aumentará hasta llegar a los 112 millones de barriles diarios de petróleo en 2020 y 3,000 millones de toneladas de alimentos anuales. De esta cantidad de alimentos el 54% se desperdicia en las diferentes etapas del proceso que involucran desde la cosecha, hasta el consumidor final (IEA, OMR septiembre 2013).

3.El bioetanol.

El bioetanol es el biocombustible más utilizado en todo el mundo, en especial en el sector del transporte (Balat, M; 2011). La mayor parte del bioetanol comercializado proviene de la caña de azúcar, almidones de maíz, remolacha y granos de cereales. El producto obtenido de estos cultivos se denomina etanol de primera generación (1ª. G). Debido a que dichas materias primas constituyen parte del sustento humano y animal, su disponibilidad está limitada. Ésto ha generado una controversia por la competencia con la alimentación y la producción de energía renovable limpia, por lo que se ha impulsado la investigación y el desarrollo tecnológico para la producción de etanol de origen celulósico, también conocido como de segunda generación (2da. G) (Martínez-Alcalá, 2012; Alvira, 2010; Sun y Cheng, 2002).

4.Inmovilización.

La inmovilización de levaduras, enzimas o bacterias, tiene grandes ventajas técnicas y económicas con respecto a los métodos tradicionales de producción de productos finos. Sus principales ventajas son: el manejo de una mayor densidad celular comparado con procesos tradicionales, un mejor control sobre los procesos y la recuperación de los microorganismos inmovilizados para su posterior reutilización. Los métodos de inmovilización más utilizados son la auto-floculación

(Verstrepen y cols. 2003), la adsorción sobre soportes (Bardi, y cols. 1996) y la incorporación o atrapamiento de levaduras en matrices sólidas (Ochoa, 2011).

El “atrapamiento” de levaduras en matrices sólidas puede realizarse por su difusión en matrices sólidas sintetizadas previamente, de modo que este método de inmovilización permita conseguir grandes concentraciones de biomasa (Stewart y Russel, 1986). No obstante, al igual que los otros métodos de inmovilización se pueden presentar ciertas desventajas, como son la difusión de nutrientes o productos a través de la matriz porosa y, en diversos casos, la pobre resistencia mecánica de los soportes sólidos (Verbelen, y cols. 2006).

5. Residuos lignocelulósicos.

Los residuos lignocelulósicos son los biopolímeros más abundantes sobre la Tierra, ya que comprenden cerca del 50% de la biomasa existente y su producción anual se encuentra entre 10-50 mil millones de toneladas (Sánchez y Cardona, 2008). La biomasa lignocelulósica que se destina a diferentes procesos de obtención de etanol puede dividirse en seis grupos: los primeros son los residuos agrícolas como son los bagazos de caña de azúcar, de maíz, de sorgo azucarado, de paja de trigo, de arroz y de cebada. Los segundos provienen de maderas duras como el álamo. En tercer lugar, se encuentran las maderas blandas como el pino y el abeto; en cuarto lugar, se encuentran los residuos celulósicos como el papel periódico, residuos de papel de oficina y lodos de papel reciclado. El quinto grupo lo constituye la biomasa herbácea, que comprende alfalfa, pasto varilla, alpiste y limoncillo, etc. (Sánchez y Cardona, 2008).

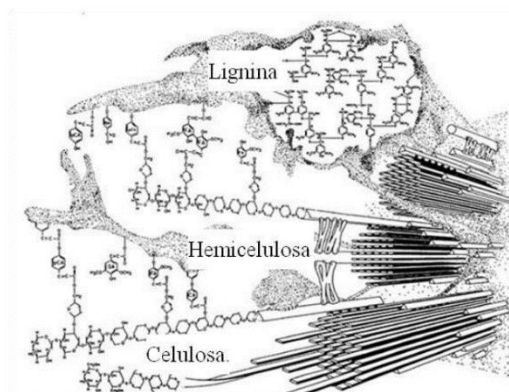


Fig. 1. Matriz lignocelulósica. Fuente: Bidalck, y cols., 1992.

5.1. Estructura y composición química de los materiales lignocelulósicos.

La biomasa lignocelulósica tiene una proporción aproximada en peso del 48% de carbono, 6% de hidrógeno y 45% de oxígeno, y menos del 1% de materia inorgánica como componente minoritario, aunque dicha composición depende de la procedencia y de factores medio ambientales (Molina-Sabio y Rodríguez-Reinoso, 2004). Los residuos lignocelulósicos presentan una estructura rígida compuesta por una matriz polimérica (figura 1) cuyos principales constituyentes son celulosa ($C_6H_{10}O_5$)_n, hemicelulosa ($C_5H_8O_4$)_n y lignina [$C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{3,9-1,7}$]_n (Balat, 2011).

La celulosa es uno de los biopolímeros más abundantes en la Tierra, éste es un homopolímero mayoritario de las paredes celulares de las plantas donde varias moléculas de D-glucosa están atadas por enlaces glucosídicos β-1,4. Forman cadenas lineales largas a nivel de microfibrillas. Estas últimas están unidas por puentes de hidrógeno mediante fuerzas intra e intermoleculares entre grupos hidroxilo como se muestra en la figura 2 (Cuervo *et al.*, 2009).

La celulosa es un polímero semicristalino que presenta microfibrillas altamente ordenadas y regiones amorfas, susceptibles a la degradación, donde el ataque por agentes químicos es más exitoso (Chamú-Muñoz y cols., 2015).

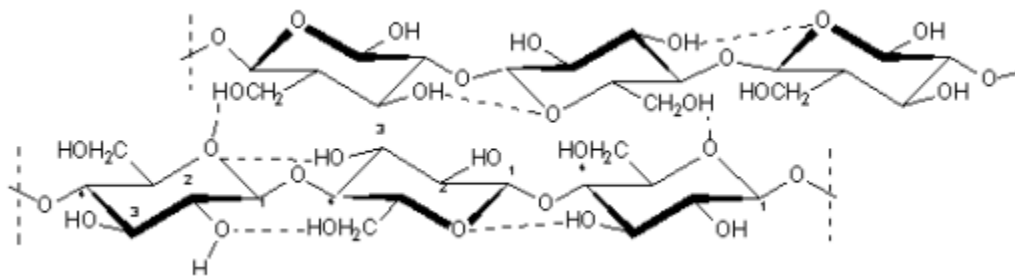


Fig. 2. Representación molecular de la celulosa.

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante de la tierra formando parte de los residuos lignocelulósicos. Es un heteropolímero formado por pentosas, como la D-xilosa y L-arabinosa, hexosas como son la D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, 2-desoxi-D-glucosa, L-ramnosa, L-fucosa, ácidos urónicos, como el D-glucurónico, el D-galacturónico, y el 4-O-metilglucurónico. Estas cadenas pueden estar

constituidas por una sola unidad (homopolímero) o por varias unidades (heteropolímeros), por ejemplo: xilanos, mananos, galactanos, glucomanos y galacto glucomanos.

Las cadenas de hemicelulosa varían dependiendo del tipo de material lignocelulósico, En el caso de las maderas duras el xilano es el polímero dominante, el cual está altamente sustituido por grupos acetilados, siendo su composición similar a las plantas herbáceas, aunque con menor proporción de grupos acetilos. Por el contrario, en las maderas blandas el galacto glucomanano es la unidad más abundante (Dahlman, 2003; Fengel y Wegener, 1984).

En la mayoría de los cereales como la cebada y el trigo, los xilanos son cuantitativamente predominantes en el componente hemicelulósico; estos contienen una cadena principal formada por residuos de D-xilopiranosos unidos por enlaces β -1,4, como se muestra en la figura 3. (Sun y cols., 2000; Sun y Tomkinson, 2003)

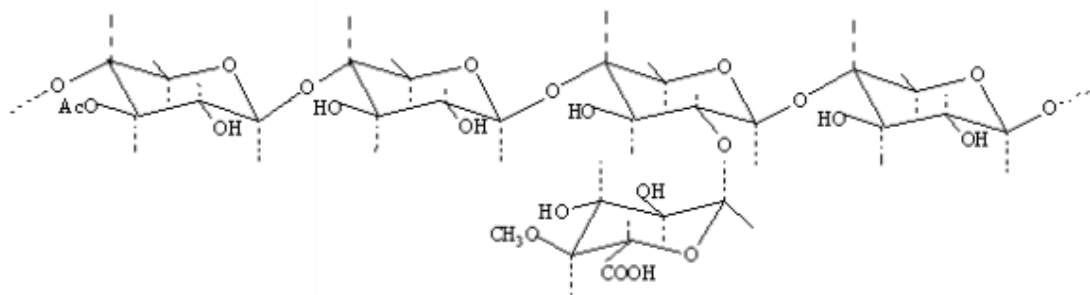


Fig. 3. Representación molecular de la hemicelulosa.

Después de la celulosa y la hemicelulosa, el tercer polímero más abundante es la lignina (figura 4). Este es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado que está formado por alcoholes aromáticos llamados: alcohol cinamílico (p-cumarílico [4-hidroxicinamílico], alcohol coniferílico [4-hidroxi-3-metoxicinamílico] y alcohol sinapílico [4-hidro-3,5-dimetoxicinamílico]), que actúan como precursores de la lignina y representan las unidades básicas de este polímero (4-hidroxifenilo, guayacilo y (S) siringilo, respectivamente), (Higuchi, 1990, Boerjan y cols, 2003).

La lignina, de la misma manera que la hemicelulosa, se solubiliza en agua a una temperatura de 180 °C bajo condiciones neutras. Su solubilidad en medios ácidos, neutros o alcalinos depende de los precursores que la forman, de las propiedades del disolvente y de las concentraciones de estos (Hendriks y Zeeman, 2009).

La lignina es la parte que actúa como material de soporte en la pared celular, ésta ofrece la rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales, lo que hace que no se pueda modificar químicamente toda la estructura lignocelulósica. Los procesos de modificación química y derivatización de los compuestos lignocelulósicos generan nuevos materiales con una mayor firmeza, y resistencia a la degradación química y biológica (Hernández-Meléndez y cols., 2009)

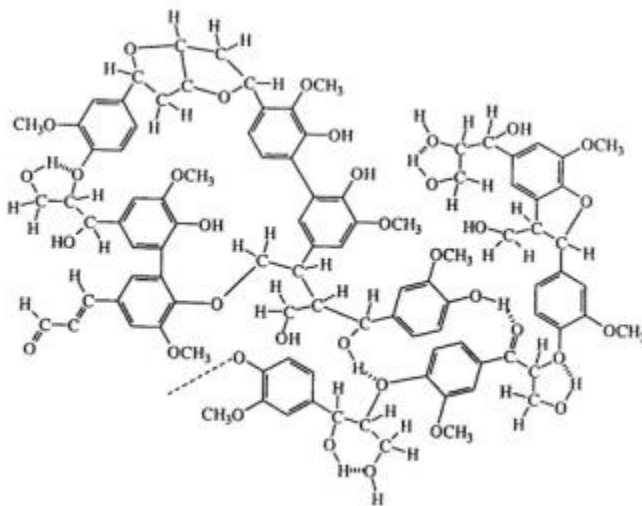


Fig. 4. Representación molecular de la lignina.

6. Espectroscopía ATR-FTIR.

La espectroscopía ATR-FTIR (reflexión total atenuada, por sus siglas en inglés) es simple, directa, flexible y especialmente adecuada para un estudio superficial de la celulosa y sus derivados. La técnica consiste en el paso de un haz de radiación infrarroja (IR) a través de un cristal transparente con un alto índice de refracción, sobre él se coloca la muestra. El haz de radiación incidente se refleja varias veces y la superficie de la muestra absorbe parte de la radiación a frecuencias

características. Con la técnica de ATR-FTIR es posible tener un estudio más completo de las propiedades estructurales y supramoleculares de la celulosa, no es necesario moler la muestra y en consecuencia no se modifica o destruye la estructura cristalina. La técnica de ATR-FTIR es idónea para el análisis químico de fibras celulósicas modificadas superficialmente, además lo hace hasta una profundidad de unas cuantas micras. (Contreras y cols.)

7. Levaduras.

Se les denomina levaduras a un grupo de hongos unicelulares cuya actividad ha sido siempre de gran importancia, ya que estos microorganismos son abundantes especialmente en donde existe la presencia de azúcares (Burdon, 1971). Las levaduras son de forma esférica, ovalada o cilíndrica y en general la división celular ocurre por gemación (Brock, 1982).

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más conocida y de mayor importancia industrial, siendo el microorganismo utilizado por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial, por su fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, barato, tolera variaciones de temperatura, variaciones de pH, así como altas concentraciones de etanol cuando se produce la fermentación. Produce concentraciones menores de subproductos como glicerol o ácido acético y puede utilizar altas concentraciones de azúcares, presentando alta viabilidad celular para el reciclaje (Fajardo & Sarmientos, 2007).

Una levadura consta de una pared celular, una membrana citoplasmática que contiene un núcleo, una vacuola, numerosos gránulos y glóbulos de grasa, no contiene flagelos u otros órganos de locomoción. La pared celular está integrada por polímeros de glucosa y manosa, con cantidades pequeñas de proteínas, lípidos y quitina (Herdoisa, 2001).

Las levaduras necesitan los mismos elementos químicos que otros seres vivos como es el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre y molibdeno. Los últimos seis elementos se necesitan en cantidades mínimas como componentes o activadores de sus enzimas (Carpenter, 1969).

7.1. Fermentación.

La degradación de la glucosa se puede dividir en tres etapas, la etapa I comprende una serie de reacciones de re-acomodo que no implica oxidación-reducción, donde no se libera energía pero que conducen a la producción de dos moléculas de un compuesto intermedio (gliceraldehido-3-fosfato). En la etapa II hay una reacción de óxido-reducción donde se produce un enlace fosfato rico en energía en forma de ATP y se forman dos moléculas de piruvato. En la etapa III ocurre una segunda reacción de óxido-reducción y se forman los productos de fermentación (etanol y CO₂). (Brock & Madigan, 1982).

En la glucólisis se consumen dos moléculas de ATP por cada dos fosforilaciones de la glucosa y se sintetizan cuatro de ATP (dos moléculas a partir de cada ácido 1,3-difosfoglicérico que se convierte en piruvato), teniendo una ganancia neta para el organismo de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada (Brock & Madigan, 1982).

Una vez que el sustrato y el microorganismo han sido seleccionados es necesario darles las condiciones adecuadas de operación para lograr la optimización del sistema. Desde el punto de vista operativo es importante decidir con cuidado las variables de temperatura, pH, concentración de nutrientes y la productividad esperada. Estas variables se miden de manera continua e intermitentemente a lo largo del proceso. Las variables que se pueden medir de manera continua son la temperatura, la concentración de oxígeno y el pH; las variables que se puede medir de manera intermitente son la biomasa, el producto y el consumo de sustrato (Fajardo & Sarmientos, 2007).

Se debe tener en cuenta que la temperatura tiene un gran efecto en la velocidad metabólica del microorganismo, donde la temperatura óptima de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es de 28 a 32°C (Drapcho y cols., 2008).

El pH tiene una gran importancia en el crecimiento y en la producción de etanol en su etapa anóxica, así como en la reproducción de estos microorganismos, marcando un efecto notable en la velocidad de crecimiento. El pH óptimo para la

levadura *Saccharomyces cerevisiae* es 5.5 (Fajardo & Sarmientos, 2007; Drapcho y cols., 2008).

8.OBJETIVO.

El objetivo general de este estudio es incrementar los diferentes usos de los residuos lignocelulósicos mediante la modificación química y generar nuevos materiales con diferentes propiedades físicas y químicas.

8.1. Objetivos específicos:

1. Lograr un mayor porcentaje de injerto de grupos funcionales, para asegurar de esta manera un cambio físico significativo de los residuos y la obtención de nuevos materiales.
2. Estudiar las propiedades físicas de los materiales y determinar el cambio que genera el tratamiento químico en los residuos, así mismo observar los cambios estructurales mediante una serie de análisis fisicoquímicos.
3. Empacar una columna con los materiales modificados, donde se inmovilizarán las levaduras productoras de etanol.
4. Optimizar el proceso de fermentación utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* realizando ensayos que determinen su crecimiento dentro de los soportes modificados y su capacidad para producir etanol.
5. Analizar la influencia de los factores externos, como el pH, la temperatura y bacterias ajenas a la fermentación, para implementar un proceso eficiente de inmovilización y producción de etanol.

9.MATERIALES Y MÉTODOS.

9.1. Materia prima

Como materia prima se utilizaron olotes de maíz y bagazo de caña de azúcar con tamaño de partícula comprendido entre 0.5-1.0 cm. El bagazo de caña de azúcar se tomó intacto a partir de un tallo completo de caña y cortando cubos pequeños con las medidas antes mencionadas.

9.2. Tratamiento químico con anhídridos.

El tratamiento químico fue mediante una reacción de esterificación, que tiene lugar a partir de anhídridos orgánicos, ya que estos compuestos son auto-activados y no requieren de agentes externos. Las reacciones con estos anhídridos dependen de la temperatura, mientras más cercanas sean a su punto de ebullición serán más exitosas. (Meneses T., 2013).

Anhídridos usados (revisar anexo 1 para ver la especificación de cada reactivo utilizado):

Anhídrido acético R.A. 99.9% (AA)

Anhídrido maléico R.A. 99.9% (AM)

9.3. Esterificación de la materia prima.

Previo a la reacción de esterificación, el bagazo de caña o el olote de maíz se limpió con agua destilada para eliminar todos los restos de azúcares y almidones embebidos en la matriz. Posteriormente se colocó en una estufa por dos horas para su secado a 103°C y se colocaron los residuos en un desecador para evitar la humedad del medio y dejarlos almacenados previo a su uso. El residuo lignocelulósico se colocó en un matraz de bola de fondo redondo conteniendo anhídrido acético o anhídrido maléico (según sea el caso) en cantidad mínima para suspenderse e iniciar la reacción de esterificación como se muestra en la figura 5. Se realizó a diferentes temperaturas: 80°C, 100°C y 130°C (para anhídrido acético), 150°C, 180°C, y 200°C (para anhídrido maléico), por tiempos de 1, 5 y 10 minutos respectivamente. La temperatura se controló por medio de un baño de glicerina y una parrilla eléctrica con calentamiento y agitación (anexo1). Se colocó un condensador de vidrio en la parte superior del matraz de bola y un globo de aproximadamente 20 cm de diámetro conteniendo nitrógeno seco para mantener atmósfera inerte (nitrógeno grado cromatográfico, [anexo1]).

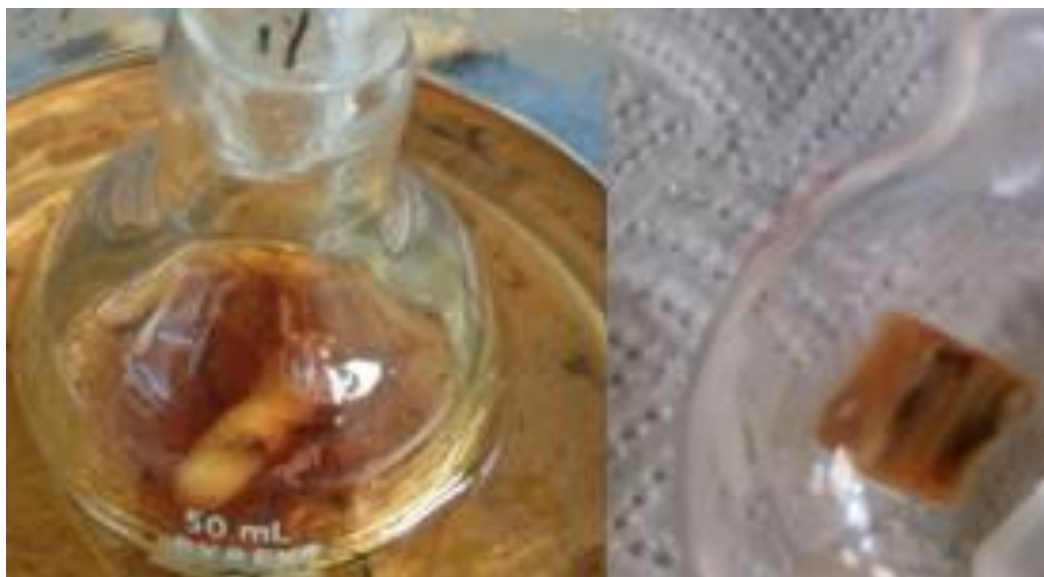


Fig. 5. Aspecto del medio de reacción y del residuo tratado químicamente.

Al finalizar las reacciones de esterificación, la fase líquida producida se removió por medio de filtración. La fase sólida se incorporó a una extracción soxhlet (figura 6) durante dos horas con acetona para remover los monómeros adheridos que no se injertaron (Chamú-Muñoz y cols., 2013).



Fig. 6. Unidad de extracción soxhlet.

9.4. Determinaciones analíticas.

Los residuos tratados químicamente se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM), en la USAI de la Facultad de Química.

Las muestras se pesaron antes y después de la modificación química en la balanza analítica Ohaus (anexo 1) para determinar el porcentaje de peso ganado o perdido (según sea el caso) después de la reacción y extracción con acetona como se muestra en la figura 5.1. Para calcular el porcentaje de ganancia en peso se utiliza la siguiente ecuación.

$$(\%) \text{ Ganancia en peso} = \left[\frac{\text{material tratada y extraída} - \text{material no tratada y extraída}}{\text{material no tratada y extraída}} \right] \times 100$$

Las muestras anteriormente mencionadas se analizaron por espectroscopia FTIR en la USAI de la Facultad de Química, para determinar que reacciones presentan mayor porcentaje de injerto y qué grupos funcionales se encontraban presentes después del tratamiento químico. Estos espectros se leen en transmitancia y se analizan con los datos reportados en tablas para cada banda característica. Para hacer un análisis cuantitativo de la reacción se analizaron los espectros por espectroscopía ATR-FTIR en la USAI de la Facultad de Química. Para determinar de manera cuantitativa el injerto de cada uno de los monómeros en los residuos lignocelulósicos se siguió la metodología descrita en Chamú-Muñoz y cols, 2015.

$$\text{Grafting} = \left[\frac{\text{área de la banda del grupo carbonilo sin tratamiento (C=O)} - \text{área de la banda del grupo carbonilo sin tratamiento (C=O)}}{\text{área de la banda inicial del grupo hidroxilo sin tratamiento (OH)}} \right]$$

9.5. Determinación de densidad.

Se determinó la densidad para los materiales que se trataron químicamente, así como para los residuos nativos. Los residuos modificados presentan cambios físicos notables como son la coloración y dureza. En una probeta de 100 o 250 mL se agregaron los residuos tratados y no tratados para determinar su densidad experimental. El material lignocelulósico (totalmente seco) es previamente pesado en una balanza analítica, se coloca en la probeta y se cubre con acetona (3-4 veces su volumen para evitar que se seque o se termine el disolvente al ser absorbido por el material). Se deja en reposo por 5 días para que la acetona penetre hasta la

matriz lignocelulósica y se mide la diferencia de volumen desplazado por las partículas. Los pesos registrados para esta prueba son medidos en una balanza analítica Ohaus.

9.6. Pruebas de actividad acuosa (AW).

Se determinaron los valores de actividad acuosa para los 4 diferentes materiales seleccionados como los mejores después del tratamiento químico y un testigo para cada caso: olote AA, olote AM, caña AA, caña AM y sus análogos sin tratamiento. Estos materiales al ser tratados cambian sus propiedades físicas y químicas, de manera tal que estos se vuelven más hidrofóbicos o más hidrofílicos, según sea el caso del tratamiento y las interacciones de los grupos funcionales que tengan presentes en su estructura.

Los residuos nativos y los materiales esterificados se colocaron en cajas de Petri mini de plástico y posteriormente se aseguraron con parafilm para evitar posibles fugas de agua por evaporación. Las cajas de Petri se colocaron en un desecador por 15 días. Las relaciones de agua/sólido seco que se colocaron en las cajas van desde 10% al 50%. El agua se agregó con un par de micro-pipetas con capacidad de 10 μL -100 μL y 100 μL - 1000 μL . Se permitió que las cajas establecieran un equilibrio líquido-vapor entre el agua agregada y los sólidos, sin interferencias del medio externo. Las pruebas de determinación de actividad acuosa se realizaron en un aparato Aw Quick (anexo1) figura 7.

Se colocó la muestra en el contenedor de la sonda del instrumento AW Quick y se procedió a cerrarla perfectamente. Después de 4-6 minutos se retira la muestra y se toma la lectura de actividad acuosa.

