



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES
PRETRATAMIENTOS EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR
DEL OLOTE DE MAÍZ**

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

ALICIA VILLASEÑOR SOLIS



MÉXICO, D.F.

2010



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: Ismael Bustos Jaimes
Vocal: Jorge Arturo Aburto Anell
Secretario: Francisco Ruíz Terán
1er. suplente: Armando Conca Torres
2° suplente: Agustín Reyó Herrera

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO

ASESOR

Jorge Arturo Aburto Anell

SUPERVISOR

Agustín Reyó Herrera

SUSTENTANTE

Alicia Villaseñor Solis

Agradecimientos:

Sé que no recibí un Grammy a la mejor estudiante, pero quisiera agradecer tanto:

De primera estancia a la UNAM por permitirme estudiar en sus instituciones desde la prepa 9 hasta la Facultad de Química, que en conjunto con el personal docente me han formado como profesionista y ser humano. Y este caso al IMP por proporcionarme las herramientas suficientes para llevar a cabo este proyecto.

A Dios: Por darme la suerte de haber tenido padres y hermanos que me hayan impulsado a todo momento a estudiar una carrera profesional y de igual forma me dio la licencia de acabarla a pesar de todas los obstáculos.

A mis padres: Alicia y Raúl por su amor, cuidado, educación y formación que me han hecho una persona de bien.

A mis hermanos: Raúl, Alma y Liliana, que me han ayudado en todo momento con sus consejos desde que era pequeña y que me ayudaron con los gastos de la graduación. Y a la demás familia por su apoyo incondicional en especial a mi sobrino Cris, mi tía Rosita y Pascual.

A mi tutor: El Dr. Jorge por su paciencia, tiempo, conocimiento, cariño y amistad durante mi estancia en esta etapa. Al mismo tiempo a los demás sinodales el Dr. Ismael y el Dr. Francisco por perfeccionar este escrito.

A toda la "people" que si no la hubiera encontrado, aunque haya sido casi al final de la carrera, no sé en dónde hubiera acabado: Luis (my closest friend), Ceci, Sel, Adla, Natacha, Miel Caro, Andi, Rufina, Coral, Oscar, Ana, Karo, Zabdy y Alelí. Los que conocí el principio pero que siempre lleve en mi corazón: Marco, Paola, Galleta y Nanci. A los que encontré en el medio de la carrera: Paulina, Sonia, May, Vero y Eri. A las chicas del IMP: Larisa, Lilo y Brenda. Y finalmente a los demás amigos: Astrid y Paty (desde la niñez), Gabi, Bianca, Alex y Gera.

Dios me los bendiga a todos.

Con cariño: Alice

ESTRUCTURA DEL TRABAJO:

ÍNDICE

Resumen.....	1
CAPÍTULO 1. Antecedentes.....	2
I.1. Bioetanol como combustible.....	2
I.1.1. Bioetanol.....	2
I.1.2. Mercado de etanol en el mundo.....	4
I.1.3. Mercado de etanol en México.....	7
I.1.4. Métodos de obtención de bioetanol.....	9
I.2. Material lignocelulósico.....	13
I.2.1. Composición del olate de maíz.....	16
I.2.2. Producción de maíz en el mundo.....	17
I.2.3. Producción de maíz nacional.....	18
I.2.4. Importancia de la hidrólisis y conversión en azúcar del olate de maíz.....	20
I.2.4.1 Pretratamiento del material lignocelulósico.....	21
I.2.4.1.1. Mecánico.....	25
I.2.4.1.2. Alcalino/Peróxido.....	26
I.2.4.1.3. Ácido diluido.....	26
I.2.4.1.4. Organosolv.....	28
I.2.4.2. Sacarificación del material lignocelulósico.....	29
I.2.4.2.1. Hidrólisis ácida.....	29

I.2.4.3. Factores que influyen en la fermentación a partir del olote de maíz.....	30
I.3. Objetivos e hipótesis.....	31
CAPÍTULO II. Metodología y diseño de experimento.....	33
II.1. Diagrama general.....	33
II.2. Reactivos y equipos.....	34
II.3. Métodos.....	35
CAPÍTULO III. Resultados y discusión.....	46
III.1. Obtención de la harina de olote de maíz.....	46
III.2. Lavado de la harina de olote de maíz.....	46
III.3. Efecto del pretratamiento en la harina de olote de maíz.....	47
III.3.1. Efecto del pretratamiento en la morfología de la HOM por medio de microscopia electrónica de barrido ambiental (ASEM).....	47
III.3.2. Efecto del pretratamiento de los sólidos de la HOM sobre la cristalinidad de la celulosa por medio de Difracción de Rayos X.....	51
III.3.3. Efecto del pretratamiento de la HOM en la generación de azúcares reductores (AR) y azúcares totales (AT) presentes en la fase líquida.....	53
III.3.4. Efecto del pretratamiento en el grado de polimerización (GP) de los jarabes obtenidos.....	55
III.3.5. Efecto del pretratamiento en la formación de furfural (F) e hidroximetilfurfural (HMF) presentes en los jarabes provenientes del pretratamiento.....	57