9.7. Pruebas de fermentación en reactores tubulares.

Se colocaron 6 columnas de vidrio con capacidad de 180 mL que operan de manera continua o en forma independiente, de esta forma se busca implementar una aplicación para los nuevos materiales esterificados en la inmovilización de levaduras. Se determinó la viabilidad del proceso en cada uno de los diferentes soportes reteniendo la biomasa en un primer ciclo, seguido de un cambio del medio

de crecimiento para obtener etanol en condiciones anaerobias en un segundo ciclo. Ya no es necesario agregar nutrientes en el segundo ciclo.

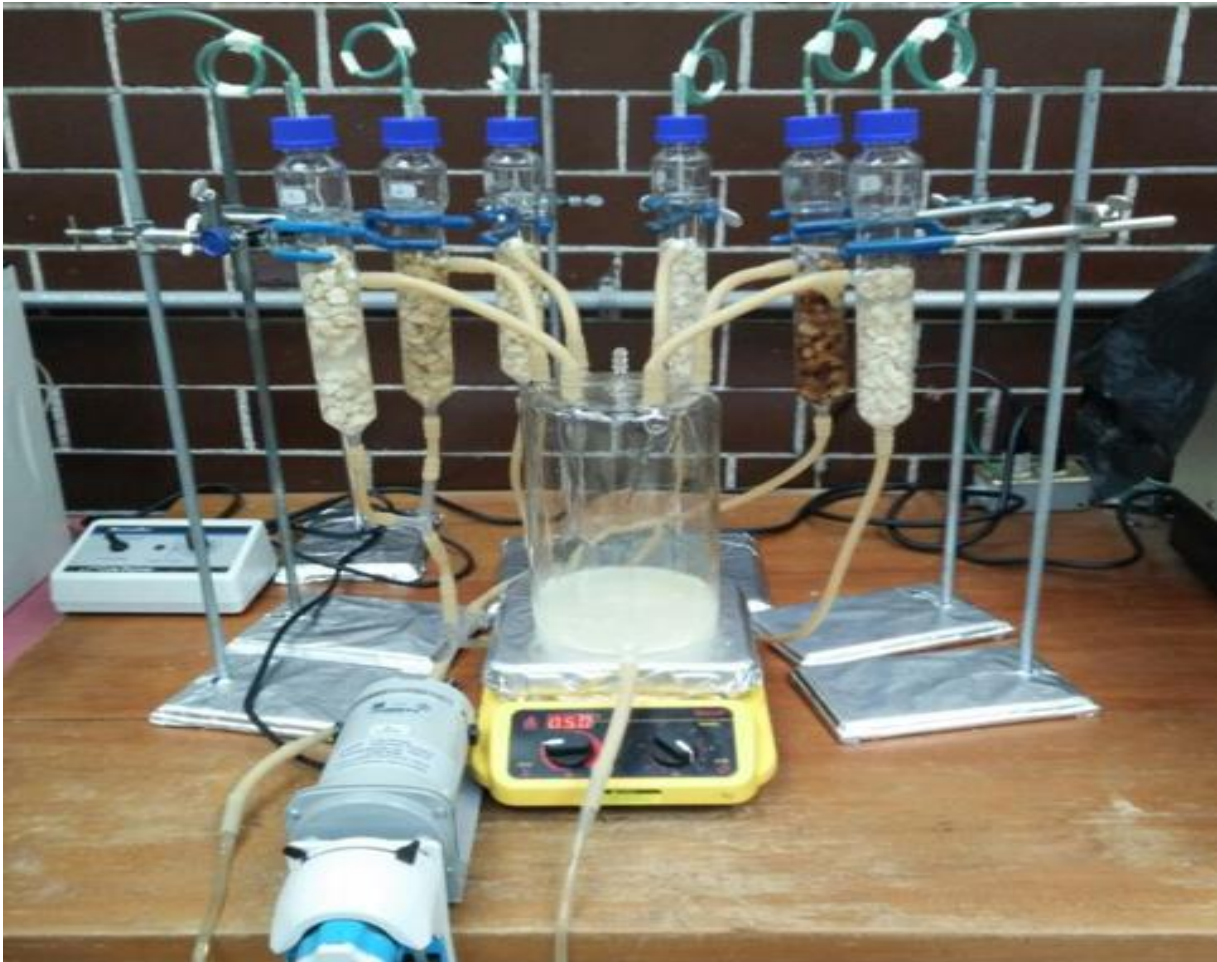


Fig. 7. Sistema de reactores.

El proceso se realiza con el arreglo presentado en la figura 7, de modo que se harían crecer las levaduras de manera masiva en los 6 soportes, pero se observó que este arreglo presenta problemas hidrodinámicos que lo hacen complicado de manipular y estabilizar. Debido a esto se optó por montar cada reactor tubular de manera independiente, y lograr un mayor control sobre los flujos, pH, y el desempeño del arreglo.

Para la activación de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) que se encuentra liofilizada (Ale Yeast [anexo 1]), se suspendió un gramo en un litro de agua y en diferentes medios (revisar anexo 1 para ver la especificación de cada reactivo utilizado):

1. Levadura (1g/L) sólo con glucosa (100g/L)
2. Levadura (1g/L) con glucosa (100g/L) y levadura desamargada (2g/L)
3. Levadura (1g/L) con glucosa (100g/L) e infusión de cerebro-corazón (2g/L)
4. Levadura (1g/L) con glucosa (100g/L) más levadura desamargada (2g/L) y agar dextrosa sabouraud (2g/L)

El medio que mejores resultados mostró fue el de Agar Dextrosa Sabouraud (como medio rico en peptonas y nutrientes), levadura desamargada (como fuente de nitrógeno) y glucosa (como fuente de carbono). Estos medios se dejaron en la incubadora por 24 horas en un tubo de ensaye cerrado con rosca y se determinó el crecimiento mediante la formación de CO₂ característico. De manera adicional se midió el consumo de glucosa por el método DNS (Miller., 1959)

Para observar el crecimiento de la levadura, se realizó una tinción de Gram simple con safranina y se observó en un microscopio óptico Nikon Eclipse E100 (Anexo1) a 40X de resolución.

Para los reactores tubulares se preparó el medio de la siguiente manera: se tomó un matraz volumétrico de 1 litro y se agregó 1 gramo de levadura liofilizada, se agregaron 2 g de levadura desamargada, 2 gramos de Agar Dextrosa Sabouraud, 100 g de glucosa, y se aforó con agua destilada, con la finalidad de tener un medio rico en nutrientes y en carbono para producir la biomasa necesaria para embeber de levadura los soportes.

El medio de crecimiento se monitoreó cada 24 horas durante 6 días y se determinó el consumo de glucosa y la producción de la biomasa por medio de tinción de Gram. Se tuvo especial cuidado en mantener el pH constante en 5.5 ajustando con hidróxido de sodio 1 N en caso de ser necesario. Se permitió a cada una de las columnas permanecer en una atmósfera aeróbica dejando pasar una mínima cantidad de aire con la ayuda de una manguera larga y enrollada colocada en la parte superior de cada una de las columnas (ciclo1).

El monitoreo de consumo de glucosa se realizó con el reactivo DNS preparado y posteriormente se calentó a 90°C en un baño maría por 4 minutos (Miller., 1959). Brevemente: se toman 50 µL de muestra problema (en caso de ser necesario se

hacen diluciones en tal forma que coincidan con el intervalo de la curva patrón de glucosa en concentraciones de 2.5 a 15 mg/mL), se agregan 100 μ L de agua destilada y 300 μ L de reactivo DNS. Para cada serie de muestras se realizó una curva patrón de glucosa. Finalmente se tomaron las lecturas de absorbancia a 540 nm de cada muestra para determinar la concentración de glucosa, usando un espectrofotómetro de UV-Visible (anexo1).

Para la fase 2, después de consumirse la glucosa inicial en el reactor tubular se drenó todo el líquido presente en la columna de vidrio y se mantuvo la biomasa inmovilizada al soporte, se cambió el medio a glucosa sola con concentración inicial de 100g/L. Se modificó la atmosfera de aire a nitrógeno, incorporando una manguera proveniente de un tanque (Praxair, grado cromatográfico) para cambiar de medio aerobio a anaerobio, purgando el sistema y burbujeando el líquido nuevo por 2 minutos con nitrógeno para desplazar el oxígeno disuelto en el agua.

Una vez anaerobio el sistema (manteniendo un burbujeo permanente de nitrógeno) se procede a la producción de etanol y éste se monitoreó cada 24 horas por cromatografía de gases (CG), así como el consumo de glucosa por DNS. Para esto se construyó una curva de calibración, inyectando por triplicado una serie de muestras con valores conocidos de etanol anhidro R.A. (anexo1).

En el cromatógrafo de gases GOW-MAC (Instrument Company, Serie 580) de gases se inyectó 1 μ L de cada muestra, así como una muestra para la curva patrón de etanol en agua.

En cada reactor se controló el valor de pH, manteniéndolo en 5.5, por medio de una disolución de sosa 1 N. El pH disminuía cada 24 horas, por lo que fue necesario su ajuste para evitar el crecimiento de otros microorganismos que pudieran alterar la producción de etanol.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

10.1. Tratamiento con anhídrido acético.

Para los residuos lignocelulósicos tratados con anhídrido acético podemos notar claramente un cambio de coloración, de amarillo pálido a semi-blanco, debido a que se forman entidades de acetato de celulosa (Samios y cols., 1997). Se observa que los materiales funcionalizados no sufren un cambio físico muy significativo en su morfología. Estos presentan una dureza aparente mayor que el residuo sin tratamiento, y una hidrofobicidad más alta, como se mostrará más adelante, debido a los grupos acetato que se presentan sustituidos en el material, como podemos ver en la figura 8.

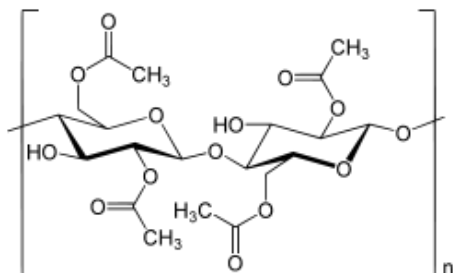


Fig. 8. Modelo de sustitución completa del acetato de celulosa al ser derivatizado con anhídrido acético.

El acetato de celulosa obtenido no es 100% sustituido con el tratamiento, esto es predecible ya que el arreglo cristalino impide que el anhídrido acético penetre hasta el interior del residuo. Esto se puede apreciar en los espectros de infrarrojo que se muestran en la figura 9, donde se hace un análisis cualitativo y las bandas del grupo OH ($3300-3000\text{ cm}^{-1}$) iniciales disminuyen su intensidad, ya que estos son sustituidos parcialmente en la reacción. También se nota un incremento en la intensidad de las bandas características de los grupos carbonilos C=O (1740 cm^{-1}), así como de las bandas para los ésteres R-O-R (1300 y 1050 cm^{-1}).

Para las figuras 9, 10, 12 y 13 se pueden apreciar sus espectros de IR en mayor escala en el anexo 3. Para este análisis se utilizaron los valores teóricos reportados en las "Tablas de IR" (AMYD UNAM).

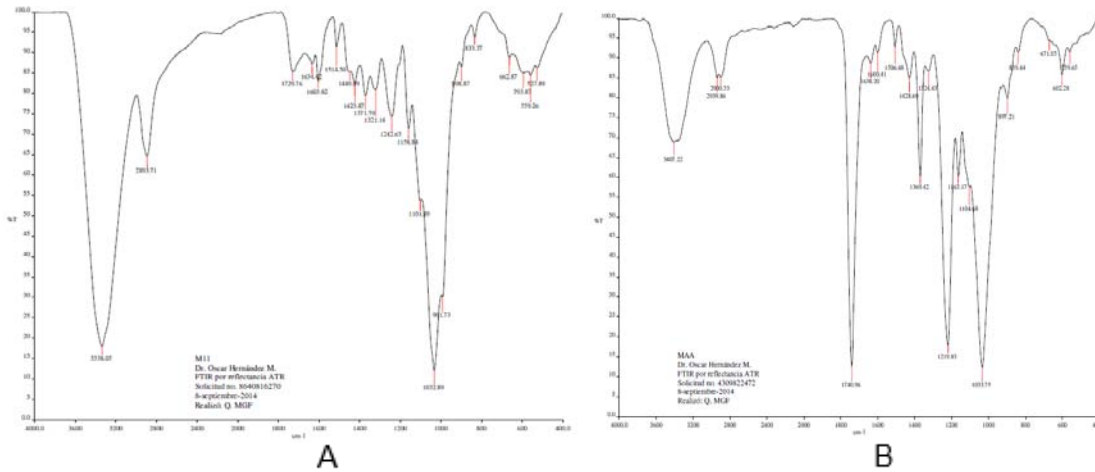


Fig. 9. Análisis realizados por USAI-UNAM (A). Residuo lignocelulósico (bagazo de caña) sin tratamiento químico. (B) residuo lignocelulósico tratado químicamente con anhídrido acético a 130°C.

Para el caso del olote de maíz, este tiene una diferencia notable en la banda OH, como se puede apreciar en la figura 10. Ambos residuos nativos presentan una gran similitud en cuanto a sus grupos funcionales, pero cabe destacar que el olote de maíz presenta una mayor dureza o grado de compactación que el bagazo de caña, impidiendo que el tratamiento penetre hasta la matriz. Esta es una limitante al momento de tratar el residuo, pero se puede moler o tamizarlo para tener una mayor superficie de contacto, según sea el caso.

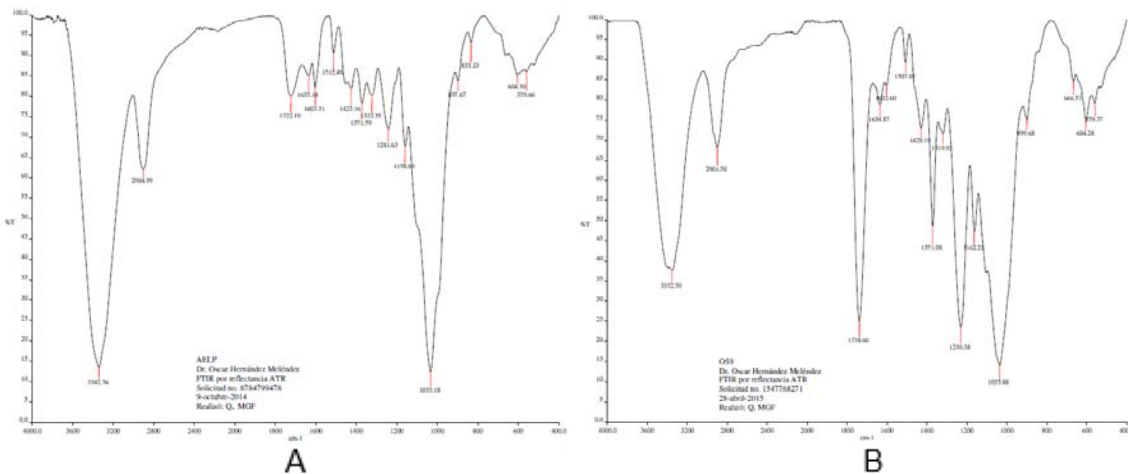


Fig. 10. Análisis realizados por USAI-UNAM (A) Residuo lignocelulósico (olote de maíz) sin tratamiento químico, (B) residuo lignocelulósico tratado químicamente con anhídrido acético a 130°C.

10.2. Tratamiento con anhídrido maléico.

Para el caso de los residuos lignocelulósicos tratados con anhídrido maléico, se pueden notar cambios físicos muy evidentes a simple vista en la coloración y la

resistencia mecánica, ya que estos pasan de un color amarillo pálido a color amarillo marrón y una resistencia mecánica inferior. También se modifica la morfología como se observa en pruebas SEM, pero mantiene la capacidad hidrofílica del material sin tratar. Lo anterior se debe a la interacción de los grupos OH (por parte de los ácidos carboxílicos que se forman después de la reacción, pasando del anhídrido maléico al éster de ácido maléico injertado por uno de los extremos) y el agua (Hee-Soo y cols., 2007). Esto tiene lugar en la reacción donde un par de electrones libres se acoplan al protón que se libera del grupo OH de la celulosa, dando como resultado el éster maléico de celulosa como se muestra en la figura 11.

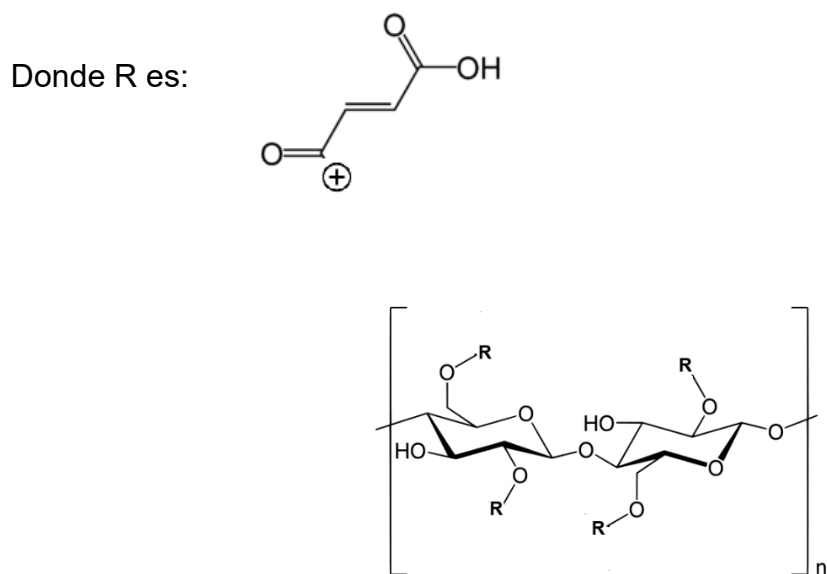


Fig. 11. Modelo de injerto de ésteres maléicos a la celulosa, donde R representa la sustitución del anhídrido maléico.

En el tratamiento del bagazo de caña con AM, la sustitución no se realiza en un 100% de los grupos OH, esto es predecible de igual manera que con el anhídrido acético, ya que el arreglo cristalino impide que el anhídrido maléico penetre en la estructura más compacta del residuo, lo que lleva a porcentajes de injertos menores. Puede apreciarse en los espectros de la figura 12 que los porcentajes del grupo OH ($3300-3000\text{ cm}^{-1}$) iniciales son diferentes a los finales, incrementando notablemente las interacciones por el nuevo grupo COOH. Estos grupos funcionales presentan bandas muy anchas por arriba de los 2500 cm^{-1} que son características de las interacciones del ácido carboxílico y el grupo OH polimérico por arriba de los

3000cm⁻¹. Con base en este espectro se puede notar que hay una gran cantidad de grupos funcionales presentes de COOH, evidenciado por las bandas de carbonilo C=O; cerca de los 1740cm⁻¹, así como de las bandas características de los ésteres alrededor de los 1300-1050 cm⁻¹. Estos detalles serán más visibles en los siguientes puntos donde se hace más a fondo esta caracterización, es decir, en el análisis cuantitativo de injerto.

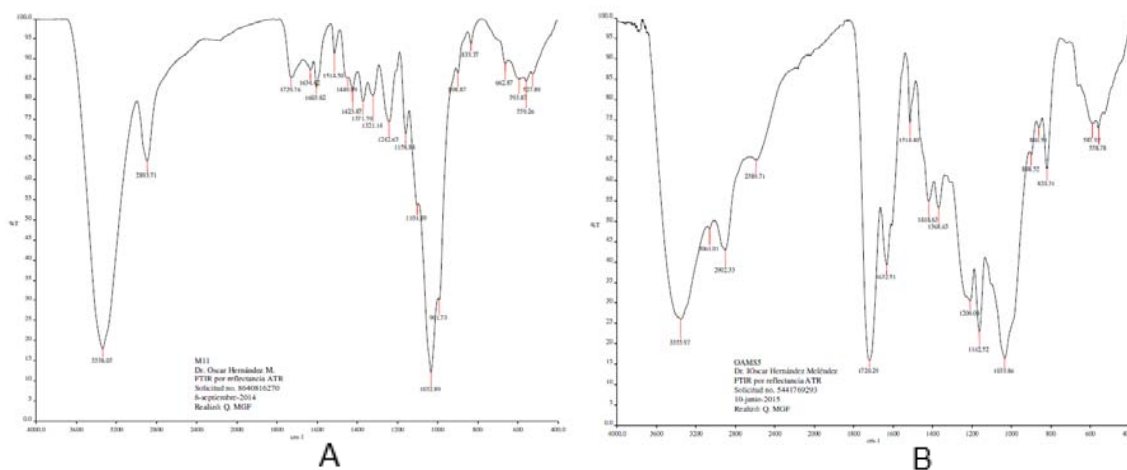


Fig. 12. Análisis realizados por USAI-UNAM (A). Residuo lignocelulósico (bagazo de caña) sin tratamiento químico. (B) residuo lignocelulósico tratado químicamente con anhídrido maléico a 200°C.

En la figura 13 se representa el resultado para el olote de maíz tratado con anhídrido maléico. Este es similar al resultado con bagazo de caña, pero tienen una diferencia muy notable en la banda característica de OH en comparación con los residuos tratados con AA. Dicha banda es muy representativa en los 3300cm⁻¹, por lo que se puede notar una fuerte vibración de los OH por parte del ácido carboxílico y los OH poliméricos en la estructura de los nuevos materiales. De esta manera se da una evidencia de la presencia de ácidos carboxílicos en la estructura. También se puede notar la presencia del doble enlace en la estructura, que es aún visible por FTIR y que se pueden apreciar por su banda característica alrededor de los 3020cm⁻¹, que se ve traslapada con la fuerte interacción de la banda de los OH. Se puede confirmar esta interacción con las flexiones fuera del plano C-H alrededor de los 800cm⁻¹, y flexiones en el plano C-H por el mismo grupo alrededor de los 1400cm⁻¹. Las bandas se pueden ver desplazadas y no corresponden exactamente a lo reportado teóricamente en tablas.

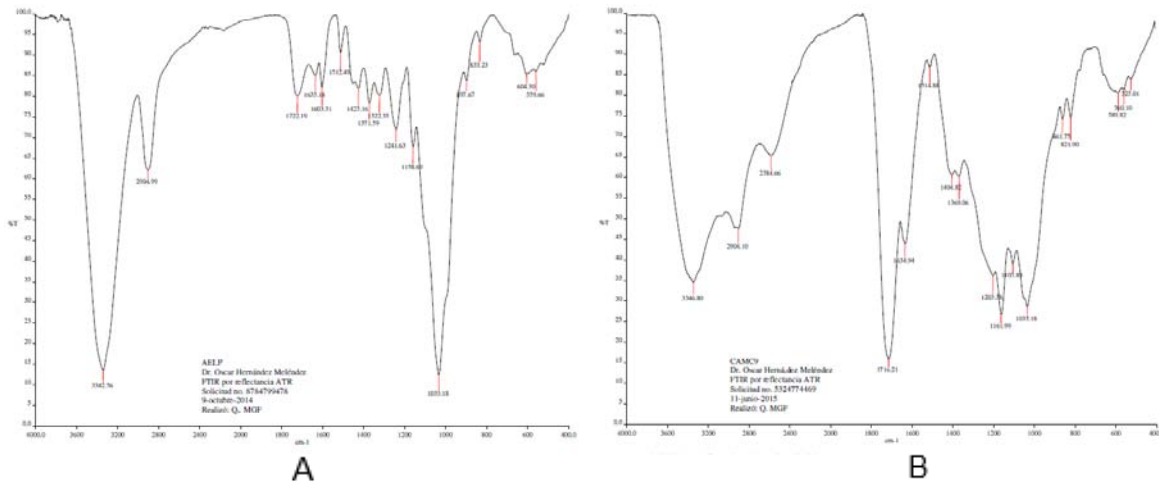


Fig. 13. Análisis realizados por USAI-UNAM. (A) residuo lignocelulósico (olote de maíz) sin tratamiento químico, (B) residuo lignocelulósico tratado químicamente con anhídrido maléico a 200°C.

10.3. Morfología de los residuos. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Dadas las especificaciones de los materiales antes y después de su tratamiento, podemos apreciar en SEM como sus estructuras sufren un cambio físico evidente. La estructura de los residuos tratados con anhídrido maléico presentan una estructura más polimerizada con respecto a las tratadas con anhídrido acético.

En la figura 14 se muestra la diferencia visual entre el bagazo de caña sin tratamiento, el tratado con anhídrido acético y el tratado con anhídrido maléico, donde apreciamos cambios importantes en su morfología original.