IV.1. Efecto de la sacarificación sobre la harina de olote de maíz pretratada.....	57
IV.1.1. Efecto de la sacarificación en la morfología de la HOM por medio de microscopía electrónica de barrido ambiental (ASEM).....	57
IV.1.2. Efecto de la sacarificación sobre la cristalinidad de la HOM por Difracción de Rayos X.....	59
IV.1.3. Efecto de la sacarificación de sólidos de la HOM pretratados en la generación de azúcares reductores (AR) y azúcares totales (AT).....	61
IV.1.4. Efecto de la sacarificación en la formación de compuestos de inhibición como furfural (F) e hidroximetil-furfural (HMF) en los jarabes.....	65
V.1. Fermentación de los jarabes.....	66
VI.1. Evaluación de la producción de etanol en los jarabes resultantes de cada pretratamiento.....	68
VI.1.1. Rendimiento de etanol.....	68
Conclusiones.....	72
Recomendaciones.....	73
Bibliografía.....	74

RESUMEN

La producción de etanol a partir del olote de maíz permitiría contar con una alternativa renovable y amigable con el ambiente en comparación con los agentes oxigenantes de la gasolina como el MTBE comercializada en México. El etanol, o bioetanol, se puede obtener del olote de maíz como biomasa lignocelulósica mediante un proceso físico (pretratamiento mecánico) seguido de uno químico, hidrólisis de los polisacáridos presentes y fermentación de los azúcares fermentables a etanol.

El presente proyecto propone una valoración experimental del rendimiento de etanol obtenido a partir del olote de maíz. El olote de maíz molido (sólido control) se somete a tres diferentes pretratamientos: alcalino/peróxido (4.5%, 10% y 15% en concentración de sólidos), ácido diluido y organosolv. Dichos pretratamientos tienen el objetivo de facilitar la disponibilidad de los polisacáridos al agente de hidrólisis de manera que se incremente la cantidad de azúcares fermentables disponibles para su fermentación a etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. De esta forma, se determina cuál es el mejor pretratamiento del olote de maíz. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que el pretratamiento alcalino/peróxido al 15% p/v permite obtener la mayor producción de etanol.

Las operaciones unitarias a las cuales se sometió el olote de maíz fueron: La molienda, pretratamientos, sacarificación y fermentación. A los jarabes obtenidos se le determinaron los azúcares reductores (AR), azúcares totales (AT), furfural (F), hidroximetil furfural (HMF) y etanol, y por último a los sólidos se evaluaron por microscopia electrónica de barrido ambiental (ASEM) y difracción de rayos X.

CAPÍTULO 1. Antecedentes

I.1. Bioetanol como combustible

I.1.1. Bioetanol

El bioetanol es un biocombustible que se utiliza para sustituir en parte o completamente a la gasolina o a aditivos que aumentan el índice de octanaje en los motores de los carros, y debe proceder de origen vegetal obtenido a partir de la fermentación de mostos, entre otros, hasta llegar a un etanol absoluto (Mosquera y Merino, 2006). Además, es un término utilizado para el etanol producido a partir de la fermentación de carbohidratos de materiales de origen vegetal tales como caña de azúcar, maíz, residuos agrícolas y forestales a diferencia del que se obtiene del destilado del petróleo (SEMARNAT y col, 2008).

El bioetanol tiene tres aplicaciones principales (SEMARNAT y col, 2008):

- 1) En la industria como disolvente,
- 2) En la elaboración de bebidas alcohólicas y
- 3) Como un aditivo o un sustituto de la gasolina que es a la que nos enfocaremos.

El etanol hidratado (C_2H_5OH , $<0.1\% H_2O$) es el que se utiliza como combustible o agente oxigenante en los motores de los automóviles con rendimientos similares a los de la gasolina. Se puede utilizar 100% etanol en vehículos especiales denominados FFV (Flexible Fuel Vehicles, Vehículos de combustible flexible) como en Estados Unidos y Suecia (Mosquera y Merino, 2006). El primer vehículo híbrido que funciona con mezclas de etanol fue creado por la compañía de Ford Motor, cuyo modelo es Escape Hybrid E85. Al parecer dicho vehículo produce 25% menos dióxido de carbono que un Escape Hybrid normal que funciona con

gasolina. El etanol absoluto se puede mezclar con gasolina, mezcla denominada “gasohol”, hasta en un 22 % sin requerir hacer adaptaciones al automotor (Mosquera y Merino, 2006); y en Suecia es posible que el automovilista realice su propia mezcla de gasolina-etanol en la estación de servicio (Menéndez, 2001).

En México, se utilizan actualmente agentes oxigenantes derivados del Petróleo como el MTBE (metil terbutil éter), ETBE (5-Etil terbutil éter) y TAME (teramil metil éter). Por ejemplo, el ETBE utilizado en gasolinas aumenta el índice de octanaje además de no ser tan volátil como el etanol, de tener menor solubilidad en agua y poseer mejor eficiencia térmica (Tabla 1, Mosquera y Merino, 2006).

Característica (unidad)	Etanol		ETBE	
	Gasolina	Etanol absoluto		Etanol hidratado
Densidad (Kg/L)	0,75	0,79	0,81	0,74
Volatilidad (Kg/cm²)	0,75	1,52	1,18	0,34
Relación estequiometria (aire/combustible)	15,2		8,3	
Calor latente de vaporización (KJ/Kg)	376	903	1,14	
Índice de Octano (IOM)*	85	89	92	102
Índice de Octano (IOR)*	95	106	110	118
Auto ignición (°C)	367	550	560	570
Poder Calorífico inferior, PCi (KJ/Kg)	43	27	25	36

* IOM: Index Octane Motor ; *IOR: Index Octane Research

Tabla 1. Comparativa entre la gasolina, etanol y ETBE (Mosquera y Merino, 2006).

Se ha propuesto que el uso de biocombustibles reduce la generación de los principales gases de efecto invernadero (GEI) tales como el metano, dióxido de carbono y el óxido nitroso, a comparación con los combustibles a partir del petróleo, así como incentivar la diversificación de la industria y agricultura (SAGARPA Y CAMBIO CLIMATICO, 2009). Sin embargo, es necesario conocer la eficiencia de carbono, es decir, cuanto carbono resulta en el etanol en comparación con el carbono en la materia prima; la relación de energía renovable/fósil, i.e. la cantidad de energía generada en el etanol por la cantidad utilizada de energía fósil; el costo de generación de la energía; y otros problemas como la contaminación generada en el lugar de la planta de etanol, etc. (The Royal Society, 2008). Por otra parte, se establece que los biocombustibles, y en particular el bioetanol, no son rentables, además de ser la causa de la deforestación acelerada, por ser la causa del aumento del precio de los alimentos, así como de contribuir con más emisiones de GEI en ciertas condiciones (SAGARPA Y CAMBIO CLIMATICO, 2009).

I.1.2. Mercado de etanol en el mundo

El uso de biocombustibles como carburante nació con los propios automotores, sin embargo; fueron reemplazados por un petróleo económico hasta la crisis de los 1970s. Esto impulsó al gobierno de Brasil en formas alternas de energía, se lanzó el programa de PROALCOOL en 1975 para reemplazar la gasolina que se importaba por bioetanol a partir de caña de azúcar, cultivada en el mismo país. Los EE.UU. poseen uno de los programas más agresivos de apoyo a la producción de etanol a partir de los almidones contenidos en el maíz desde hace 20 años (Duffey, 2006).

En nuestros días, el precio del petróleo varía y tiene una tendencia al alza debida a problemas geopolíticos, reducción de las reservas en el mundo sí como producción de petróleo de menor calidad y con mayor contenido de contaminantes como el azufre, nitrógeno y metales pesados. Se propone que el reemplazo parcial

de la gasolina por etanol para el transporte ofrece la ventaja de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), además de promover el desarrollo rural y la exportación como en Brasil (Duffey, 2006).

La producción global de bioetanol se estima en 35 mil millones de litros, y queda muy por debajo de la producción de gasolina con 1.2 billones de litros anualmente en el mundo. El líder mundial de producción de bioetanol en el año de 2006 fue Brasil y seguido de cerca por EE.UU. (Duffey, 2006). En Estados Unidos y algunos países europeos se obtiene etanol a partir de los granos de cereales en general (1L por cada 2-5 Kg) y de raíces de remolacha (1L por cada 10 Kg), mientras que en países tropicales se obtiene a partir de la caña de azúcar (1L por cada 15-20 Kg) (Mosquera y Merino, 2006). El incremento más significativo de la producción de bioetanol global (12% anual) fue en el 2004 con 33 millones de litros, siendo el 60% procedente de la caña de azúcar y el restante de otros cultivos. Brasil alcanzó en 2006 el primer lugar aportando 15 mil millones de litros a partir de la caña de azúcar equivalente al 38% de la producción mundial; y satisface el 41% del consumo de combustibles con etanol. Lo anterior se explica en función de su experiencia tecnológica y adecuadas condiciones naturales para los cultivos de caña de azúcar sumado a los bajos costos de mano de obra (Duffey, 2006).