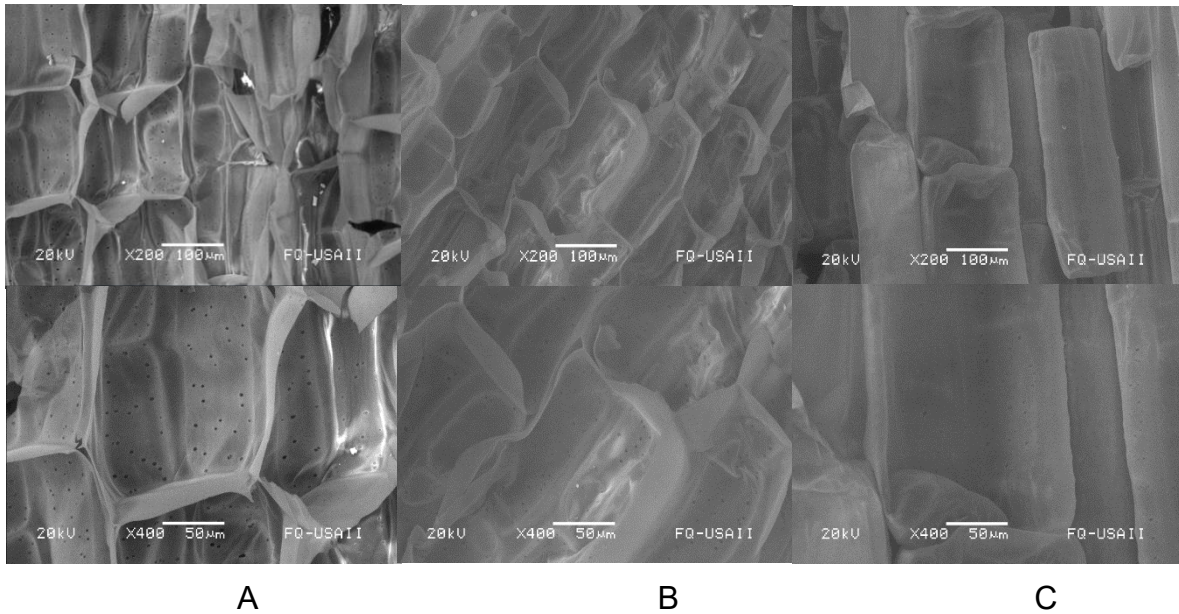


Fig. 14. Imágenes realizadas por USAI-UNAM. Bagazo de caña de azúcar. (A) Bagazo de caña sin tratamiento, (B) bagazo de caña tratado con anhídrido acético, (C) bagazo de caña tratado con anhídrido maléico.

En la imagen A de la figura 14 se aprecia cierta porosidad que se ve reducida con el tratamiento con AA, ya que éste recubre de manera significativa los poros naturales del residuo lignocelulósico. El tratamiento con AM que se representa en la figura C, presenta un resultado muy diferente, ya que se nota un mayor grado de polimerización superficial, donde la cavidad en el residuo sin tratamiento desaparece casi en su totalidad, reflejando cambios significativos.

El tratamiento sobre el residuo de olote de maíz, es equivalente al del bagazo de caña, pero se notan diferencias más marcadas en SEM, ya que el material es muy poroso. El tratamiento con AM muestra un cambio notable en su morfología, en comparación con la modificación con AA, donde se aprecia que el material es recubierto casi en su totalidad, como puede apreciarse en la figura 15-C.

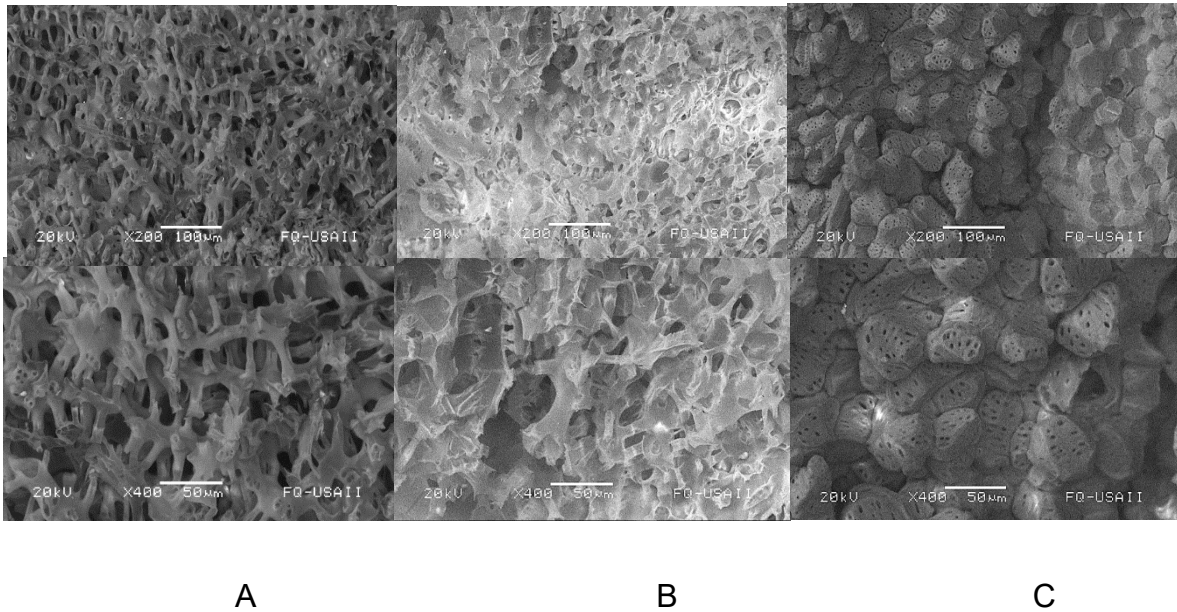


Fig. 15. Imágenes realizadas por USAI-UNAM. Olote de maíz. (A) Olote de maíz sin tratamiento, (B) olote de maíz tratado con anhídrido acético, (C) olote de maíz con anhídrido maléico.

Es importante destacar que el anhídrido maléico injerto presenta en su estructura un doble enlace, que es susceptible de polimerización empleando las condiciones apropiadas.

10.4. Ganancias en peso.

En este punto se reportan de forma detallada los porcentajes de ganancia en peso para los diseños experimentales propuestos en la sección 9.3, que puede tratarse como una ganancia o pérdida del mismo, ya que estos al ser modificados químicamente pueden cambiar su peso. Esto se debe a que parte del residuo puede solubilizarse o perderse al suspenderse en el medio de reacción (Chamú-Muñoz y cols, 2015). Mediante la ganancia en peso se da una evidencia adicional de que la reacción se efectúa. Los tratamientos de esterificación se muestran a continuación en una gráfica tridimensional de ganancia en peso vs temperatura y tiempo de reacción.

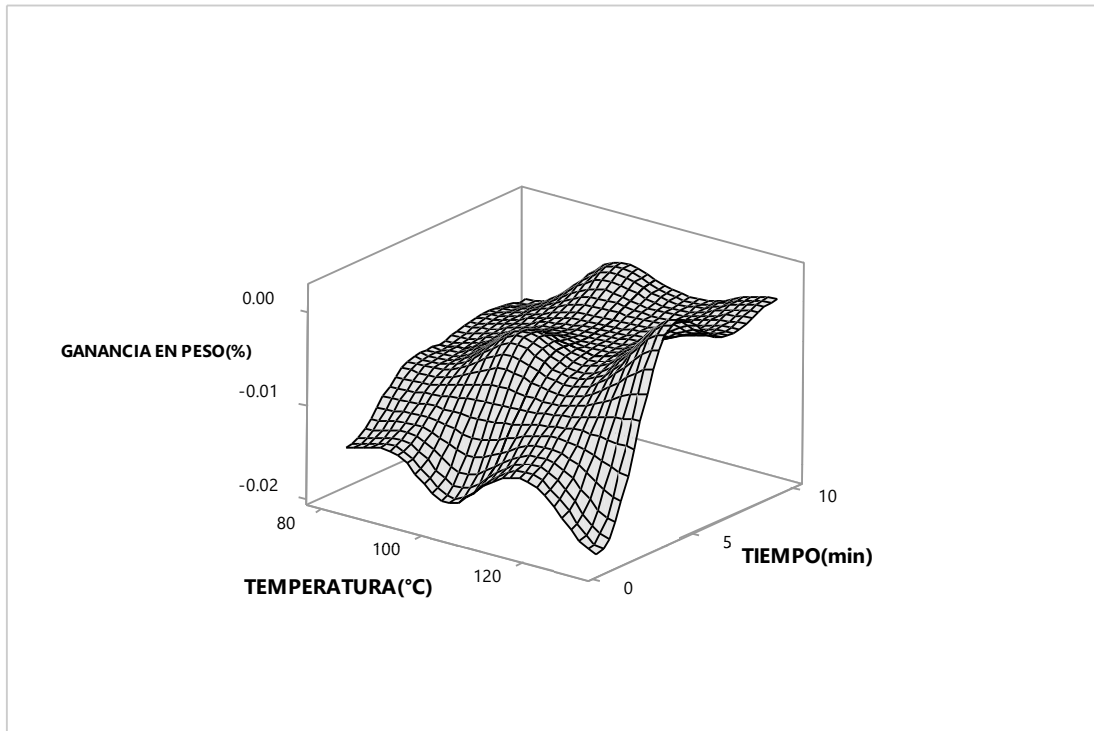


Fig. 16. Grafica para Bagazo de caña tratado con anhídrido acético.

En la figura 16 se aprecia la ganancia en peso por el tratamiento con anhídrido acético para el bagazo de caña, que es mayor al aumentar el tiempo de residencia. La temperatura de reacción parece tener un efecto menor sobre la ganancia en peso. Puede apreciarse que se presentan valores negativos, aunque tienen una tendencia en aumento de peso al aumentar el tiempo de residencia (Chamú-Muñoz y cols., 2015). Las pérdidas pueden atribuirse a una fragmentación parcial de las paredes celulares y/o a la presencia de materiales solubles en el bagazo de caña nativo. La celulosa es insoluble en este medio, esto puede garantizar que la mayor parte de la fibra neutra estará presente después de la reacción y que dicho ajuste en la solvatación de ciertos componentes solubles en el AA producirá un mayor porcentaje de celulosa en su estructura.

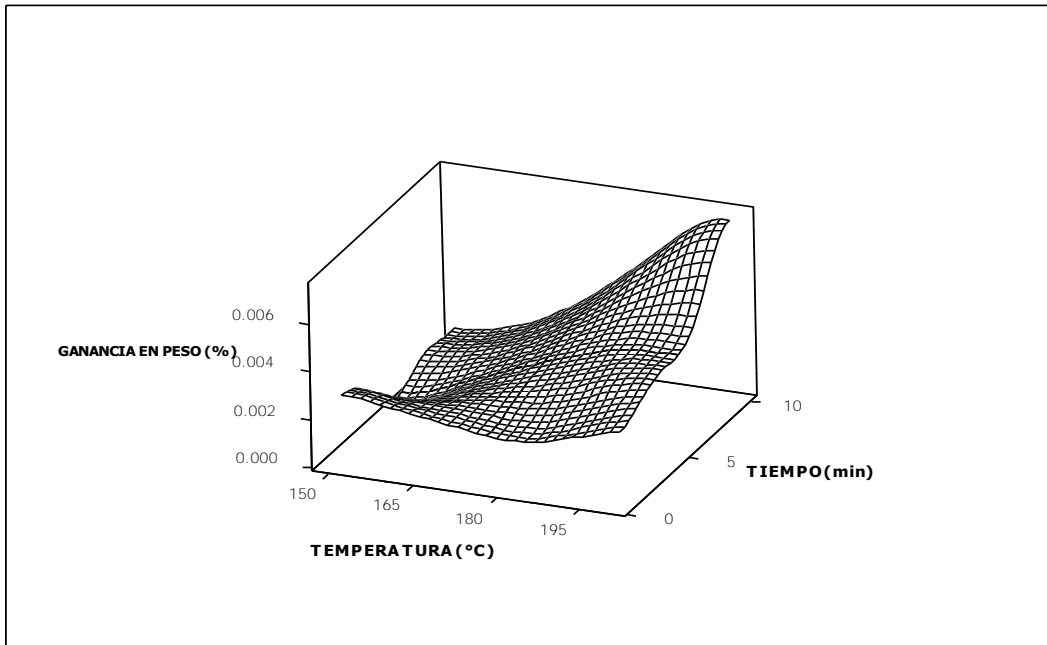


Fig. 17. Grafica para Bagazo de caña tratado con anhídrido maléico.

En la figura 17 se muestra la gráfica del bagazo de caña tratado con anhídrido maléico, donde éste presenta una mayor ganancia de peso a temperaturas altas y tiempos de residencia mayores a los 5 minutos. Este comportamiento parece indicar que este anhídrido presenta una temperatura de activación mayor, por lo tanto, se determina que el punto óptimo para la reacción es de 200°C y 10 minutos.

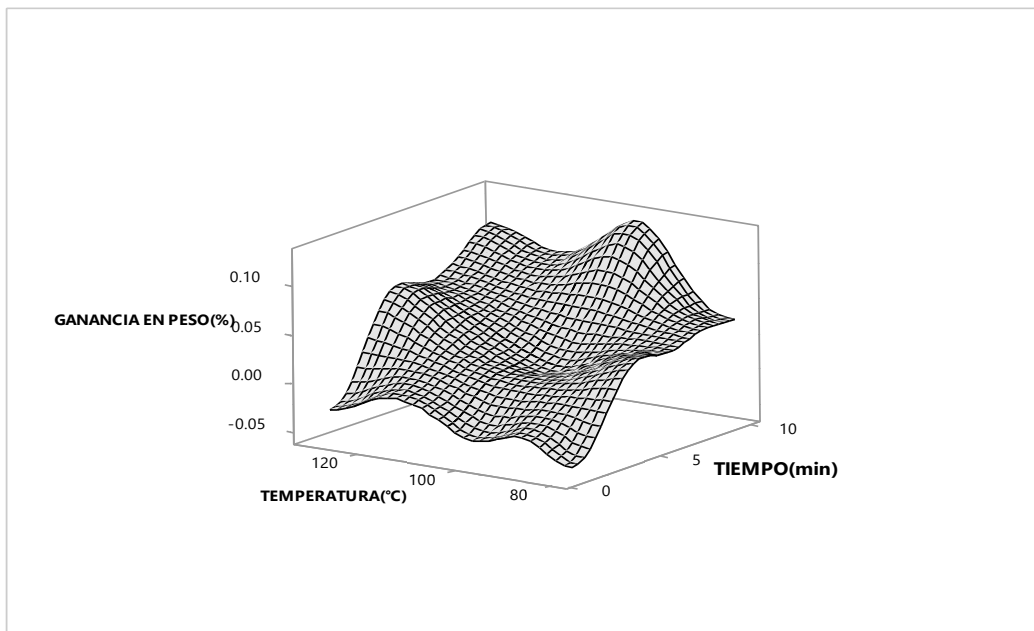


Fig. 18. Grafica para olote de maíz tratado con anhídrido acético.

En la figura 18 se nota una ganancia en peso más significativa, donde altos valores de temperatura y de tiempo de residencia generan los mejores resultados para la reacción entre el anhídrido acético y el olote de maíz. Con base en las figuras anteriores, la matriz de olote de maíz aparenta ser una estructura más estable que el bagazo de caña de azúcar.

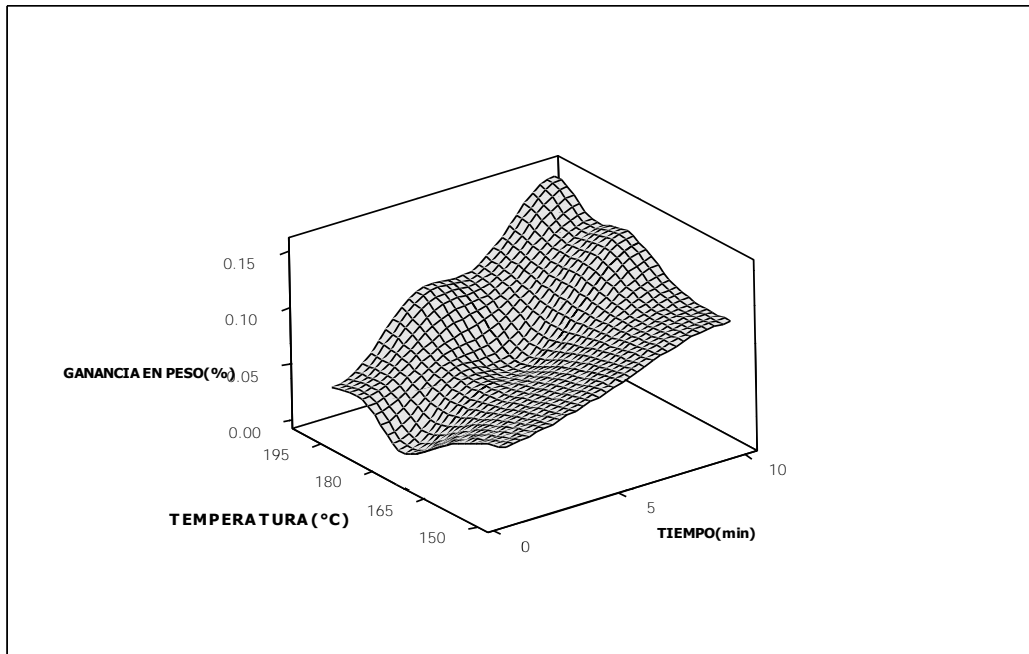


Fig. 19. Gráfica para olote de maíz tratado con anhídrido maléico.

En la figura 19 se presenta la ganancia en peso para el tratamiento de olote de maíz con anhídrido maléico, que presenta la misma tendencia que el gráfico anterior, donde a mayores tiempos de residencia y altas temperaturas se obtienen mejores resultados de ganancia en peso. Con las pruebas experimentales anteriores se pueden determinar los puntos óptimos de reacción para cada residuo, donde se presentarán ganancias de peso más notables y por lo tanto mayores porcentajes de injerto.

Un problema en este tipo de análisis es la presencia de partículas suspendidas del material lignocelulósico en el medio, que como ya se comentó previamente, esto afecta directamente los rendimientos de la reacción, por lo que se tiene que prestar especial precaución a estos procedimientos para rescatar todo el material, y obtener porcentajes precisos de ganancia en peso.

Para ambos materiales estudiados se puede concluir que el efecto combinado de la temperatura y el tiempo repercutirán en una ganancia en peso cuando ambos parámetros independientes aumentan.

10.5. Grafting ATR-FTIR.

Este análisis es muy relevante, ya que se detallan los porcentajes de injerto de manera cuantitativa para las reacciones mencionadas en los puntos anteriores. Para este análisis se utilizó el procedimiento seguido por Hernández-Meléndez y cols., 2009; Chamú-Muñoz y cols., 2015. Se utiliza la espectroscopia ATR-FTIR y se mide el % de área de cada grupo funcional de interés, donde ocurre el cambio más representativo y en particular las bandas de C=O y OH, que son las que presentan mayores cambios después de la reacción. Los siguientes gráficos son representativos del porcentaje de injerto vs temperatura y tiempo de reacción.

$$\text{Grafting} = \left[\frac{\text{área de la banda del grupo carbonilo sin tratamiento (C=O)} - \text{área de la banda del grupo carbonilo sin tratamiento (C=O)}}{\text{área de la banda inicial del grupo hidroxilo sin tratamiento (OH)}} \right]$$

La figura 20 muestra el injerto o *grafting* para el tratamiento de caña de azúcar con anhídrido acético, donde se obtienen injertos por arriba de 0.25 (25%) del total los grupos OH disponibles. En donde la influencia del tiempo de residencia y en menor grado de la temperatura, son las condiciones que determinan el grado de injerto obtenido.

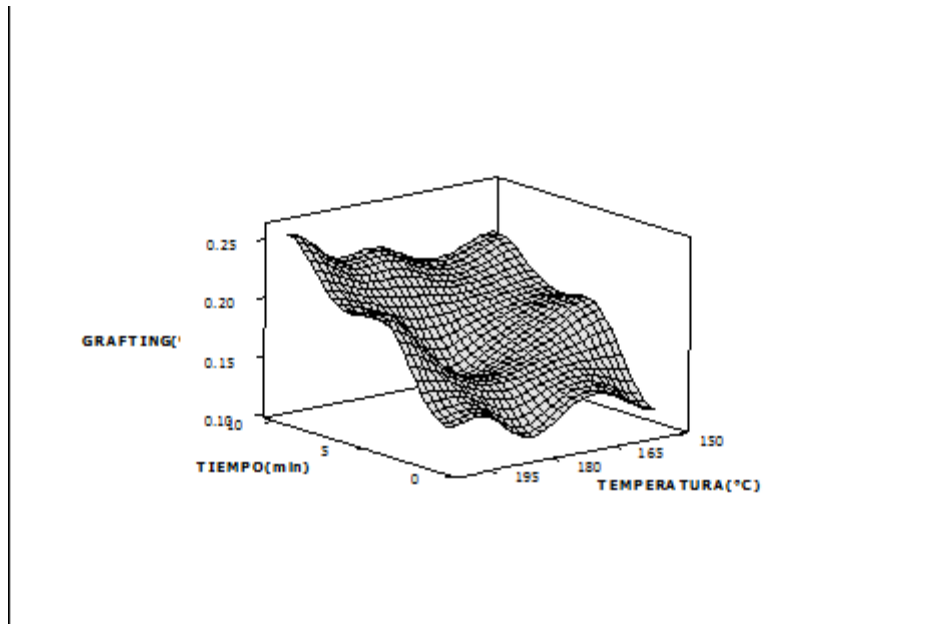


Fig. 20. Gráfica de injerto o "grafting" para caña de azúcar tratada con anhídrido acético.

Se comprueba con los análisis gravimétricos y mediante el análisis cuantitativo de los espectros IR que la selectividad y eficiencia de la reacción de esterificación depende de la estructura del residuo y de la capacidad de penetración de cada uno de los monómeros hacia los polímeros naturales.

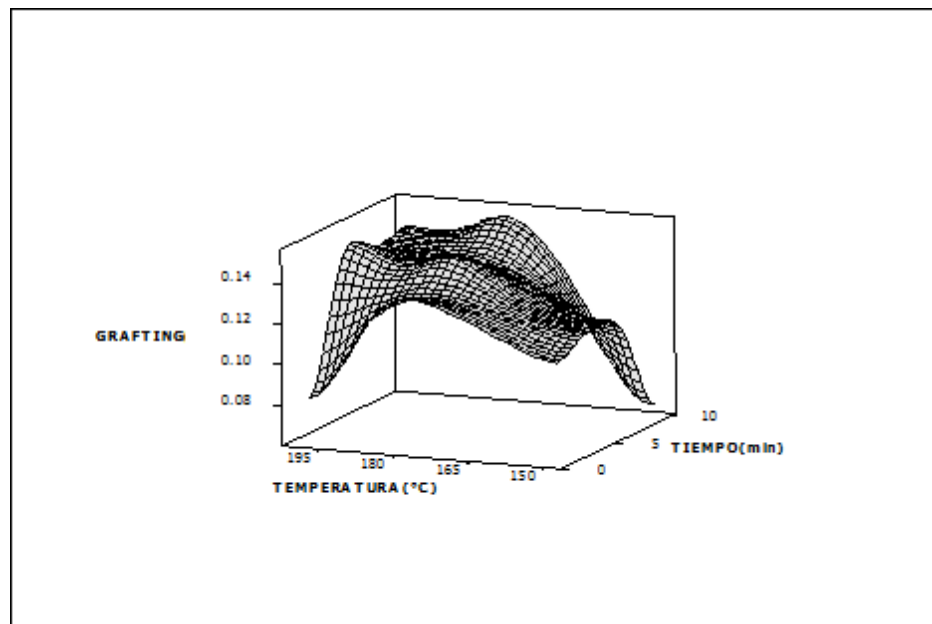


Fig. 21. Gráfica de injerto o "grafting" para caña de azúcar tratada con anhídrido maléico.

En la figura 21 se aprecian valores de injerto aceptables al combinar temperaturas de reacción moderadas y tiempos de contacto bajos, de esta manera se asegura que la integridad del material se mantenga. Por otro lado, la combinación de temperaturas altas y tiempos de contacto elevados favorecen valores altos de injerto. Por el contrario, la combinación de tiempos cortos o temperaturas bajas no favorecen del todo los porcentajes de injerto.

En los análisis por FTIR se presenta un incremento notable en la banda de los grupos carbonilos, aún mayor que en los residuos tratados con AA. Teniendo en cuenta este tipo de bandas, se nota la presencia de un ácido carboxílico, que ocurre con gran intensidad por arriba de los 3000 cm^{-1} y que dificulta los cálculos de injerto o “*grafting*”, al verse muy alterado el espectro por esta banda en especial.

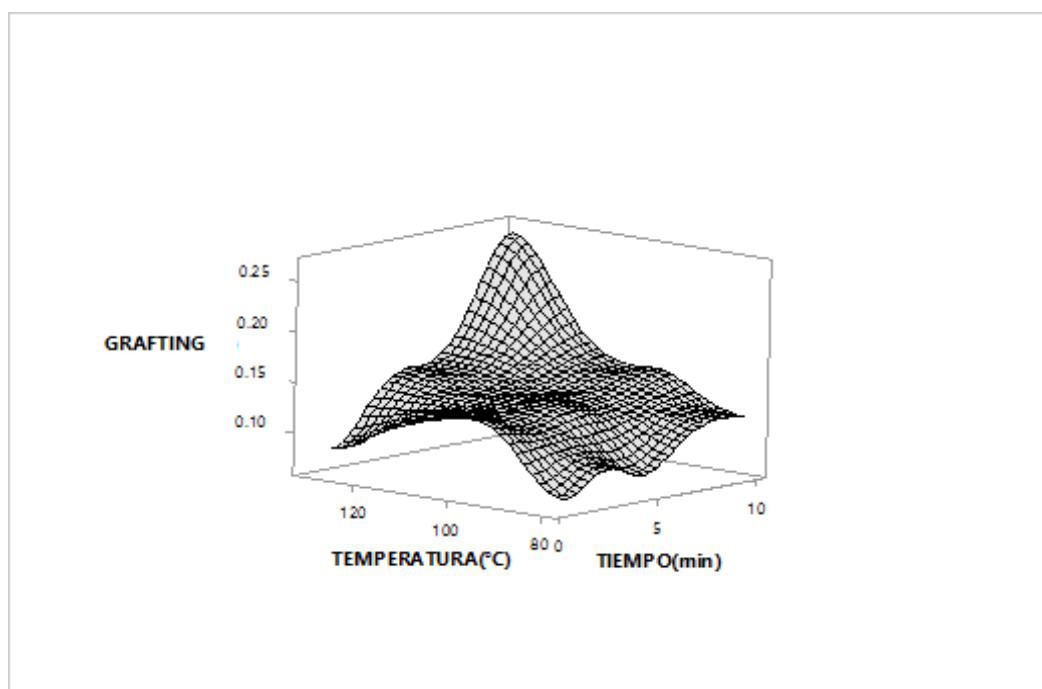


Fig. 22. Gráfica de injerto o “*grafting*” para olote de maíz tratado con anhídrido acético.

El tratamiento con anhídrido acético para el olote de maíz muestra resultados muy similares a los presentados anteriormente con AA y bagazo de caña, como se muestra en la figura 22. De ambos se puede concluir que la selectividad de la reacción aumenta al presentarse tiempos de residencia mayores y temperaturas cercanas a la ebullición del anhídrido. Se puede notar que el injerto en el material lignocelulósico pueden llegar a ser de hasta 0.25 (25% del total de los grupos OH

originales). Como resultado del tratamiento con AA se aprecian injertos más alto en comparación con el AM. En lo referente al anhídrido acético, éste muestra espectros en IR más finos, como lo vemos en la figura 9 y 10, en comparación con los de anhídrido maléico en la figura 12 y 13, lo que representa un procedimiento más sencillo para producir materiales compuestos, con gastos energéticos menores en comparación con el uso de anhídrido maléico.

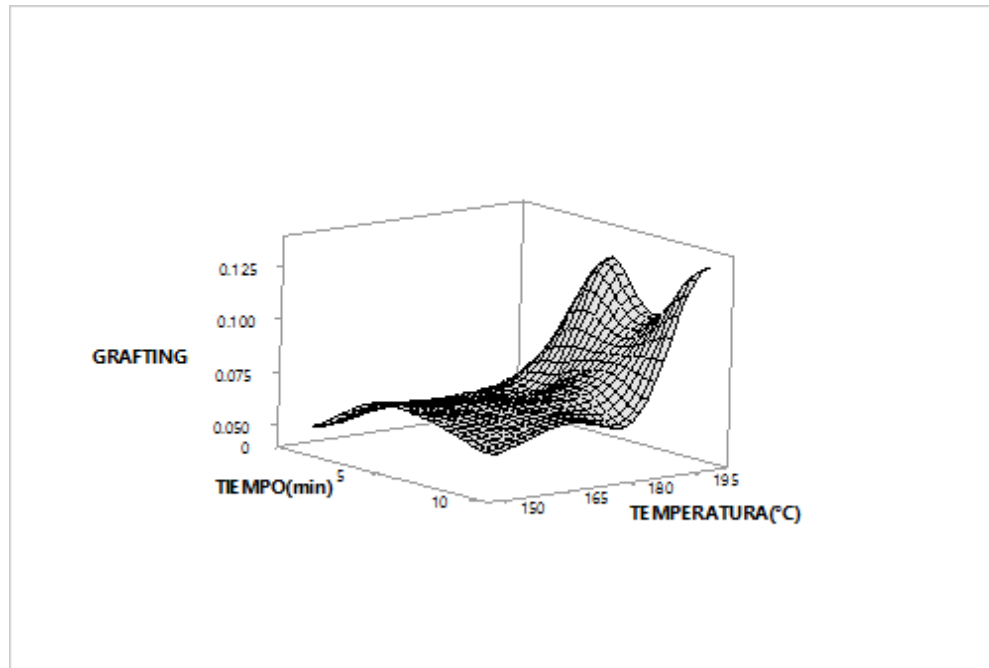


Fig. 23. Gráfica de injerto o "grafting" para olote de maíz tratado con anhídrido maléico.

Los tratamientos con anhídrido maléico y olote de maíz son más selectivos a temperaturas más altas, como se muestra en la figura 23. Con relación a su espectro de IR, ésta muestra cambios importantes a tiempos de residencia mayores y temperaturas moderadas. Como ya se mencionó, los materiales sintetizados muestran cambios notables en sus propiedades físicas, desde la superficie hasta el interior de la matriz.

A partir de los resultados mostrados con anterioridad, se tomaron 3 muestras de referencia para los experimentos siguientes, siendo estos la caña de azúcar tratada con AA Y AM a 130°C y 200°C respectivamente y de la misma manera para los residuos de olote de maíz, ya que estos presentaron grandes coincidencias y fueron empleados en la experimentación posterior.

10.6. Pruebas de densidad.

Las pruebas de densidad señaladas a continuación para el residuo de caña dan otra evidencia de cambio en el material lignocelulósico después de la modificación química, estos se calculan de manera experimental con la ecuación $\delta = m/v$, donde:

δ = densidad de las partículas.

m= masa del residuo.

v= volumen del líquido desplazado por las partículas.

10.6.1. Pruebas de densidad para caña de azúcar.

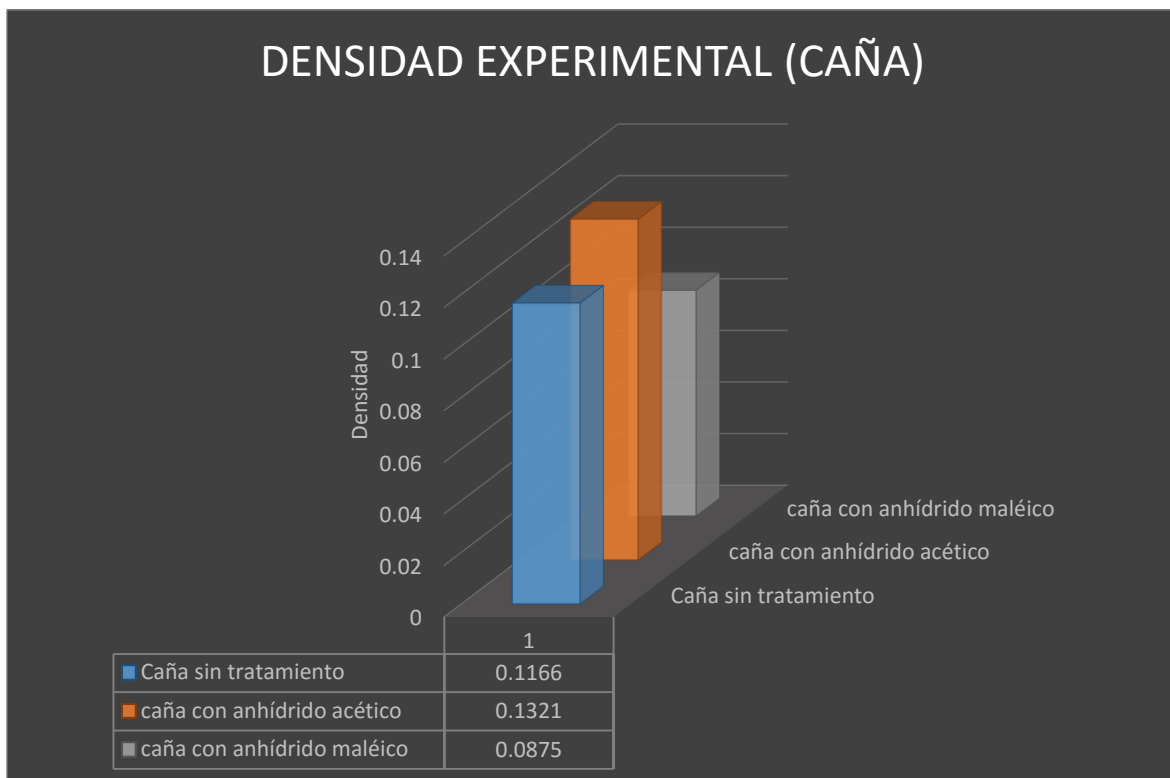


Fig. 24 . Densidad de la caña.

Se puede observar en la figura 24 que se tiene una notable reducción de la densidad al tratar con anhídrido maléico el residuo lignocelulósico y un incremento de densidad al tratar con anhídrido acético. Para el caso del AA puede ser de gran ayuda para mantener el residuo inmerso en medios líquidos. Contrariamente, el residuo tratado con anhídrido maléico al ser colocado en el fondo de un medio líquido sin agitación como la acetona o el agua tiende a flotar.

10.6.2. Pruebas de densidad para olote de maíz.

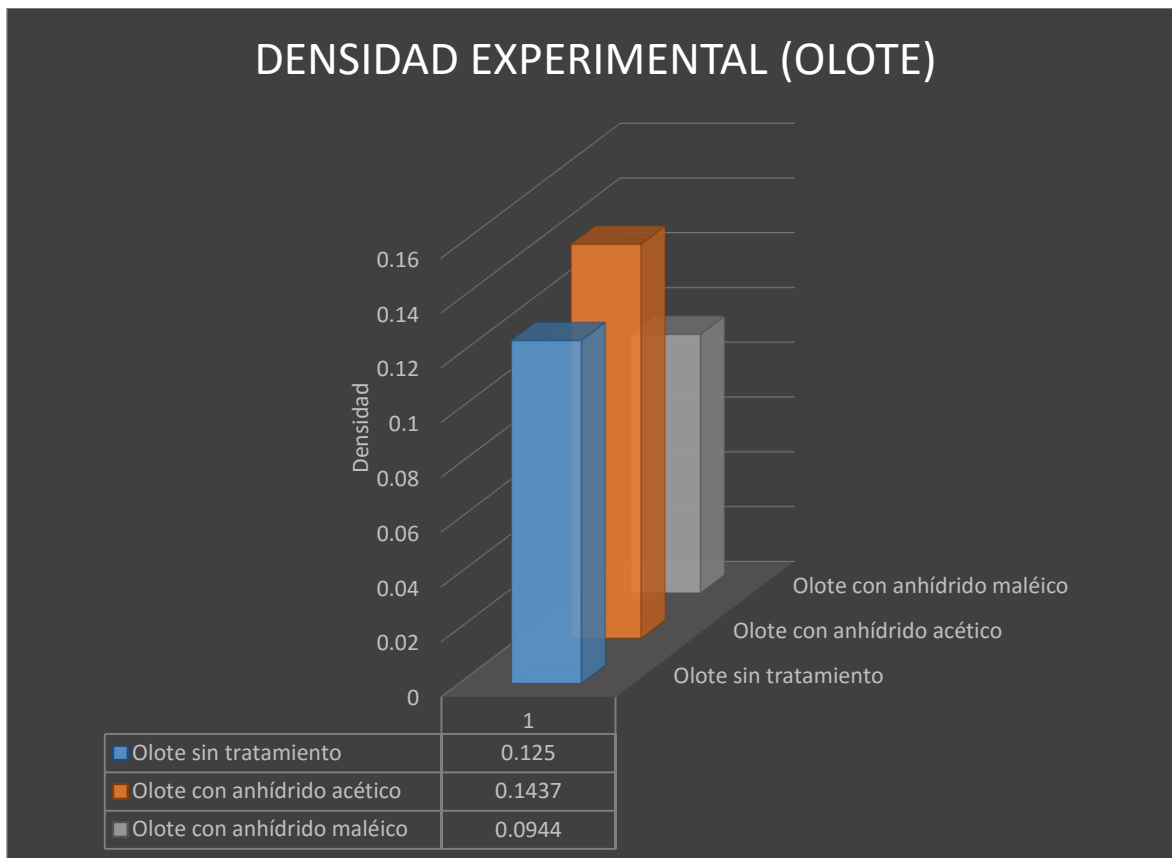


Fig. 25 . Densidad del olote.

La modificación con anhídrido maléico presenta más cambios en todos los sentidos, como lo es la presencia de grupos funcionales nuevos, injerto, ganancia en peso y en este caso una disminución notable en la densidad como se observa en la figura 25. Así mismo presenta un cambio significativo en el volumen, conteniendo más aire en su interior, lo que lo hace flotar por más tiempo y tener poros más abiertos. también es relevante que este material se expande como si estuviera hinchado por el agua, pero a diferencia de los otros materiales, no regresa a su forma original como el material crudo o el material tratado con anhídrido acético.

10.7. Pruebas AW.

La actividad acuosa para los residuos funcionalizados seleccionados está representada en un gráfico general (Fig.26), así como para los no tratados. Se realizó la prueba a una temperatura promedio de 23°C, donde se mantuvieron los

residuos por 15 días en cajas de Petri cerradas y selladas en un desecador para evitar fugas por evaporación.

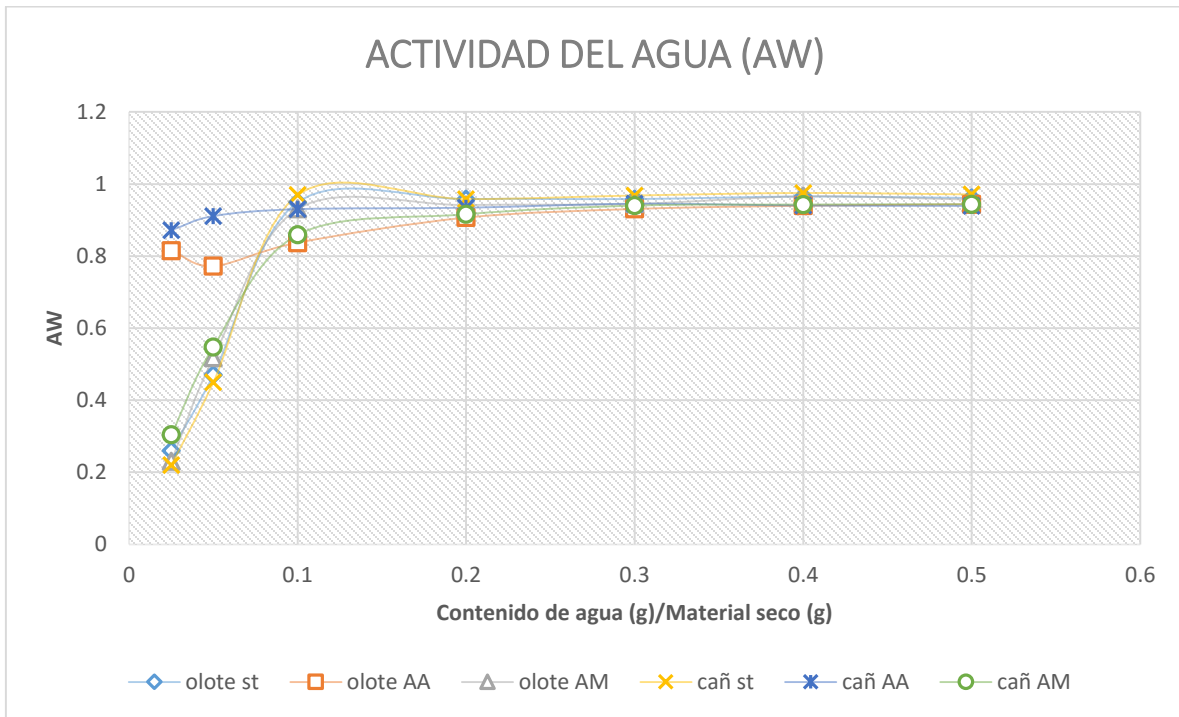


Fig. 26. AW para los residuos lignocelulósicos. st = sin tratamiento.

En el gráfico anterior se aprecia que las muestras que se sometieron al tratamiento con anhídrido acético presentan una capacidad baja para retener el agua, que puede explicarse en términos de la formación de ésteres hidrofóbicos y la disminución de los grupos hidroxilos para interactuar con el agua. También puede explicarse en términos de la generación de una cobertura superficial hidrofóbica del olote y de la caña, que es evidente al realizar estudios de microscopía electrónica de barrido, limitando la interacción de la matriz con el agua. Las muestras tratadas con anhídrido maléico y las muestras sin modificación química presentan una interacción más fuerte con el agua, sobre todo al haber una relación de contenido de agua/material seco menor. A medida que esta relación se va incrementando, todos los materiales empiezan a presentar un comportamiento similar, tendiendo a un valor de $A_w=1$. En la gráfica de la figura 27 se amplifica la zona que comprende una relación de contenido de agua/materia seca de 0.025 a 0.2, donde se hacen más evidentes las diferencias estructurales en todos los materiales (0.5-0.6 puntos en A_w). El material tratado con AA muestra una capacidad débil para retener el

agua. Para el caso del AM, se mantiene una interacción agua-soporte equivalente a la del material crudo, que puede explicarse en términos del intercambio de los grupos OH iniciales por grupos carboxílicos injertados. Caso muy contrario al material tratado con anhídrido acético, ya que en estos se presentan grupos acetato que limitan la formación de puentes de hidrógeno con el agua.

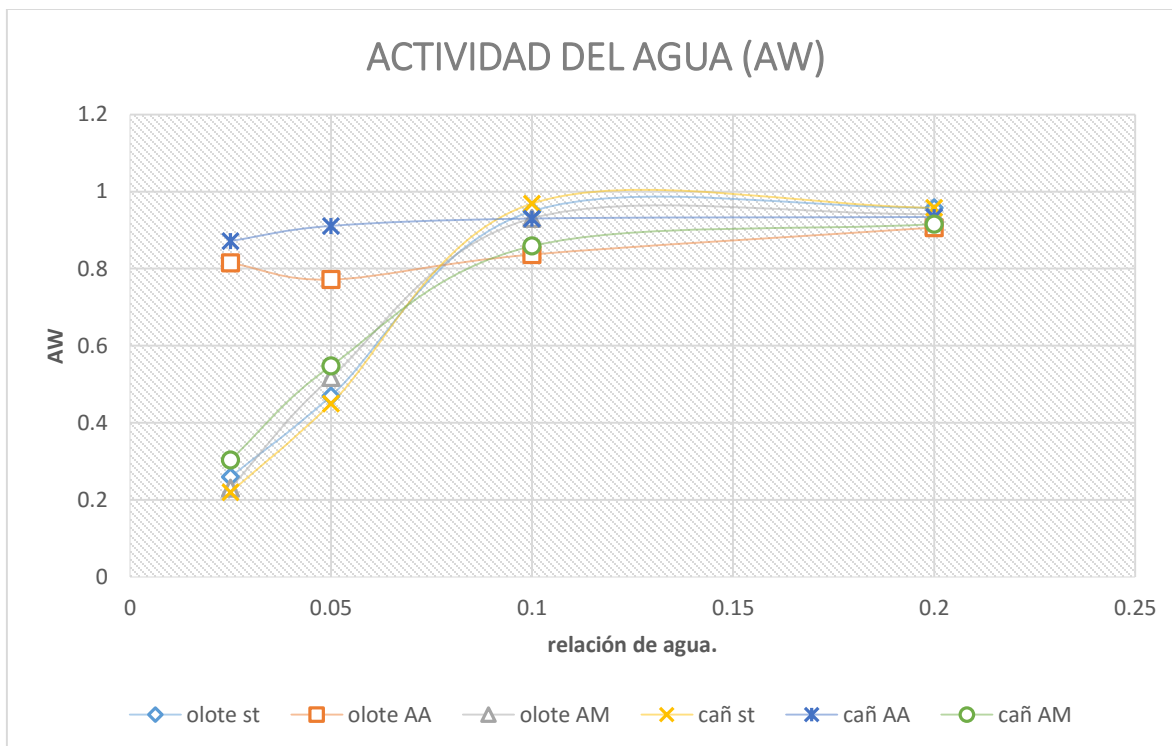


Fig. 27. AW para los residuos lignocelulósicos (amplificación). st = sin tratamiento.

10.8. Sistema de reactores tubulares para la producción de etanol.

El sistema de reactores que se montó inicialmente corresponde a 6 reactores tubulares conectados en serie como se muestra en la figura 28, con el que se pretendía realizar la activación simultánea de la levadura. Sin embargo, se presentaron problemas en el arreglo, la hidrodinámica, el control de pH, y la regulación del sistema atmosférico.

Dicho arreglo se modificó, operando un reactor tubular a la vez y de forma independiente para cada uno de los soportes. Se monitoreó por separado el avance en cada uno de ellos a lo largo de 1.5 a 2 semanas.



Fig. 28 . Arreglo en serie de reactores tubulares.

Para los arreglos mencionados se utilizó levadura liofilizada (*Saccharomyces cerevisiae*) Ale Yeast. Ésta se activó y se monitoreó por medio de una tinción de Gram y se observó al microscopio para determinar si aún estaba activa, empleado cultivos de control en tubo de ensayo, como se mencionó con anterioridad. Se utilizó una tinción de Gram simple con safranina en cada cultivo de control, que se observó al microscopio a 40X de resolución, como se observa en la figura 29. Donde la coloración roja es el color de la safranina y con el cual se tiñen las levaduras al contacto con este. Se concluyó que la levadura está activa y que es apta para los experimentos posteriores.

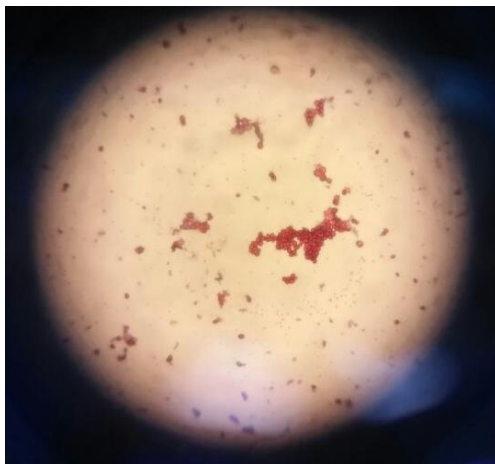


Fig. 29. Tinción de gram en la activación de la levadura a 40X.

En cada reactor se tiene control de la hidrodinámica, el pH, y los suministros de aire y nitrógeno independientes permitiendo el monitoreo más eficiente del bio-proceso (figura 30).

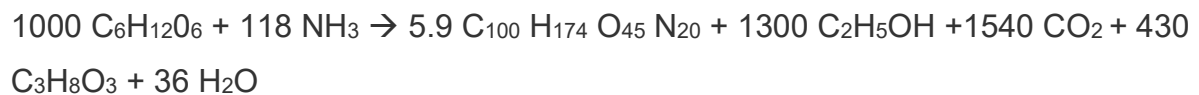


Fig. 30. Arreglo único para cada reactor tubular.