En ese mismo año, Estados Unidos superó la producción de bioetanol de Brasil con 19 mil millones de litros por año (Gray, 2007), seguido por éste con 17, China con 4, India con 2, y en quinto lugar Francia con 1 (Zhang y col, 2009). Así, el total de la producción de etanol en el mundo era de 38 mil millones de litros, es decir, el 70% de bioetanol mundial era producido en conjunto por EE.UU. y Brasil a partir de maíz y de la caña de azúcar, respectivamente (Serna, 2007). Lo que respecta en el año del 2008 al 2012, se espera que la producción de etanol crezca alrededor de 5 %, siendo el primer productor EE.UU. seguido de Brasil, tercer lugar China, después India, y en quinto lugar Alemania (Figura 1; Market Research Analyst, 2008).

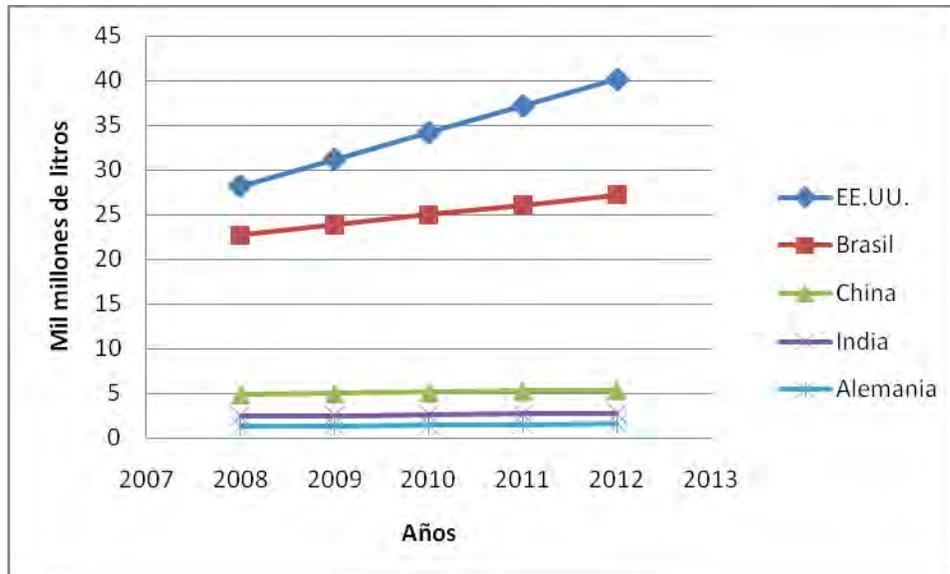


Figura 1. Previsiones de producción mundial de etanol del 2008 al 2012 en EE.UU., Brasil, China, India y Alemania.

La producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica es rentable ya que es muy abundante en el mundo y está puede ser aprovechada. Por ejemplo, la cantidad agrícola supera los 700 millones de toneladas por año en China, pero fue hasta el año 2005 en que la producción de etanol en China fue de 600 toneladas por año en el Fengxian Distric de Shanghai. Dicho etanol se obtiene por hidrólisis con ácido diluido e hidrólisis enzimática (Zhang y col, 2008).

Actualmente, la utilización de biomasa lignocelulósica para el proceso de etanol no es económica; Sin embargo, la tecnología llamada “Celunol”, de la corporación de Marubeni en Osaka, utiliza aserrín para producir 1.3 millones de etanol por año. Por otra parte, una corporación en Ottawa, Canadá, ha logrado una producción de etanol de 3 millones de litros al año equivalente al procesamiento de 40 toneladas de biomasa por día a partir de paja de trigo. De la misma forma, se espera en España una planta que tendrá capacidad de producir 5 millones de litros por año (70 toneladas de biomasa por día) de los residuos de los granos de cereales (Gray, 2007); mientras que en Cartagena, España, se ha puesto una instalación

de bioetanol a partir de los granos de cereales con una producción de 100 millones de litros por año. Si se instalan más plantas en Coruña, Castilla y León podría elevarse la producción hasta 500 millones de litros y así se satisfaría la demanda de ETBE con bioetanol al mercado español de gasolina (Menéndez, 2001).