En este bio-proceso se parte de una mezcla rica en nutrientes para la producción de levaduras por 6 días a una temperatura entre 28-30°C. Al terminarse la glucosa, se decanta cuidadosamente el líquido sobrante presente en el contenedor (por medio de la bomba peristáltica), dejando el soporte empacado en la columna plagada en levaduras, que se inmovilizaron en el tiempo de producción de biomasa. Se cambia el medio a glucosa sola (100 g/L) y se pone anaerobio el sistema con el soporte plagado de levaduras, mismo que se puede observar en la figura 31, donde el soporte dentro del reactor tiene una cubierta blanca que corresponde a las levaduras inmovilizadas. La producción de etanol en este proceso se recomienda a una temperatura de 16°C aproximadamente (Archundia, 2014), pero las condiciones ambientales del laboratorio (23-28°C) impidieron mantener la temperatura del laboratorio por debajo de los 23°C.

Para monitorear en una forma más exacta y cuantitativa la producción de etanol, se realizó una curva patrón de etanol en agua por cromatografía de gases (figura 34 y anexo 1).

Por cada 100g de glucosa se obtienen teóricamente 116 ml de alcohol aproximadamente, lo que equivale a 91.52 g de etanol, pero éste puede variar dependiendo de las condiciones y el sistema que lo contenga. Drapcho y cols. 2008 reportaron el siguiente balance de materia para una levadura en condiciones anaeróbicas, usando $C_{100} H_{174} O_{45} N_{20}$, como una fórmula representativa para la biomasa.



De la siguiente manera se preparó una curva patrón (figura 32) a partir de alcohol etílico anhidro, donde se inyectó por triplicado y se aprecia en la figura 31 un cromatograma limpio para cada muestra inyectada (anexo 1).

Tabla1. Alcohol etílico en cromatografía de gases (construcción de curva patrón).

DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN CROMATOGRFÍA DE GASES					
Volumen (μL)	Peso (g)	Área 1	Área 2	Área 2	Promedio de áreas
0	0	0	0	0	0
10	0.00789	22.658	28.662	31.054	27.458
20	0.01578	54.061	45.321	54.513	51.298
30	0.02367	69.505	76.043	58.64	68.063
40	0.03156	75.533	107.472	77.421	86.809
50	0.03945	96.433	96.329	98.361	97.041
60	0.04734	114.411	110.529	141.128	122.023
70	0.05523	145.044	169.591	125.225	146.620

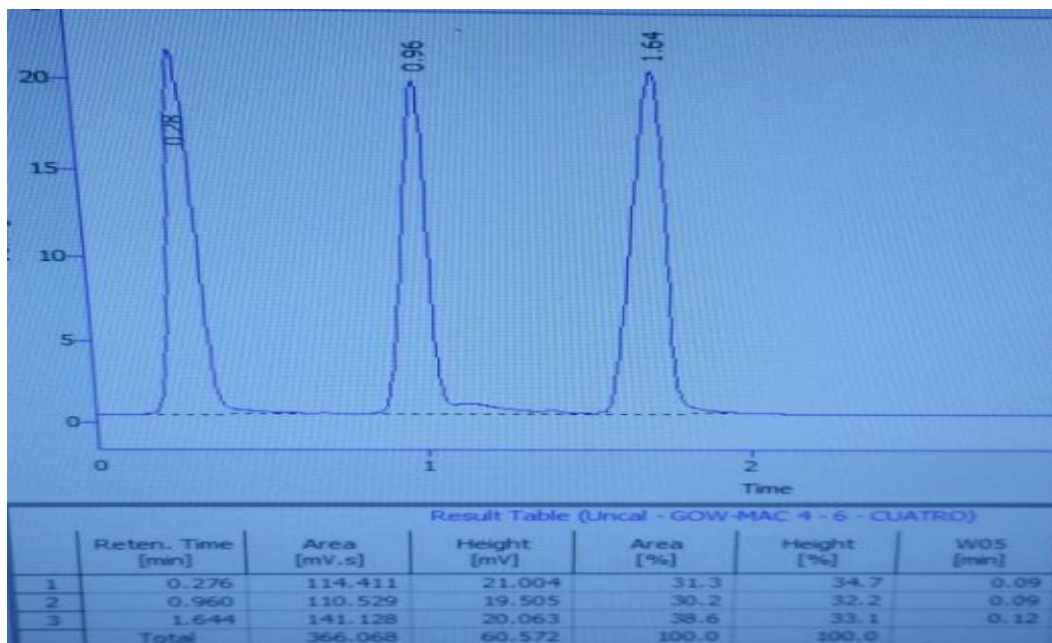


Fig. 31. Cromatograma para una muestra de alcohol etílico.

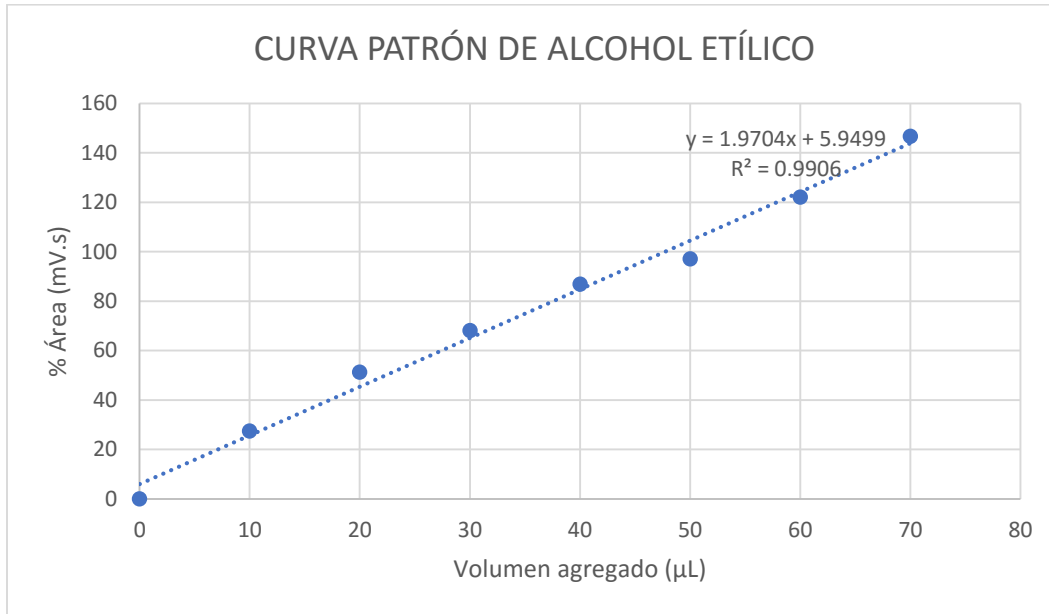


Fig. 32. Curva patrón para determinación cuantitativa de etanol.

11. Producción de biomasa.

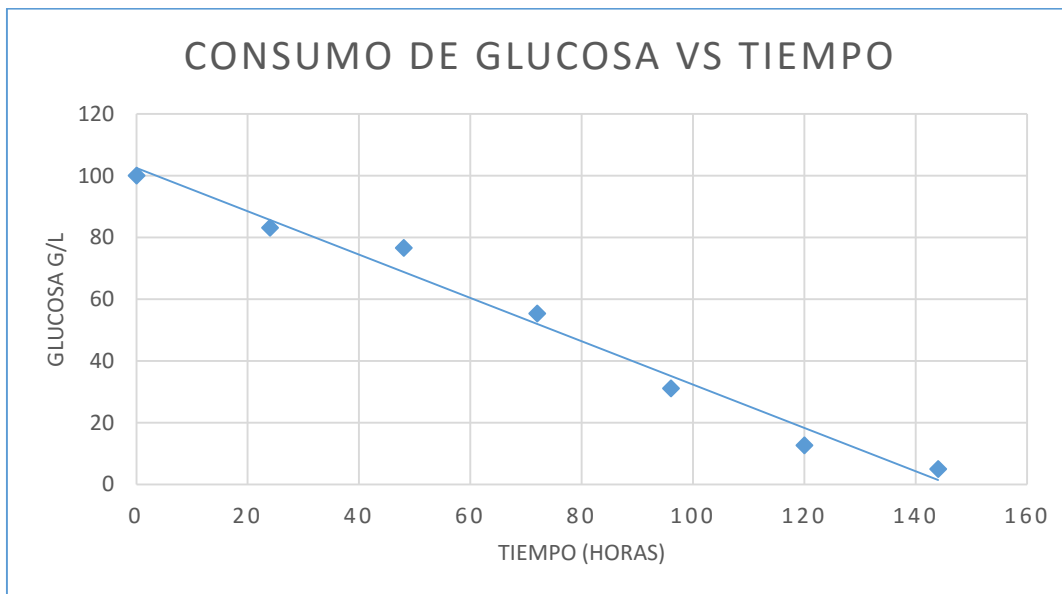


Fig. 33. Gráfica de consumo de glucosa vs tiempo (primer ciclo).

En la figura 33 se muestra el consumo de glucosa general para todos reactores, ya que no presentan una varianza significativa entre ellos. Éstos se trabajaron en condiciones iguales, presentando una tendencia lineal y muy similar para los mismos tiempos en la producción de biomasa. El consumo de glucosa se monitoreó cada 24 horas, hasta llegar al sexto día, donde la glucosa ya es menor a los 4 g/L.

11.1. Caña sin tratamiento (producción de etanol).

Este reactor contiene el bagazo de caña sin tratamiento químico empacado en el reactor tubular según se aprecia en la figura 34. Este proceso se ve evidenciado por la presencia de una gran cantidad de levaduras mediante la tinción de Gram, y por la apariencia del soporte cubierto de biomasa. Sin embargo, la hinchazón del material al contacto con el medio acuoso hacer variar el volumen del reactor, provocando su compactación y taponamiento en algún momento del proceso. No obstante, el bagazo de caña nativo presentó buenas condiciones para la levadura al momento de crecer e inmovilizarse en este soporte.

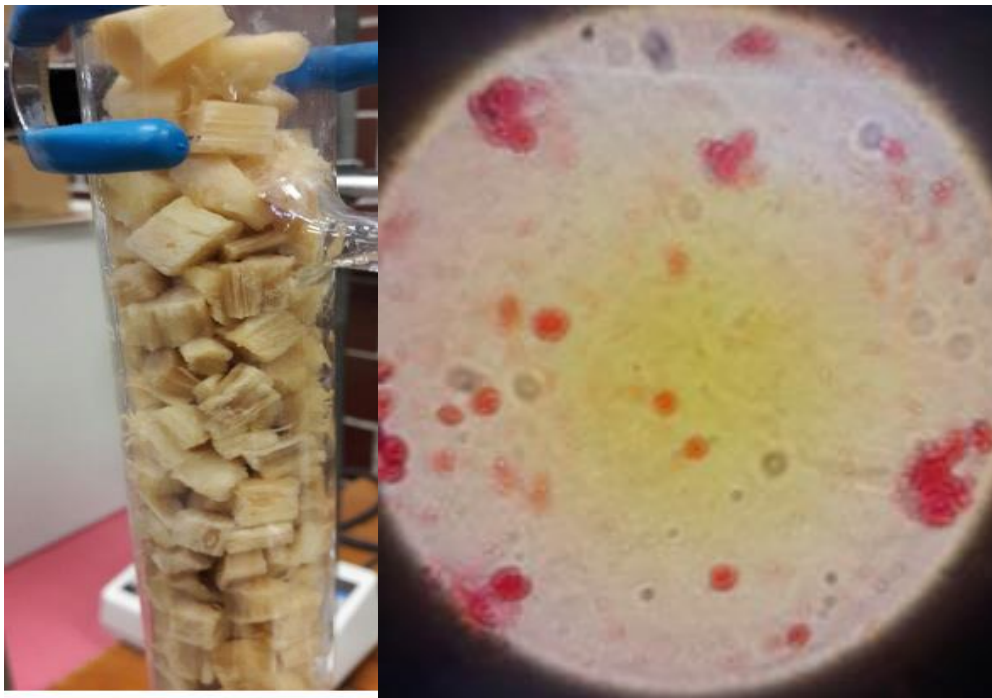


Fig. 34. Soporte de caña sin tratamiento plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala.

También se observa que la producción de etanol, en este soporte es favorecida en las primeras 48 horas, donde se nota un avance significativo en los consumos de glucosa y en la producción de etanol (figura 35). El alcohol etílico al ser volátil presenta pérdidas en tiempos posteriores (ver figura 35) donde se nota que disminuyen las concentraciones de glucosa conforme pasa el tiempo. La explicación que puede darse es que el etanol puede escapar por la purga con ayuda del arrastre

producido por el nitrógeno que mantiene la atmosfera inerte y cuya salida permite liberar la presión que va generando el CO₂.

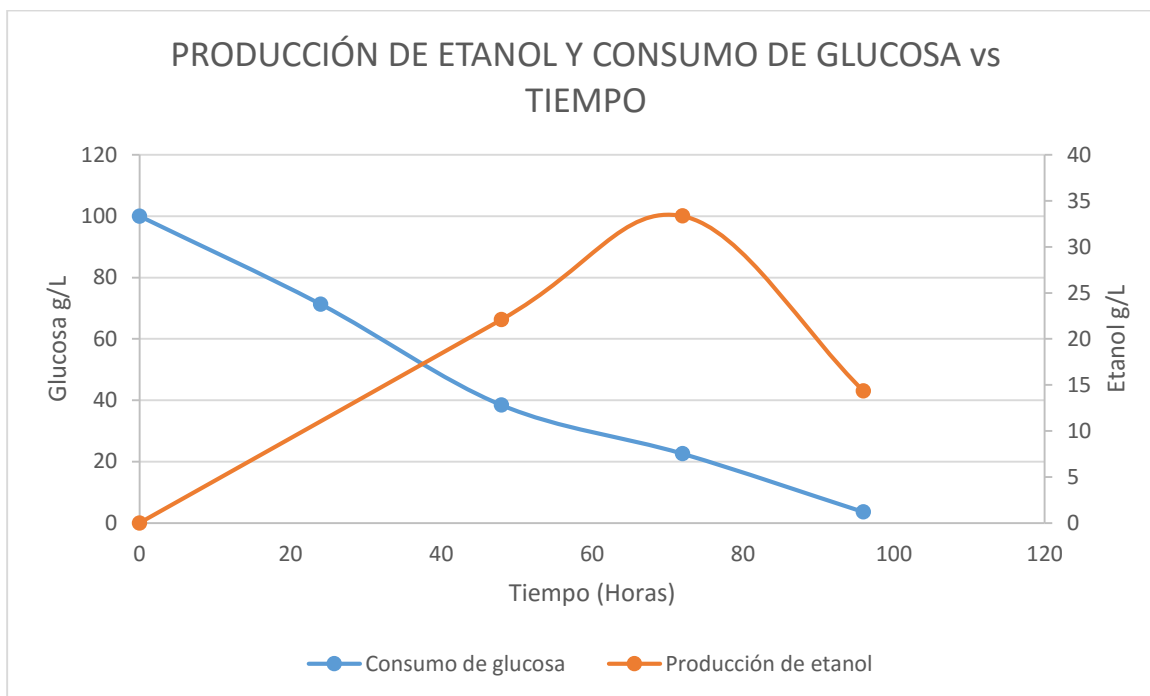


Fig. 35. Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en caña sin tratamiento (segundo ciclo).

11.2. Caña tratada con anhídrido acético (producción de etanol).

En este reactor se notan diferencias más significativas en comparación con el soporte de caña sin tratamiento. Este soporte no presenta una hinchazón notable por absorción de agua, manteniendo en más de un 75% la estructura y volumen inicial. Este tratamiento beneficia al soporte para que no se expanda, como sucede con la caña sin tratamiento al utilizarla como soporte en el reactor. También se pudo observar que la levadura tuvo más afinidad por pegarse a este soporte, ya que al realizar una tinción de Gram se observó una menor suspensión de levaduras en el medio líquido, tal y como se muestra en la figura 36. Esto demuestra una buena inmovilización que se ve reflejada en una producción de etanol aceptable en el ciclo correspondiente.

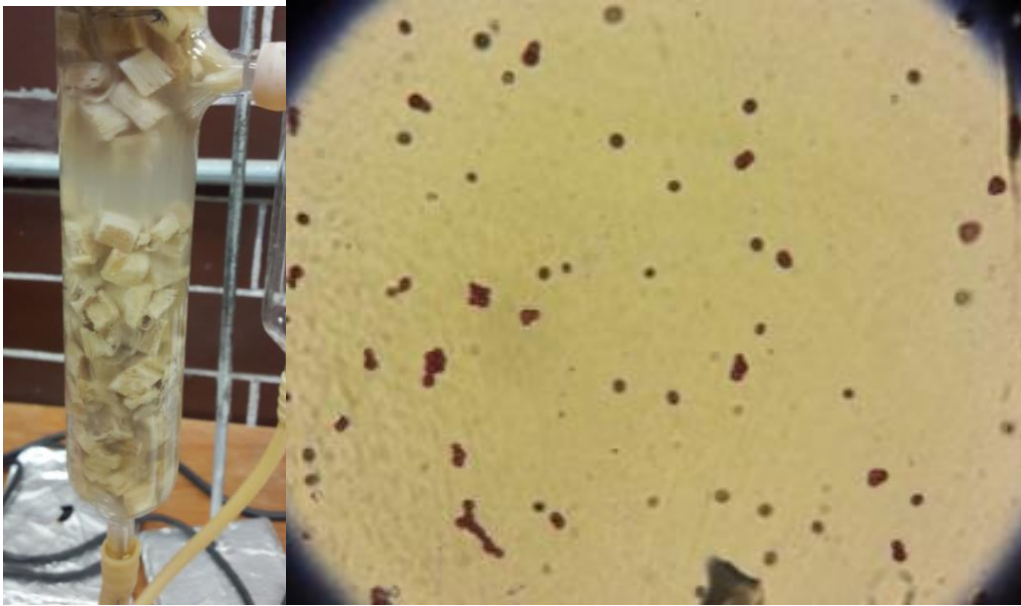


Fig. 36. Soporte de caña con AA plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala (primer ciclo).

Para el soporte lignocelulósico tratado con AA los consumos de glucosa fueron iguales en cuanto al tiempo y la levadura acepta de manera favorable este soporte, así mismo, se presentaron consumos de glucosa que tienden a cero y una gran cantidad de biomasa.

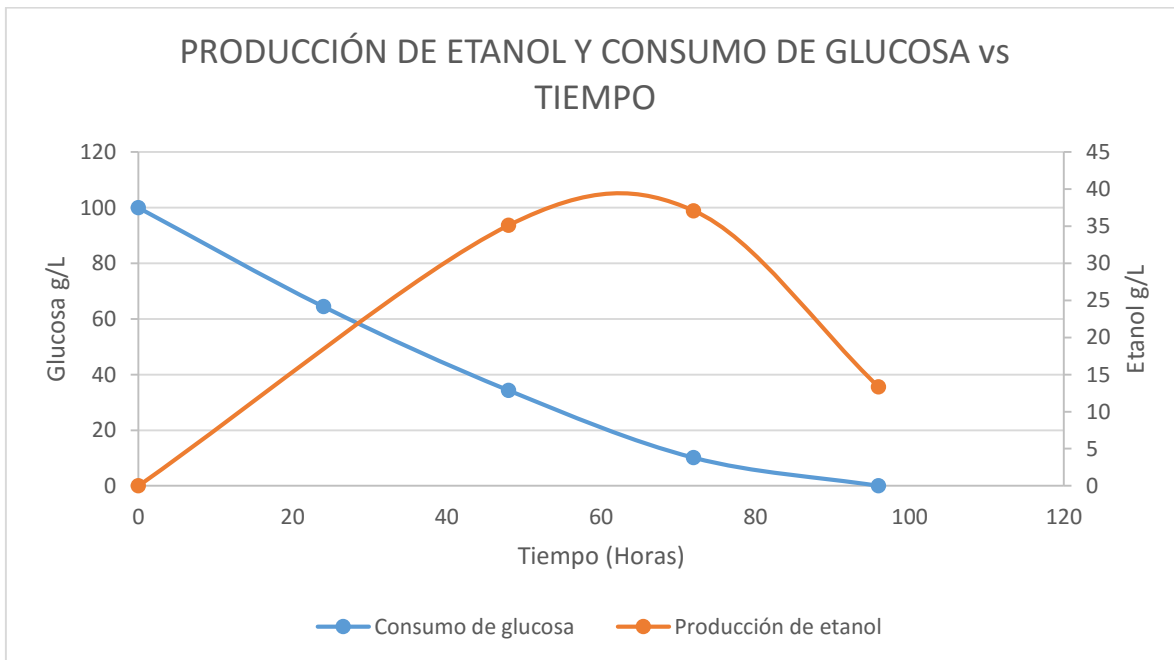


Fig. 37. Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en caña AA (segundo ciclo).

En el gráfico que se muestra en la figura 37, se nota la influencia que tiene el soporte para la producción de etanol, ya que este presenta una producción más eficiente y cercana a los valores obtenidos en la planta piloto de cerveza con evidencia de pérdida por evaporación. La glucosa se sigue consumiendo hasta quedar prácticamente en cero después de 4 días. Para las 24 primeras horas el consumo de glucosa llegó casi al 50%, lo que nos da argumentos para decir que este soporte es muy eficiente y que favorece la producción de etanol en tiempos cortos.

11.3. Caña tratada con anhídrido maléico (producción de etanol).

En este reactor podemos notar que los materiales tratados con anhídrido maléico presentan diversas fallas ante el proceso de inmovilización, ya que son frágiles y aunque se mantiene una producción de biomasa eficiente, esta no presenta resultados favorables en la producción de etanol. Puede presentarse algún tipo de inhibición de la levadura en el proceso de fermentación o por una interacción iónica significativa por parte de los grupos funcionales injertados en estos materiales y las membranas de la levaduras. De la misma manera el material flota y se rompe con frecuencia, tapando los conductos e incrementando el volumen en el reactor tubular como se puede notar en la figura 38. Como ya mencionó, este soporte presenta una fijación aceptable de la levadura en su superficie después de los 6 días de producción de biomasa, y al realizar la tinción de Gram éste presenta poca biomasa dispersa en el medio, lo que en un principio podría calificarse como un buen soporte.



Fig. 38. Soporte de caña con AM plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala (primer ciclo).

Como ya se mencionó, el consumo de glucosa para la producción de biomasa es eficiente, con un tiempo de producción semejante a los anteriores, tardando 6 días el proceso de producción de levaduras, hasta que se cambia el medio para la producción de etanol.

En la figura 39 se puede observar el efecto negativo del soporte en la producción de etanol, ya que la levadura detiene la producción del mismo. Al cambiarse el medio a glucosa sola, aunado a tener el sistema en condiciones anaeróbicas, la glucosa se consume de manera muy limitada después de 6 días. Dadas las circunstancias se descartó este material para el proceso de inmovilización.

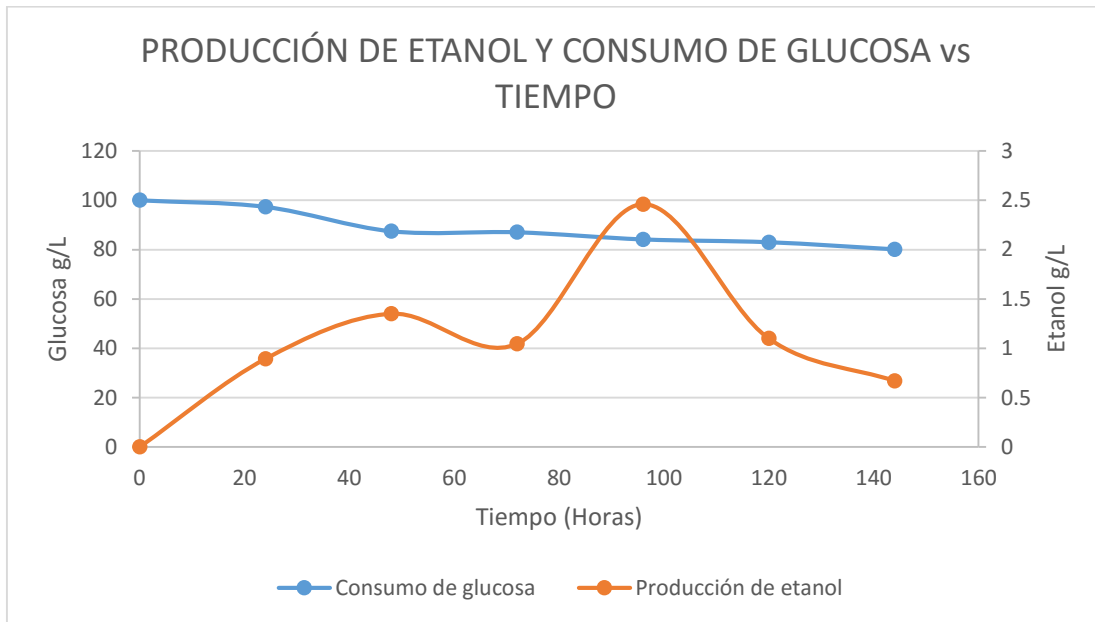


Fig. 39 . Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en caña AM (segundo ciclo).

11.4. Olote sin tratamiento (producción de etanol).

En este reactor tenemos un caso muy similar al del bagazo de caña, donde el residuo lignocelulósico no recibe ningún tratamiento. Se realiza el mismo procedimiento que en los reactores anteriores. En este reactor notamos que el consumo de glucosa para la producción de biomasa tiene la misma tendencia que los reactores anteriores (Figura 33), con una relación similar en la producción de etanol (figura 41).

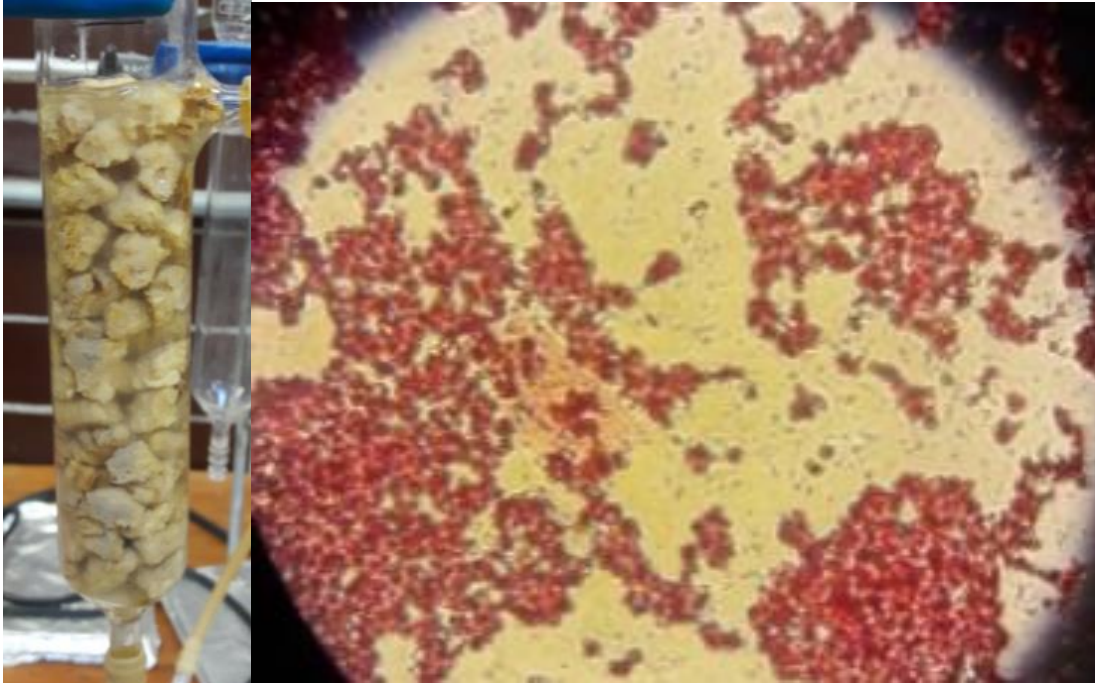


Fig. 40. Soporte de olote sin tratamiento plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala (primer ciclo).

Como se ha presentado en los reactores anteriores, el consumo de glucosa para producir biomasa es eficiente, esto también lo vemos en la imagen del reactor en la figura 40, donde el soporte se ve plagado de levaduras. En la tinción de Gram se presenta una cantidad notable de levaduras en el medio, lo que puede levantar sospecha de que no se están reteniendo en el soporte y que aún siguen dispersas en el medio. Pero esto no es una limitante ya que en resultados posteriores podemos ver que éste tiene una buena producción de etanol en el medio anaerobio, por lo que podemos afirmar que el soporte nativo es un buen candidato para el proceso, además de no presentar un hinchamiento apreciable a simple vista. El consumo total de glucosa en el medio se realiza en 6 días. En la figura 41 se muestra la producción de alcohol etílico para este soporte, donde se aprecia al igual que en los materiales anteriores una producción notable de etanol durante las primeras 48 horas. Posteriormente ésta se reduce como se ha observado previamente, debido a que el etanol puede escapar por la purga del reactor, arrastrado por el nitrógeno del medio, dando lugar a fluctuaciones en las concentraciones del etanol.

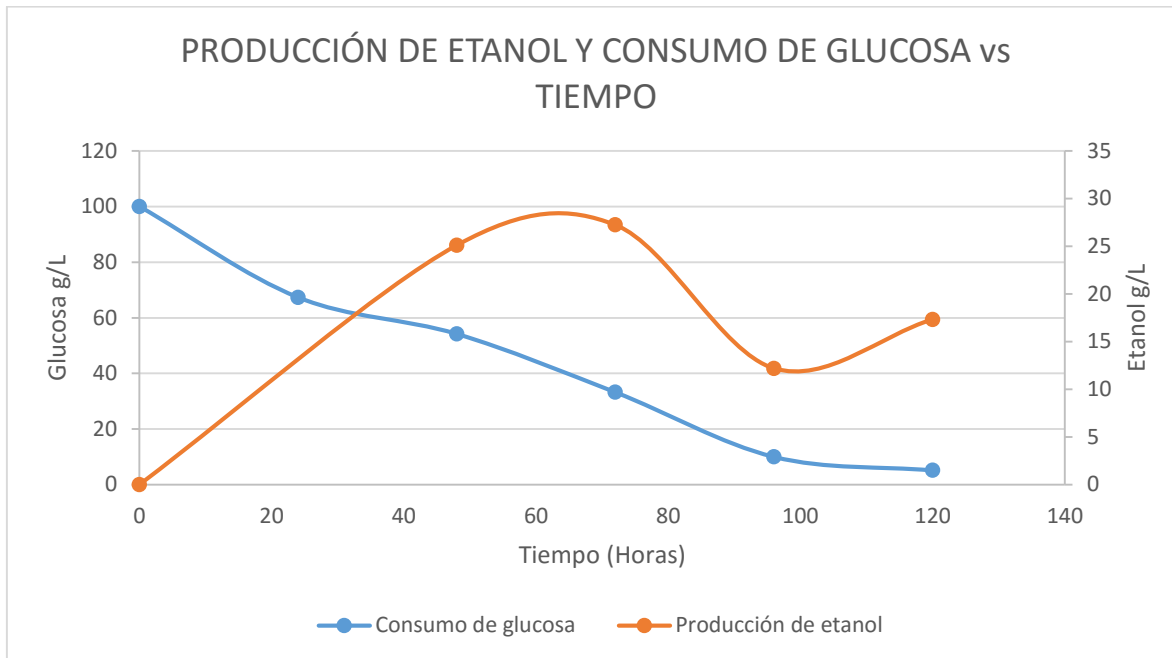


Fig. 41. Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en olote sin tratamiento (segundo ciclo).

11.5. Olote tratado con AA (producción de etanol).

Como se mencionó previamente, los residuos lignocelulósicos tratados con anhídrido acético tienden a ser candidatos estables para la producción de etanol al ser implementados como soportes de levaduras. En la figura 42 se muestra el reactor empacado con olote tratado con anhídrido acético, en el que tenemos una respuesta muy favorable en cuanto a la formación de biomasa y en el medio se mantiene una cantidad notable de levaduras, tal como se ve en la figura 42 en la tinción de Gram.

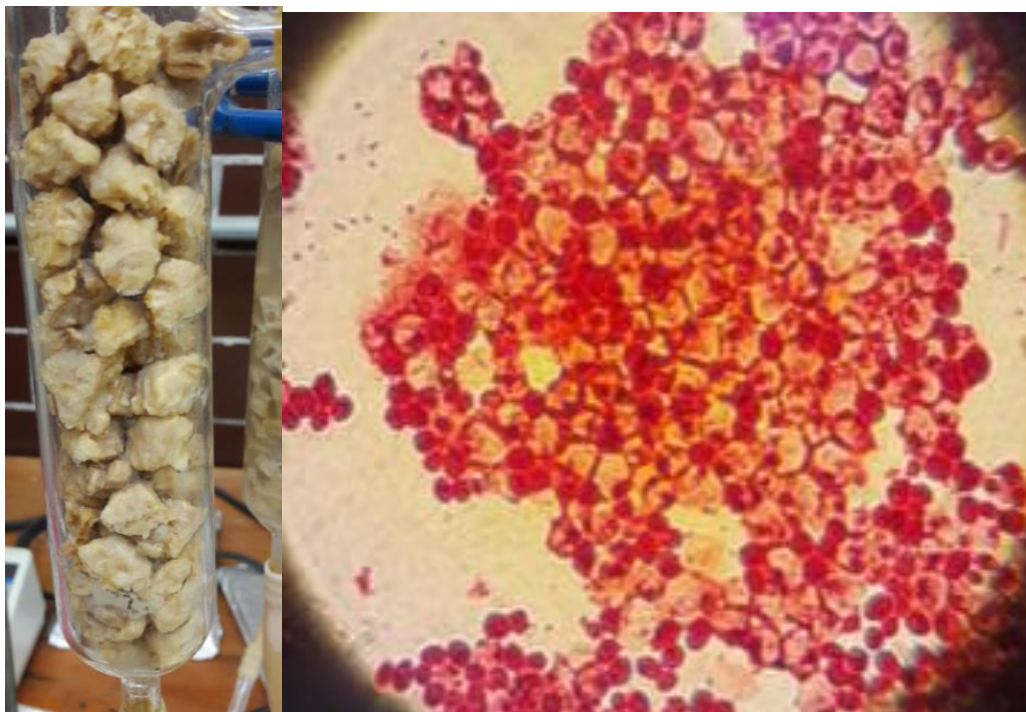


Fig. 42. Soporte de olote tratado con AA plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escalab(Primer ciclo).

El consumo de glucosa para la producción de biomasa es similar a los casos previos, tomando tiempos iguales en terminarse la glucosa para producir biomasa.

Una de las grandes diferencias que se tienen con este soporte lignocelulósico se detalla en el proceso de producción de etanol (figura 43), donde la gráfica nos muestra una excelente producción de etanol en las primeras 24 horas, tal y como sucedió con el soporte de caña tratado con AA. Esto nos ayuda a determinar que los soportes tratados con anhídrido acético son buenos candidatos para la inmovilización de levaduras, ya que al estar plagados de la misma, éste toma menores tiempos para producir etanol (ver figura 43). El soporte presenta buena estabilidad mecánica y fijación aceptable de la levadura y podría reutilizarse en varios ciclos de producción de etanol en caso de ser necesario.

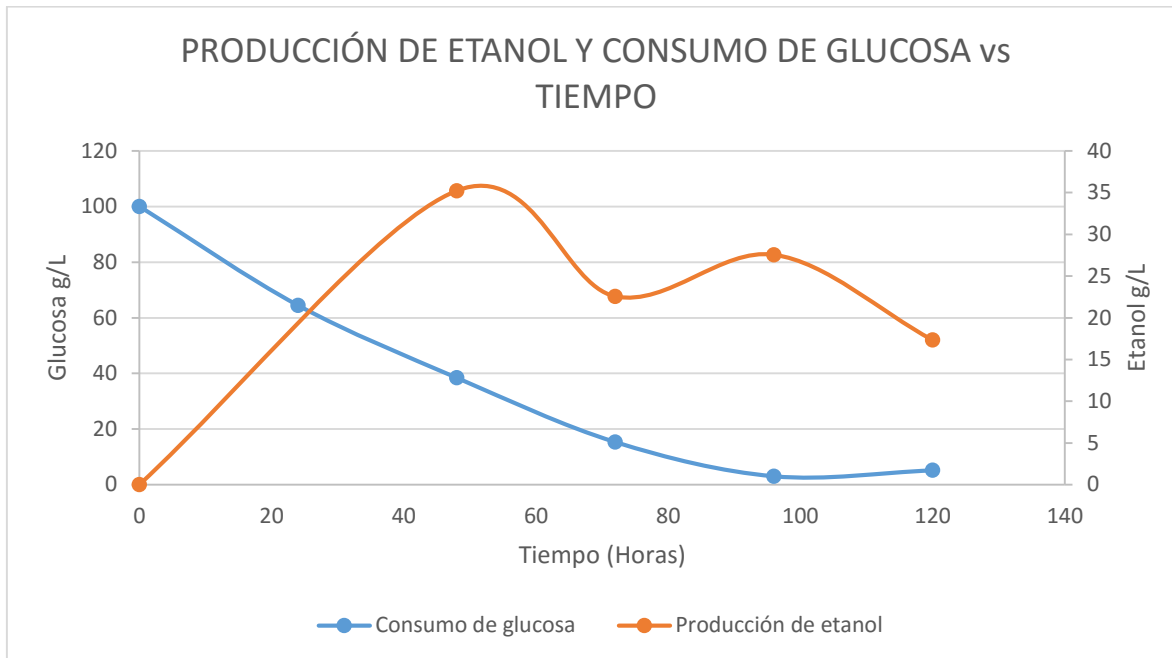


Fig. 43. Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en olote tratado con AA (segundo ciclo).

11.6. Olote tratado con AM (producción de etanol).

El residuo de olote tratado con anhídrido maléico presenta una serie de cambios físicos y químicos notables, éste empacado en el reactor tubular presenta serias complicaciones, ya que al contacto con un medio acuoso se vuelve más suave y puede romperse con facilidad, aunque funciona de manera eficiente para promover el crecimiento e inmovilización de las levaduras, pero no presenta beneficios significativos al implementarse la producción de etanol en el segundo ciclo. Este material resultó ser poco denso (al igual que el residuo de caña tratado con AM), presentando problemas de flotación por tiempos prolongados, teniendo complicaciones de falta de dureza al ser humedecido en su totalidad, lo que generaba fallas hidrodinámicas en el sistema al romperse en múltiples ocasiones dicho material.

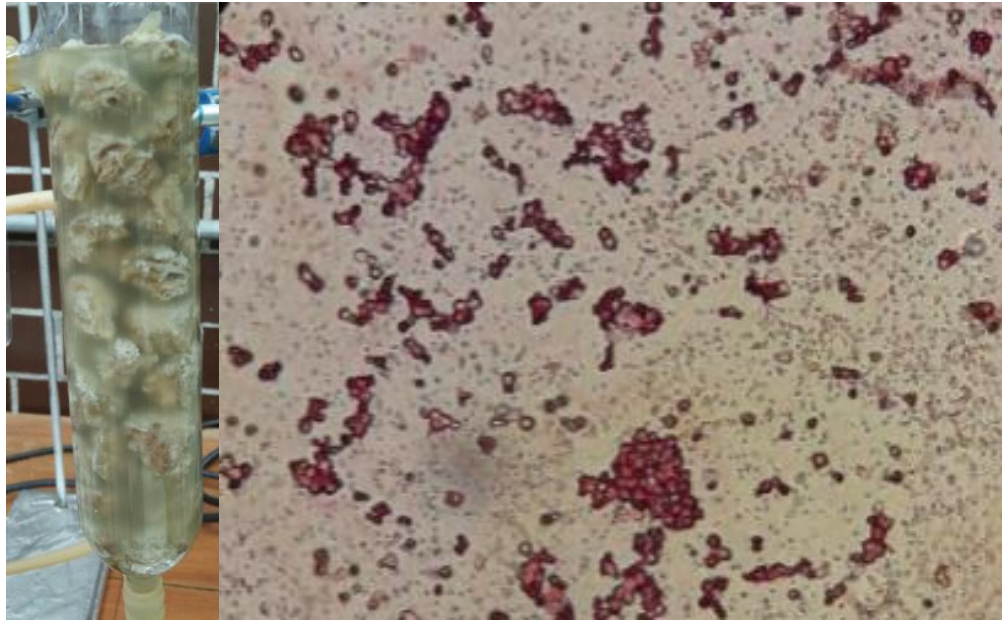


Fig. 44. Soporte de olote tratado con AM plagado de levaduras y evidencia en microscopía a escala (primer ciclo).

Al realizar la producción de biomasa, se tiene que este soporte funciona como todos los demás, donde se genera de manera eficiente y en tiempos iguales una cantidad significativa. Esta biomasa tiene gran afinidad por retenerse en la superficie del soporte (ver figura 44), lo que parecería de gran beneficio para el proceso. Se esperaba que éste funcionara bien como soporte de inmovilización y de producción de etanol, sin embargo, la fase de producción de etanol en condiciones anaerobias parece indicar lo contrario.

En este proceso se presentan resultados similares a aquellos obtenidos con el residuo de caña tratado con anhídrido maléico, presentando una producción casi nula de etanol al tener el medio anaerobio. El proceso se dejó por 6 días y no se vieron cambios significativos, ya que la producción de etanol fue menor a 3g/L, como se puede apreciar en la figura 45. Por este motivo se descarta un proceso de producción de etanol con soportes lignocelulósicos tratados con anhídrido maléico.

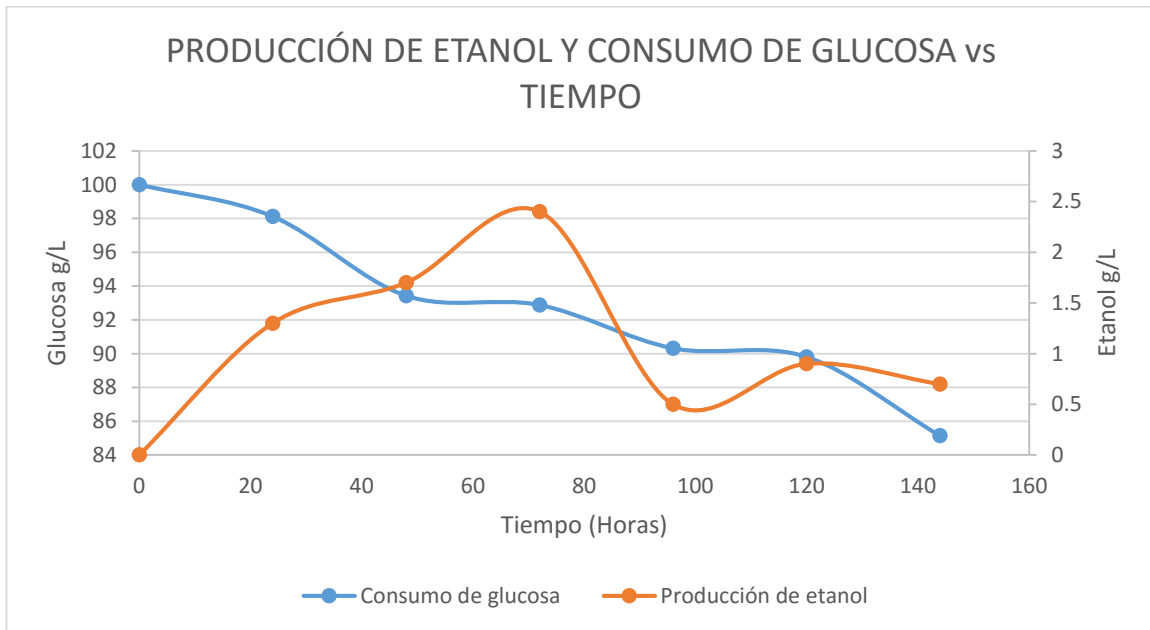


Fig. 45. Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en olote tratado con AM (Segundo ciclo).

11.7. Corrida blanco (sin soporte).

La corrida se realizó sin soporte, con el propósito de conocer el beneficio real que tienen los soportes tratados con anhídrido acético. Puede apreciarse en la figura 46 que la mezcla de producción de biomasa se encuentra turbia y en microscopía se nota una gran cantidad de levaduras en el medio, algo que no se aprecia en los reactores que cuentan con algún soporte. Para hacer el cambio de medio en el sistema, se centrifugó la biomasa y se colocó en el reactor nuevamente con el medio de glucosa sola.

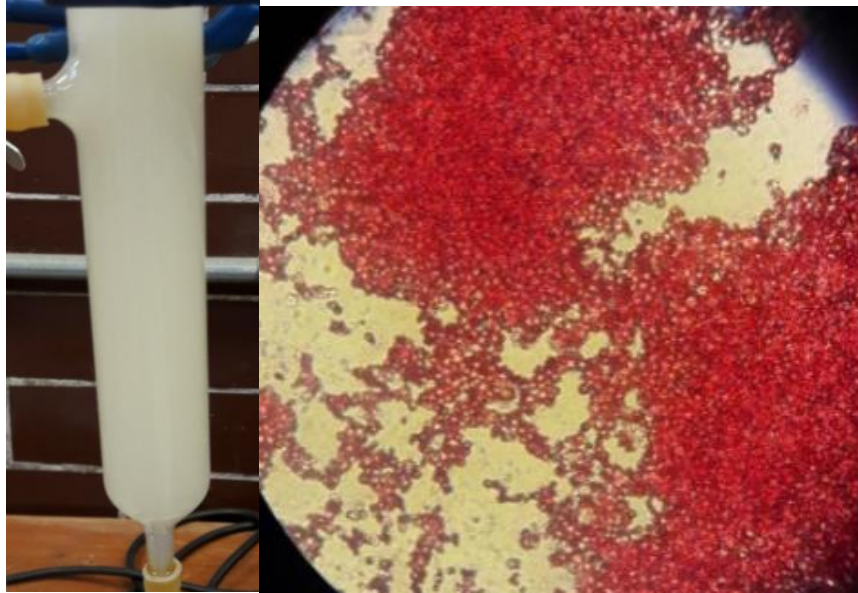


Fig. 46. Reactor tubular sin soporte y evidencia en microscopía a escala (primer ciclo).

El consumo de glucosa se realizó en 6 días al igual que los demás reactores, presentando la misma tendencia de consumo, se realizó una tinción de Gram donde se puede notar que se tiene una densidad celular mayor suspendida en el medio, como se muestra en la figura 46.

Tomando como referencia los valores que se muestran en la figura 41 y 47 para la producción de etanol en condiciones anaróbicas, se puede observar que hay una producción de etanol muy similar a la que se muestra en los reactores con los soportes lignocelulósicos sin tratamiento. Cabe destacar nuevamente que este reactor “testigo” cuenta con una ventaja extra, al centrifugarse se obtiene toda la biomasa, y esta se agrega en su totalidad al segundo ciclo. Esto no ocurre en los reactores empacados con los soportes lignocelulósicos, ya que se extrae el medio con todo lo que lleve suspendido y sólo se queda la biomasa que se retiene en la superficie de los soportes. De esta manera se puede apreciar que la producción de etanol es un poco mayor a la de los reactores con el soporte sin tratamiento, pero menor a los que tienen como soporte los residuos tratados con anhídrido acético. Con esto podemos afirmar que el proceso que se realiza en los soportes tratados con AA presentan una mejor producción de etanol en menores tiempos, ya que la levadura presenta un buen acoplamiento con ellos.

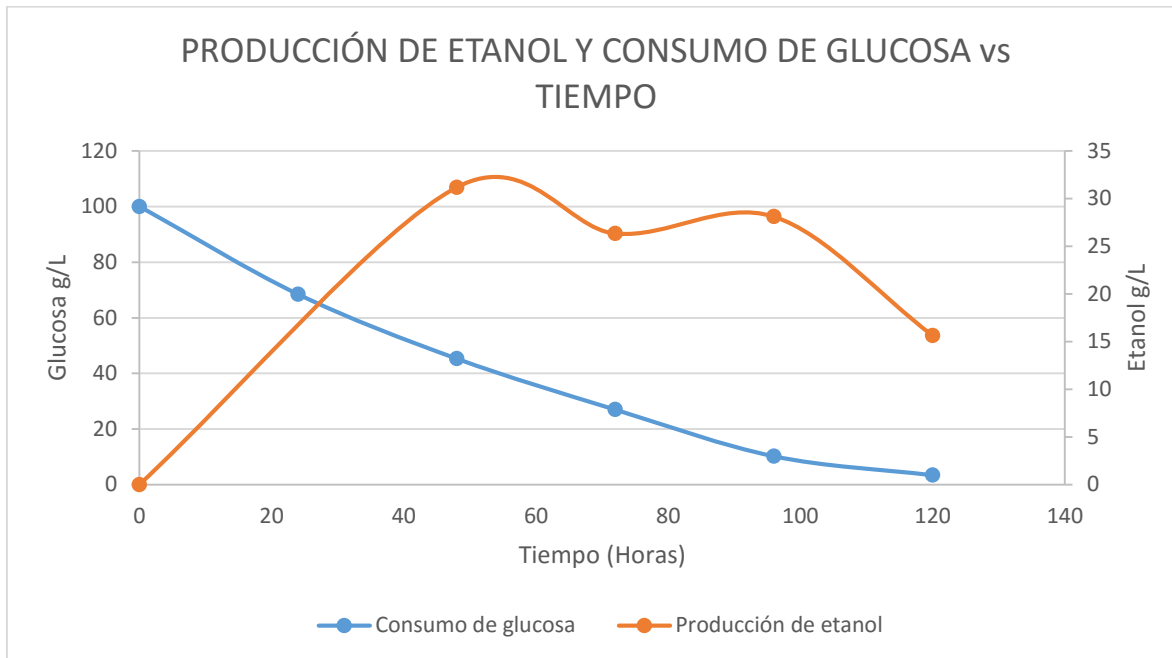


Fig. 47. Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en reactor sin soporte (segundo ciclo).

12. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

12.1. Tratamientos químicos en residuos lignocelulósicos.

En la actualidad se presenta una gran variedad de tratamientos químicos en residuos lignocelulósicos, para modificar su estructura química así como para darles un pre-tratamiento (Meneses-Tamayo, 2013), para implementarse en diferentes procesos, con los que se intenta innovar en este sector. Gracias a esto podemos tener un estudio comparativo de materiales lignocelulósicos tratados con anhídrido maléico y anhídrido acético, donde los resultados de injerto son variables según el tratamiento que sufren. Una evidencia de esto es la obtención de ésteres de holocelulosa, al tratar químicamente los residuos nativos mencionados, como lo han reportado en trabajos previos de Jing Li y cols., 2009; Shanshan y cols., 2015. Estos procedimientos son más complejos y requieren de pre-tratamientos o métodos más agresivos que pueden dañar las estructuras de los materiales lignocelulósicos y reducir significativamente el tamaño de las partículas, presentando una desventaja si se desea trabajar con partículas más grandes. Por esta misma razón se utilizan

en estos procesos residuos más rígidos como la madera y catalizadores para hacer más profundos y eficientes los injertos a la matriz lignocelulósica.

12.3. Planta piloto para la producción de cerveza.

En la planta piloto de cerveza se monitoreó la producción de etanol de la misma forma como se realizó en los reactores tubulares, utilizando los mismos tiempos, concentraciones de azúcares (provenientes de la hidrólisis de la malta en este caso), con las subsecuentes ventajas de un control de regulación de las temperaturas y siendo este un sistema cerrado.



Fig. 48. Planta piloto productora de cerveza.

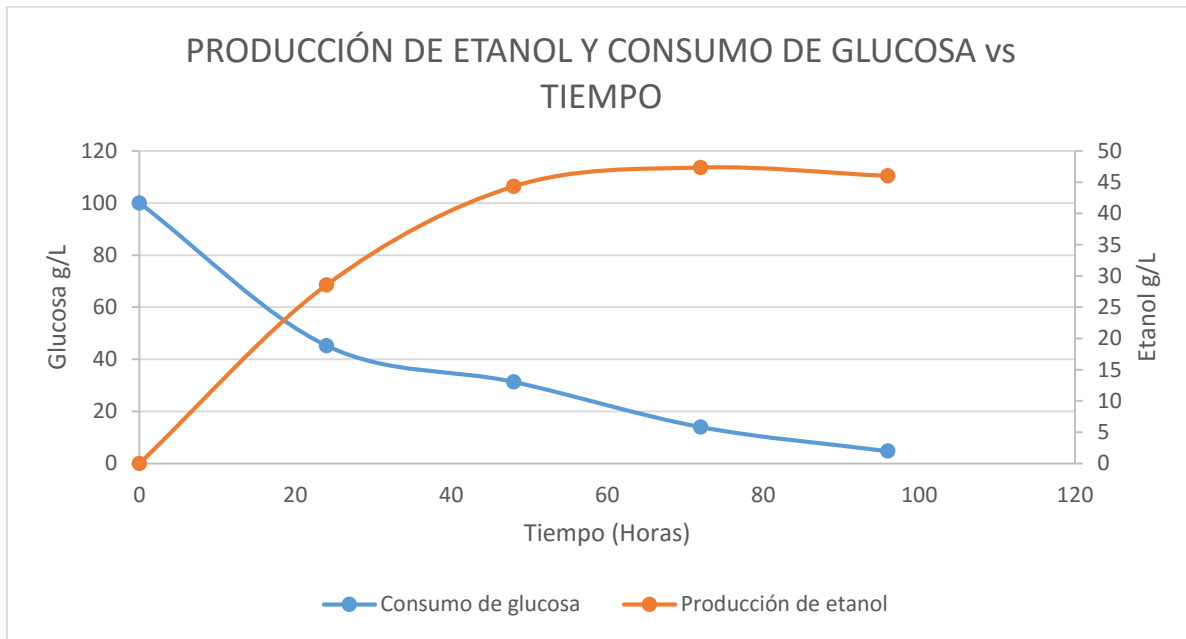


Fig. 49. Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo en la planta de cerveza.

La planta piloto al ser un sistema cerrado y enchaquetado, no presenta variaciones de temperatura e interacciones con el medio externo (figura 48), y de esta manera no se pierde el etanol producido como en el caso de los reactores tubulares implementados en este trabajo para la inmovilización de levaduras. Este monitoreo presenta una buena producción de etanol en las primeras 72 horas, destacando una producción más elevada en las primeras 48 horas, reduciendo su producción en las horas posteriores, durante la etapa de maduración (figura 49).

Este es un método tradicional de fermentación, donde las levaduras se encuentran suspendidas en el medio, tal y como se tienen en el reactor “blanco” del presente trabajo de investigación. Se puede notar que hay una producción de etanol similar que en los soportes tratados con AA plagados con levaduras, Cabe destacar que en este proceso se utilizan las mismas concentraciones de azúcares iniciales para la producción de biomasa, así como para la producción de etanol.

12.2 Inmovilización de levaduras en soportes lignocelulósicos.

Los estudios realizados previamente sobre inmovilización de levaduras en soportes lignocelulósicos presentan ciertas ventajas en la producción de etanol frente a los procesos industriales clásicos (Escobar y cols., 2012). La actividad de las levaduras

inmovilizadas en los residuos lignocelulósicos que se presentan en este trabajo se compararon con la actividad de levaduras en una planta piloto de producción de cerveza. El proceso de producción de cerveza, los materiales y concentraciones de materia prima se muestra a detalle en el anexo 2. Estos resultados se comparan con los estudios realizados para la producción de cerveza a base de miel de abeja mexicana en la planta piloto ubicada en el Laboratorio de Ingeniería Química (Archundia, 2014).

Teniendo en cuenta estos resultados y comparándolos con los resultados obtenidos por Escobar y cols., 2012, se puede tener una idea de los resultados obtenidos en la producción de etanol usando residuos lignocelulósicos sin tratamiento y los resultados obtenidos en este trabajo con residuos modificados químicamente (figura 50). Encontramos que las producciones de etanol en los soportes lignocelulósicos y los reportes previos presentan una producción de etanol muy parecida, pero los resultados reportados por Escobar y cols., 2012 tienen una gran varianza si se les compara con los resultados obtenidos en los reactores empacados con los olotes y bagazos de caña tratados químicamente con anhídrido acético. De esta manera podemos evidenciar que los tratamientos con AA son altamente efectivos para este tipo de bio-procesos.

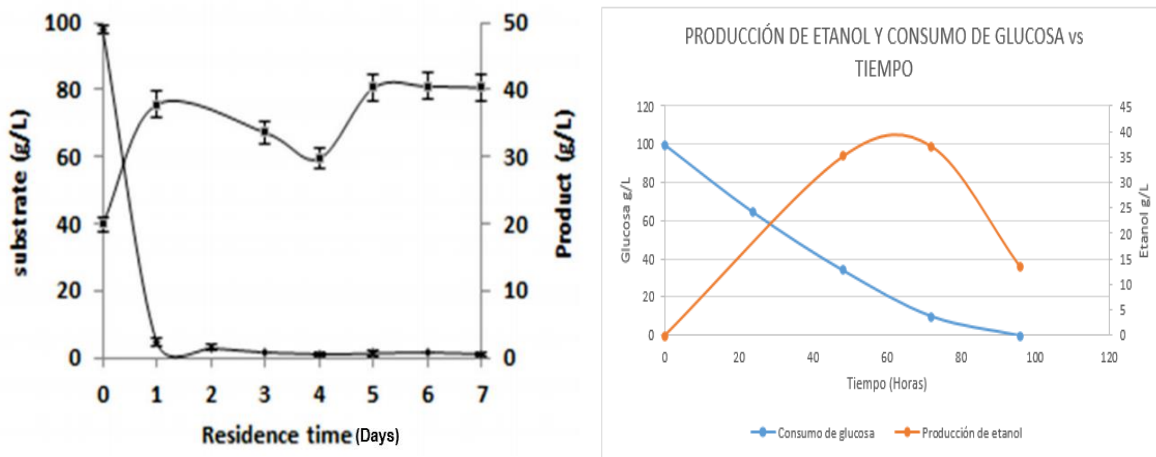


Fig. 50. (A) Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo reportado por Escobar y cols., 2012. (B) Gráfica de consumo de glucosa y producción de etanol vs tiempo reportada en este trabajo experimental.

Al realizar una comparación con la inmovilización en soportes tratados con anhídrido acético, se presentan producciones de etanol cercanas a los valores teóricos esperados, a pesar de tener un sistema abierto y sin control riguroso de la temperatura.

13. CONCLUSIONES.

Podemos notar que los residuos lignocelulósicos presentan versatilidad para ser modificados por diversos reactivos, en este caso anhídridos orgánicos, de tal forma que pueden cambiar las propiedades físicas y químicas de las matrices originales. Este campo tiene mucho por estudiar y puede presentar un gran impulso y desarrollo para nuevas tecnologías energéticas en el futuro inmediato. Cabe destacar que se pueden modificar estos residuos con otros reactivos, formando compuestos novedosos y totalmente biodegradables, que se puedan reincorporar al medio ambiente mediante procesos biológicos naturales.

En este trabajo a la modificación química de estos residuos con anhídrido maléico, no resultó de interés. Esto no descarta la probabilidad de que se pueda utilizar el material de diferentes formas en otros procesos ya que presenta un doble enlace en su estructura, siendo susceptible de polimerización, así como la presencia de un ácido carboxílico en los extremos donde se injerta el material. Esto le imprime características específicas especiales útiles para usarse en otras aplicaciones.

En tanto a la producción de etanol podemos notar que la inmovilización de las levaduras es eficiente en todos los soportes, pero la presencia del anhídrido maléico imprime un efecto inhibitorio para la producción de etanol. Se mostró una producción de etanol con mejores rendimientos en los soportes modificados con anhídrido acético, en comparación con otros soportes reportados en la literatura, además de métodos tradicionales de producción de etanol, como se mostró en el reactor tubular "blanco" o testigo y resultados competitivos con respecto a la planta piloto de cerveza.

También se puede concluir que es fundamental la regulación del proceso, lo que implica el monitoreo continuo de la temperatura, pH y el control de la atmósfera (oxidativa o reductora), ya que estos puntos son muy importantes en la producción del etanol.

Finalmente cabe resaltar que los residuos lignocelulósicos representan grandes oportunidades hoy en día en procesos sustentables, lo que nos permite aportar mejoras a los procesos tradicionales de producción, volviéndolos más eficientes a menores costos y con mejores rendimientos.

REFERENCIAS:

Alvira P, Pejó T., Ballesteros M, Negro M.J. "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review." 2010 *Bioresour Technology*. 101(13) 4851-61

AMYD UNAM., "Tablas de IR para el curso de química analítica instrumental I" http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR_15437.pdf

Archundia A., "Cerveza artesanal elaborada con miel de abeja mexicana." Tesis de licenciatura en Química de alimentos. 2014. Facultad de Química. UNAM.

Balat M., "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review." 2011. *Energy Conversion and Management* 52, 858-875.

Bardi E. P., Bakoyianis V., Koutinas A.A., Kanellaki M. "Room temperature and low temperature wine making using yeast immobilized on gluten pellets." 1996. *Process Biochemistry*, 31(5), 425-430.

Bidalk J., Malone M., and Rusell B. "Molecular and structure and component integration of secondary cell walls in plants." 1992. *Oklahoma Academy Of Science* 72, 51-56

Boerjan W., Ralph J., Baucher M. "Lignin biosynthesis." 2003. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519-546.

Brock T., *Microbiología Sexta Edición.* 1982. (M. C. Idalgo & Mandrango, Trad) Printice Hall Hispanoamerica S.A.

Buranov A.U. y Mazza, G., "Lignin in straw of herbaceous crops." 2008. *Industrial Crops and Products* 28, 237-259.

Burdon K., 1971. *Microbiología. Primera Edición en español.* México, DF. Publicaciones culturales S.A.

Carpenter P., *Microbiología Segunda Edición.* 1969. (J. R. Blengio, Trad.) México, DF. Editorial Interamerica, S.A.

Chamú-Muñoz A., Hernández-Meléndez, O., Hernández-Luna M., Alcaraz-Cienfuegos M., Vivaldo-Lima E. and BárzanA E., 2015 "Macromol. Mater. Eng.", 300, 810–822.

Contreras Q., Héctor J.; Trujillo P., Hugo A.; Arias O., Gerardo; Pérez C., Delgado F. "Espectroscopia ATR-FTIR de celulosa: aspecto instrumental y tratamiento matemático de espectros." 2010. *e-Gnosis*, vol. 8, 2010, 1-13

Cuervo L., Folch, J.L., Quiroz, R.E. "Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol." 2009. Bio-Tecnología vol.13, tomo3.

Dahlman O., Jacobs A., Sjöberg A. "Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps." 2003. Cellulose 10, 325-334.

Drapcho C. M., Nghiem P.N., Walker T.H. "Biofuels Engineering Process Technology." 2008 Mc. Graw Hill.

Escobar A., Lina M.; Salazar-Álvarez, U. and Penuela, M. "Producción continua de etanol en biorreactores de lecho empacado con células de levadura inmovilizadas en residuos lignocelulósicos." 2012. Dyna, vol. 79, núm. 174, 107-113.

Fengel D. y Wegener G., "Wood, Chemistry, Ultrastructure and Reactions." 1989. Berlin-New York: Walter de Gruyter. 613p.

Fajardo E., Sarmiento., "Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*." 2007. Trabajo de grado para la obtención del título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Microbiología Industrial. Extraído de la siguiente página: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>.

Hee-Soo K., Byoung-Ho L., Seung-Woo C., Sumin K., Hyun-Joong K. "The effect of types of maleic anhydride-grafted polypropylene (MAPP) on the interfacial adhesion properties of bio-flour-filled polypropylene composites." 2007. Volume 38, 1473–1482.

Hendriks G., Zeeman G. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." 2009. BioresourceTechnology 100, 10-18.

Herdoisa G. "Biología general de las levaduras." 2001. Extraído de la siguiente página: http://www.med.uchile.cl/apuntes/archivo/2007/medicina/biología_genera_l_de_los_hongos.pdf

Hernández-Meléndez O., Peydecastaing J., Bárzana E., Vaca-García C., Hernández-Luna M., Borredon M.E. "Graft polymerization of wood sawdust and peat with ethylene carbonate. A novel method for the preparation of supports with enhanced mechanical properties to be used in biofiltration of organic vapors." 2009. Bioresource Technology. Vol. 100, 737-743.

Hernández-Meléndez O., Bárzana E., Arriaga S., Hernández-Luna M., Reva S. "Fungal Removal of Gaseous Hexane in Biofilters Packed with Poly (Ethylene Carbonate) Pine Sawdust or Peat Composites." 2008. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 100, 864-871.

- Higuchi T.**, "Lignin Biochemistry - Biosynthesis and Biodegradation." 1990. Word Science and Technology 24, 23-63.
- IEA Internacional Energy Agency**, Biofuels 2013.
- IEA Internacional Energy Agency**, Oil Market Report September 2013.
- James C.S.**, "Analytical Chemistry of Foods." 1999. Second Edition, ASPEN Publishers. New York.
- Jing L.**, Li-Ping Z., Feng P., Jing B., Tong-Qi Y., Feng Xu and Run-Cang S. "Microwave-Assisted Solvent-Free Acetylation of Cellulose with Acetic Anhydride in the Presence of Iodine as Catalyst." 2009. Molecules, 14, 3551-3566.
- Martínez-Alcalá A.**, Tesis Doctoral: "Producción de bioetanol: mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam-explosion." 2012. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Meneses-Tamayo A.**, "Obtención de materiales compuestos a base de residuos lignocelulósicos mediante reacción química en alta consistencia." 2013. Tesis de licenciatura en Ingeniería Química. Facultad de Química. UNAM.
- Miller G. L.**, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." 1959. Analytical Chemistry, vol. 31 (3), 426-428.
- Molina-Sabio M.**, Rodríguez-Reinoso F. "Role of chemical activation in the development of carbón porosity." 2004. Colloids and Surfaces a Physicochemical and Engineering Aspects 241, 15-25.
- Ochoa R. F.**, "Inmovilización de Células y Enzimas." 2011. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, 3-6, 1-15.
- Samios E.**, Dart R.K., Dawkins J.V. "Preparation, characterization and biodegradation studies on cellulose acetates with varying degrees of substitution." 1997 polymer, volume 38, 3045-3054.
- Sánchez O.J.**, Cardona C.A. "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feed stocks." 2008. Bioresource Technology 99, 5270-5295.
- Shanshan L.V.**, Jiyong G., Haiyan T., Yanhua Z. "Modification of wood flour/PLA composites by reactive extrusion with maleic anhydride." 2015. Journal of applied polymer science, 43-295.
- Stewart G.**, Rusell I. "One hundred years of yeast research and development in the brewing industry." 1986. Journal of the Institute of Brewing. 92: 537-558.
- Sun Y.**, Cheng J. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." 2002. Bioresource Technology 83, 1-11.

Sun R.C., Tomkinson J., "Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pretreated wheat straw." 2003. *European Polymer Journal* 39, 751-759.

Verbelen P. J., Schutter P., Delvaux F., Kevin J. "Immobilized yeast cell Systems for continuous fermentation applications." 2006. *Biotechnology Letters*. 28: 1515-1525.

Verstrepen K. J., Derdelinckx G., Verachtert H., Delvaux F. R. "Yeast flocculation: what brewers should know." 2003. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(3), 197-205.

ANEXO 1: Descripción de materiales y equipos utilizados.

- Acetona, 99.60% de pureza. J.T. Baker 9006-3. Lote: K33c55.
 - Ácido clorhídrico, 37%. Sigma Aldrich. Lote: SHBB3002V.
 - Agar dextrosa Sabouraud, BD bioxon, formula aproximada para cada 1000 ml. Agar (15g), dextrosa (40g), peptona de carne (5g), peptona de caseína (5g), pH final 5.6 ± 0.2 . lote: 2250323.
 - Alcohol etílico absoluto anhidro, 99.90% de pureza. J.T. Baker 9000-03 R.A. lote: 2245987.
 - Anhídrido maléico, 99% de pureza., Fluka analytical R.A. lote: SZBB2160V.
 - Anhídrido acético, 99.99% de pureza. J.T. Baker 0018-03 R.A. lote: A42c76.
 - AW QUICK, Rotronic instrument corp. Modelo AWVC, s/n: 56701.
 - Balanza analítica Adventure Pro Ohaus corporation, modelo AV264C, s/n: 8032161045., Max 260g, D=0.0001.
 - Cromatógrafo de gases GOW-MAC instrument Company. Co series 580, operación isotérmica de columna capilar empacada, detector TCD, FID, DIDIY PID, 400°C.
 - Espectrofotómetro Unico (UV-visible), modelo 2150, s/n: K11071109008. Rango 325-1000nm, ancho de banda de 4nm.
 - Glucosa anhidra, grado alimenticio, 1kg, lote: 99012 R: 1187/86/200815F0815C0817.
 - Hidróxido de sodio en escamas, 97% de pureza. J.T. Baker 3724-01. Lote: G41C74.
 - Levadura liofilizada, ALE YEAST, 500g, Lallemand. empacada en Suiza. Lote: 10849161040611X
 - Levadura cerveza polvo desamargado, 500g grado alimentario, droguería cosmopolita, lote: 1187/86/200815f0815c0817.
 - Microscopio óptico Nikon eclipse E100, eco-iluminación LED, con objetivos 4, 10, 40 y 100 aumentos, sistema óptico con corrección CFI45.
- Parrilla de calentamiento con agitación magnética, marca Thermo Scientific, modelo Cimarec.

ANEXO 2. Operación de la planta productora de cerveza.

Componentes y proceso de elaboración de cerveza en la planta piloto.

Componentes

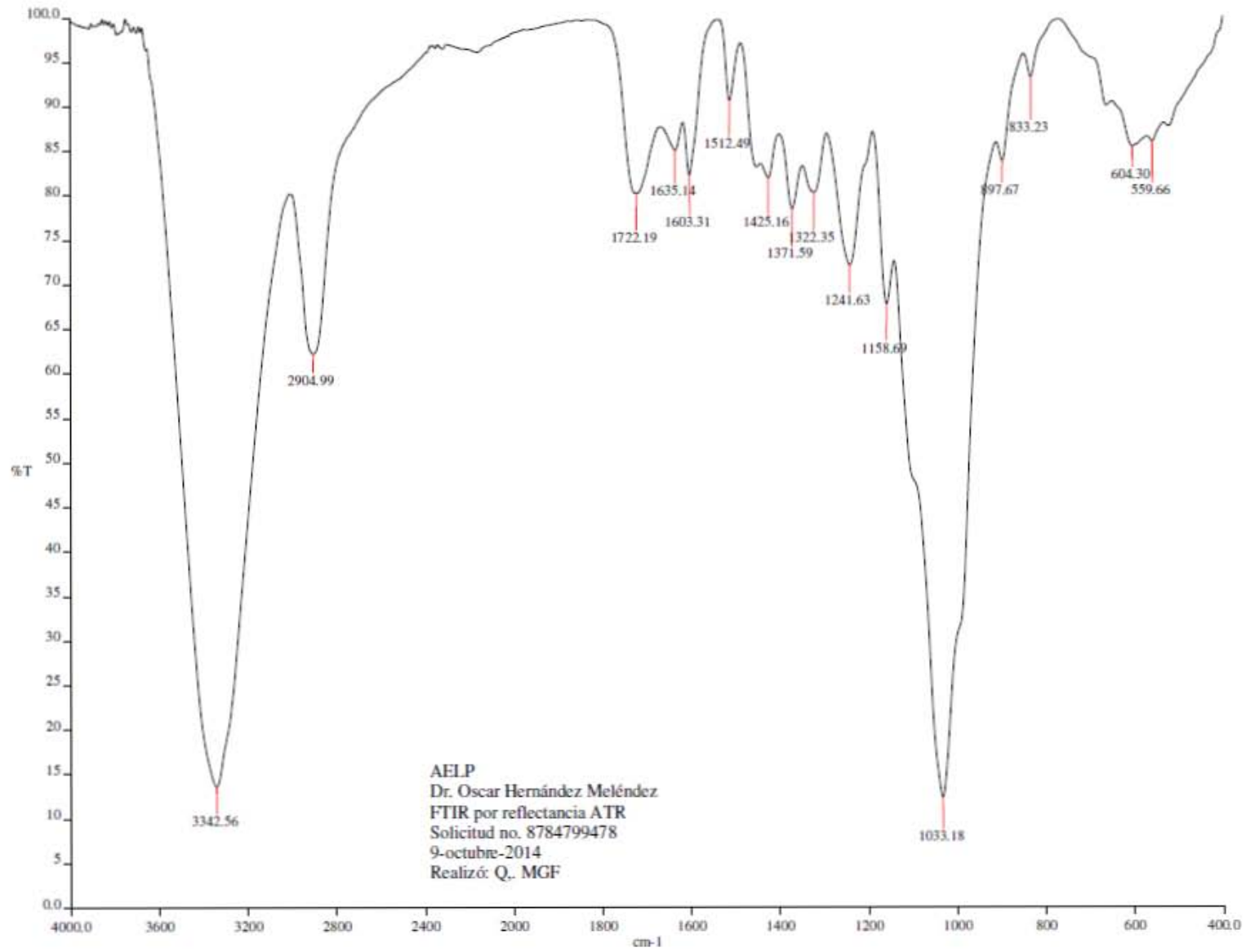
La planta piloto educacional para producir cerveza consta de un módulo caliente, compuesto de un tanque de agua para proceso con sistema de calentamiento y bombeo, forrado con un aislante térmico; un recipiente para realizar la maceración y cocción del mosto. Este tiene un sistema de calentamiento y un agitador, y otro contenedor para filtrar el mosto.

El bloque frío está compuesto por tres unitanques, en los que realiza la fermentación y maduración de la cerveza; en estos equipos se controla la presión y temperatura durante el proceso. En general, el calentamiento se genera por medio de resistencias eléctricas. El enfriamiento se logra mediante circulación de agua glicolada a baja temperatura, a través de las chaquetas de los tanques en un sistema cerrado. El proceso de elaboración de la cerveza consta de las siguientes etapas:

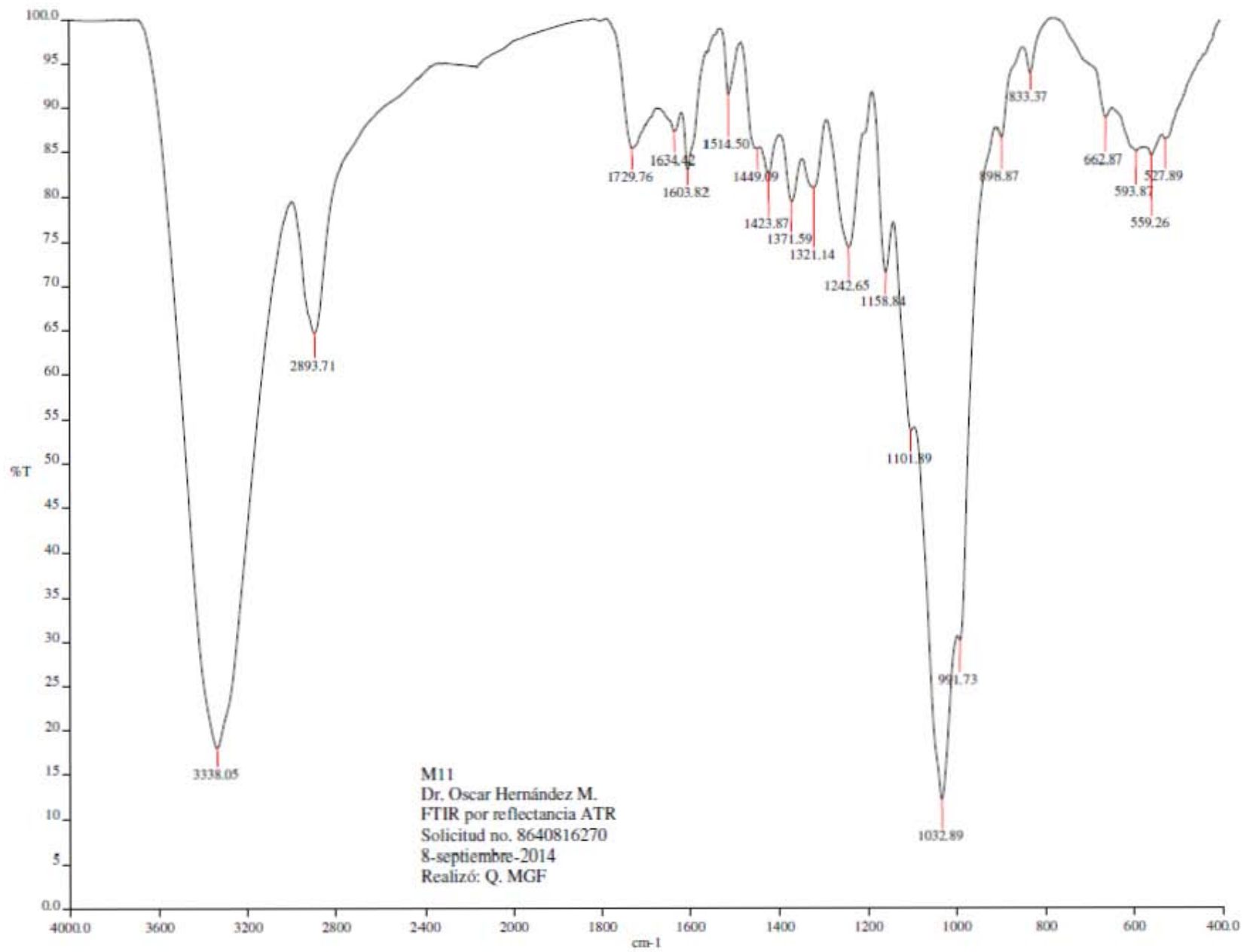
- 1. Maceración.** Se pesaron 8 Kg de malta para producir 40 L de cerveza clara; se muelen y mezclan con agua con un programa de tiempos y temperaturas para convertir los almidones en azúcares fermentables.
- 2. Filtración.** La masa obtenida en la maceración se filtra para eliminar el grano agotado (bagazo) y dejar el mosto (extracto).
- 3. Cocimiento.** El mosto se hierve a 92°C y se adiciona el lúpulo para obtener el característico sabor amargo de la cerveza y que contribuye también al aroma.
- 4. Enfriamiento.** El mosto se enfría para inocular la levadura e iniciar la fermentación entre los 15-18 °C por 3 días.
- 5. Fermentación.** Los componentes del mosto, metabolizados por la levadura, originan alcohol y bióxido de carbono. En los procesos de fermentación y reposo la cerveza se mantiene a bajas temperaturas por 3 días.
- 6. Reposo.** Después de la fermentación la cerveza se somete a una segunda fermentación por varios días a 0°C, para así completar su sabor y maduración de forma natural.
- 7. Filtración.** En este equipo la filtración de la cerveza se hace al momento de servirla mediante un filtro de cartucho de celulosa en la línea de salida de los tanques.

Anexo 3. Espectros de IR.

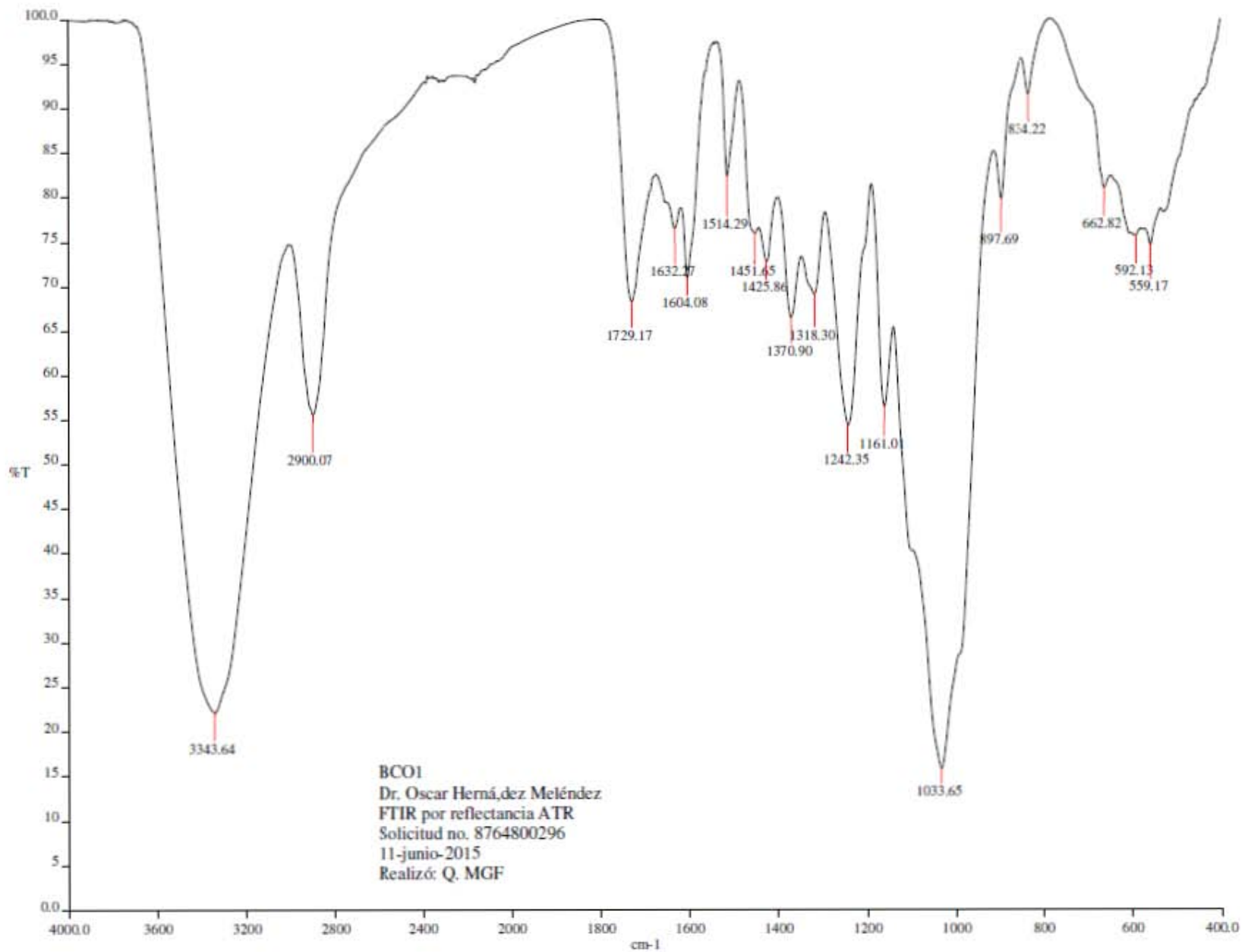
- Figura 9-A



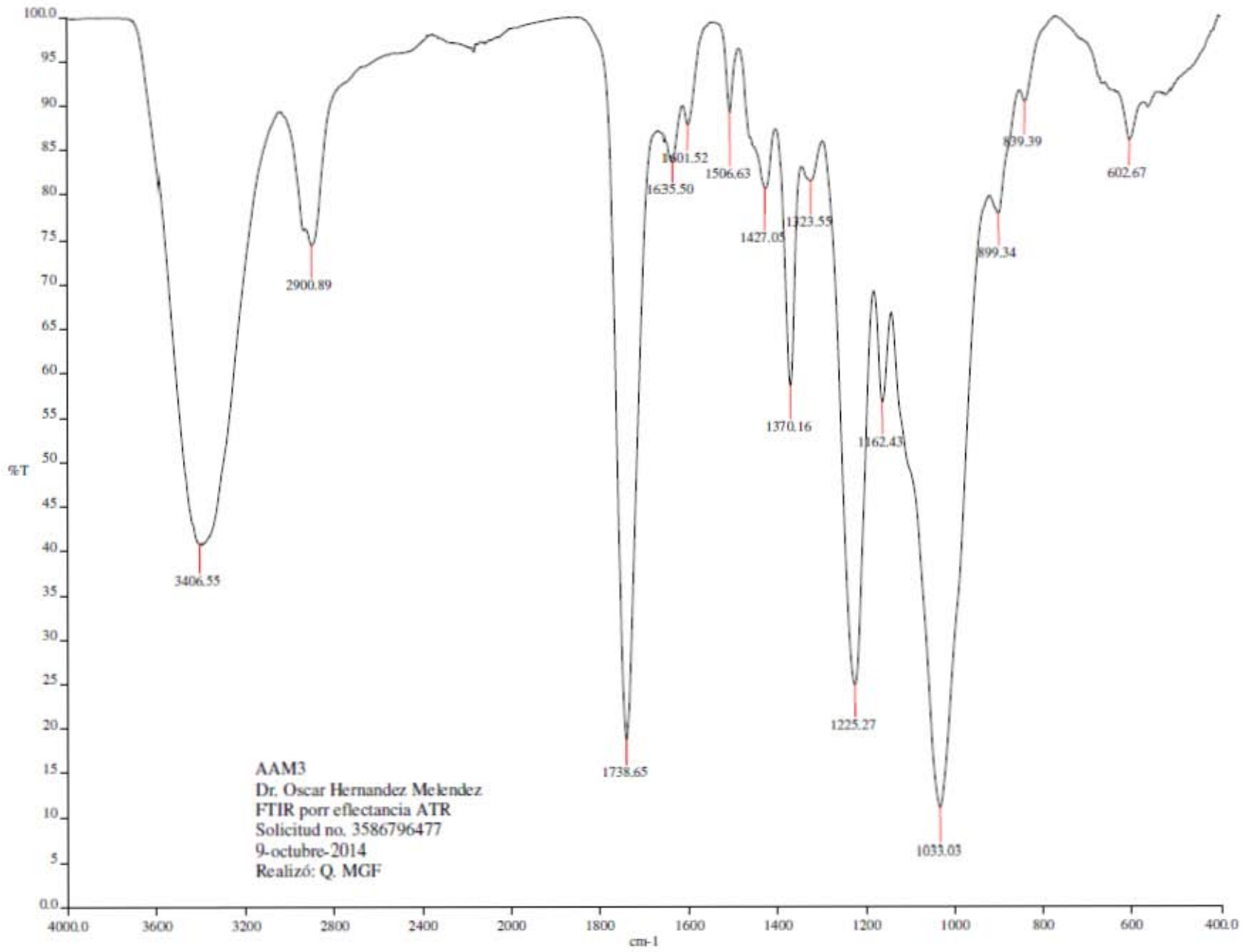
• FIGURA 9-B



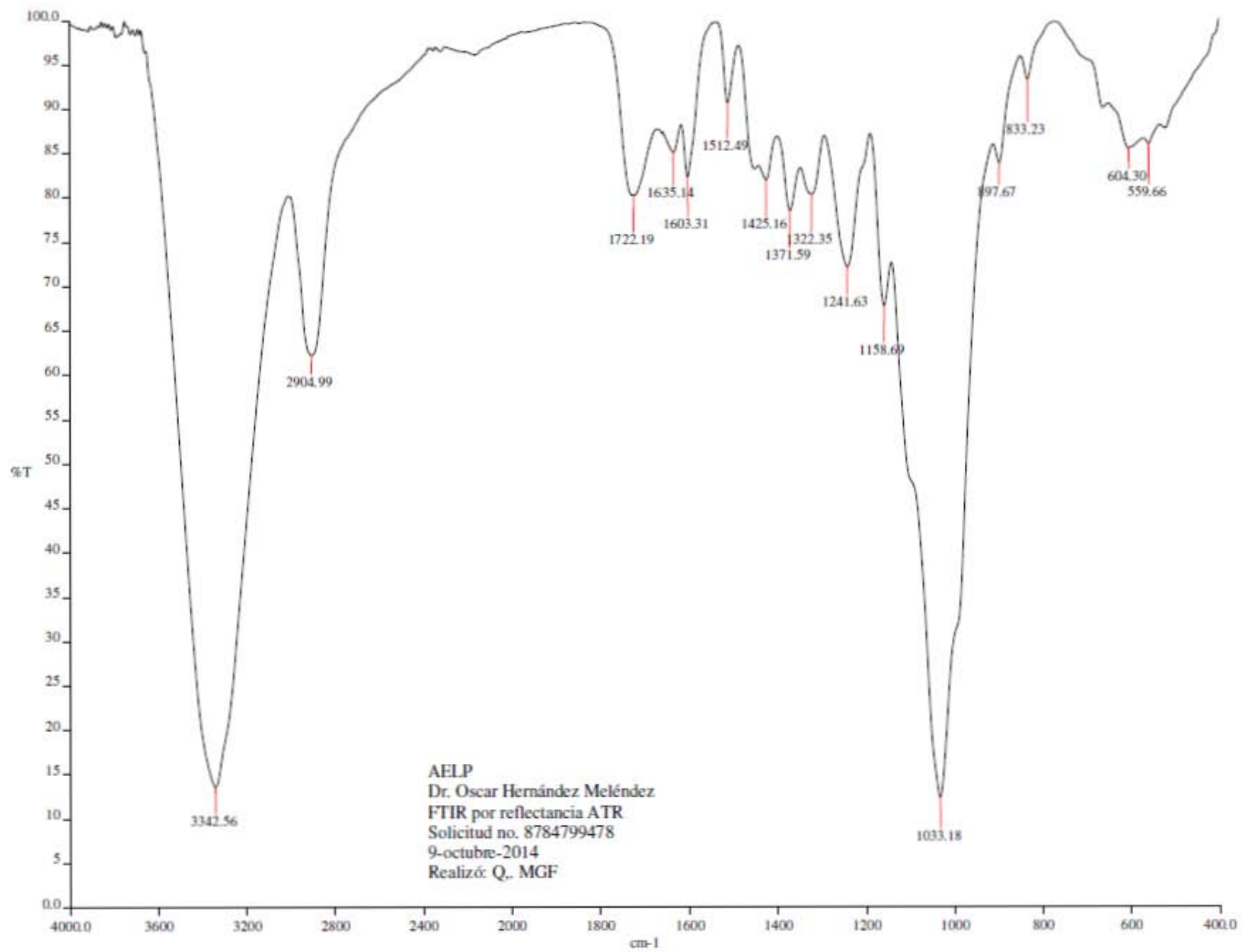
• FIGURA 10-A



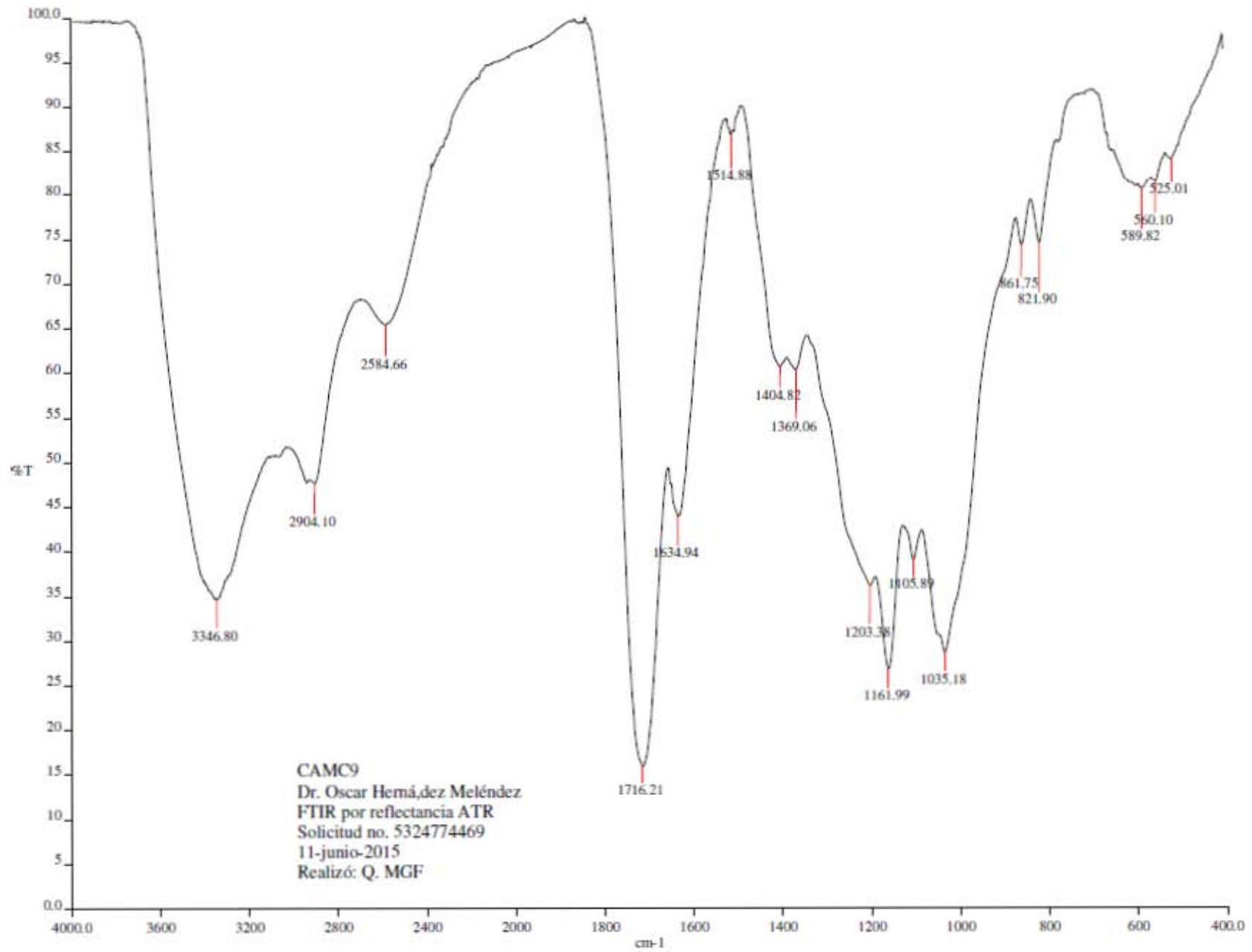
• FIGURA 10-B



• FIGURA 12-A



• FIGURA 12-B



• FIGURA 13-A

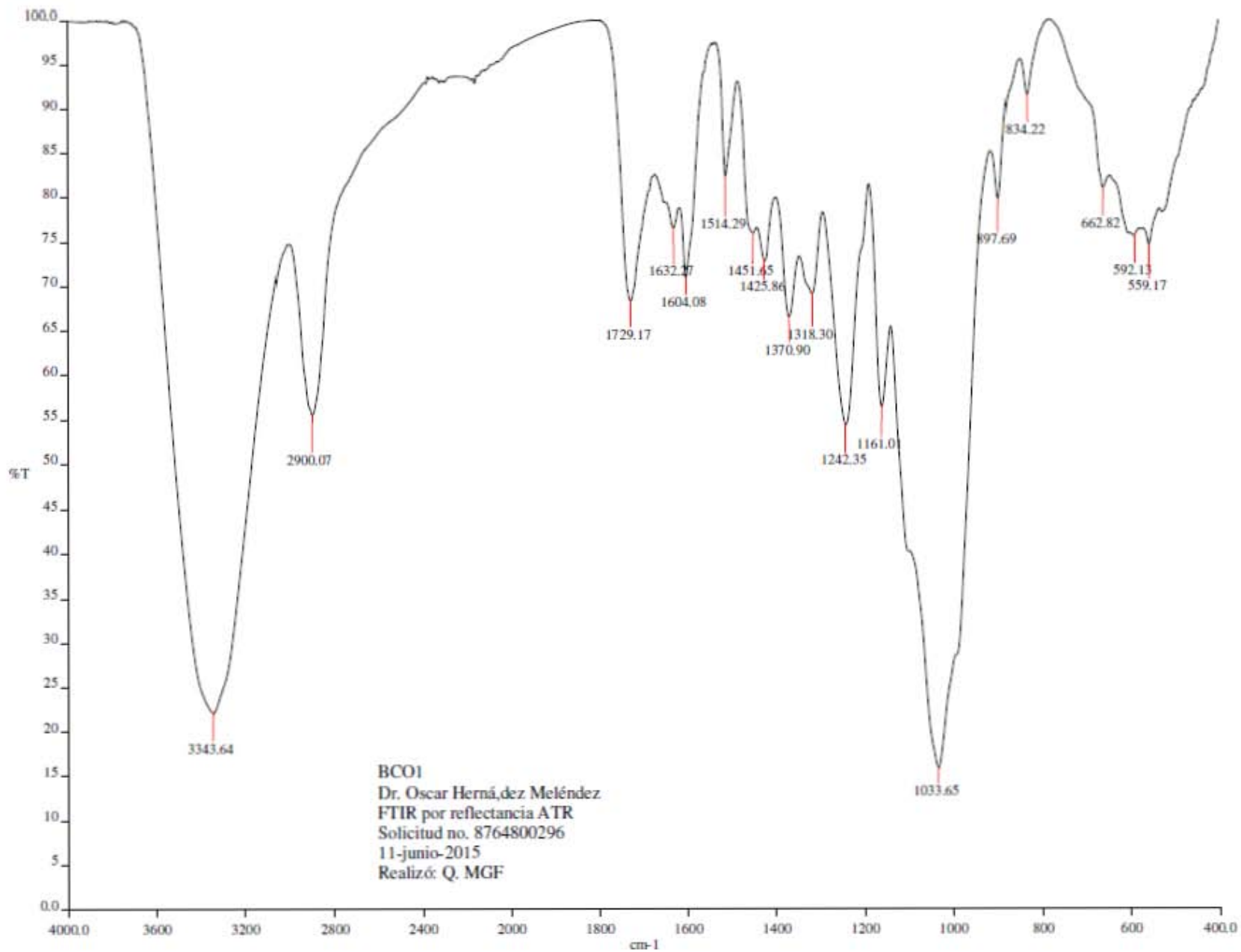


FIGURA13-B