Debido a que no se ha podido satisfacer la necesidad de etanol en EE.UU. y el costo del maíz ha incrementado, se ha tenido que aprovechar los residuos agrícolas de la caña de azúcar para producir 6 millones de litros de etanol con el objetivo de que su costo sea de 50 centavos de dólar por litro, lo que compite con el costo de la gasolina y hasta del mismo etanol comercial. Una vez llevado el proyecto a nivel industrial, se pretende producir de 80-120 millones de litros al año. Dicha biorefinería fue construida por la empresa Verenium en Cambridge, Massachussets (Bullis, 2008).

Debido a que el panorama energético mundial se encuentra actualmente en una grave crisis de disponibilidad y abasto de combustibles fósiles a los diferentes sectores productivos, por esta razón, varios países han desarrollado tecnologías para el aprovechamiento de las fuentes de energía renovable como las usadas en los biocombustibles (SEMARNAT y col, 2008).

I.1.3. Mercado del etanol en México

México se ha rezagado en la implementación de un plan energético que considere la utilización de biocombustibles que permita paliar con la constante disminución de las reservas de combustibles fósiles así como el incremento del precio del petróleo y de sus derivados. Los biocombustibles se identifican como aquellos obtenidos a partir de biomasa mediante su procesamiento químico, térmico o biotecnológico (Aburto y col, 2008), entre ellos en México la producción de bioetanol a partir de la caña de azúcar y la remolacha es mayor que la obtención de biodiesel a partir del aceite de palma (Fulton y col, 2004; Figura 2).

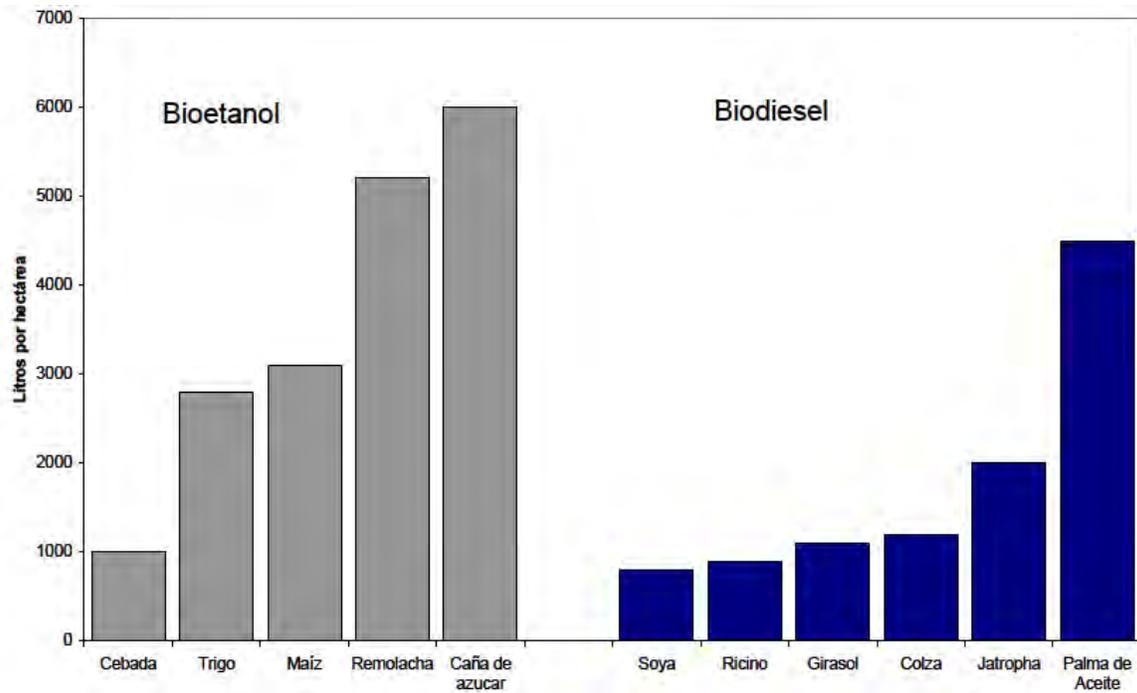


Figura 2. Comparación de la producción del bioetanol y biodiesel (Fulton y col, 2004).

La producción de etanol es insuficiente para oxigenar las gasolinas comercializadas en México por PEMEX, ya que se requieren 661.5 millones de litros de etanol. Sin embargo, si se combina la producción potencial de etanol a partir de la caña de azúcar con la obtenida del sorgo dulce se podría reemplazar casi toda la gasolina que utiliza el sector privado de automóviles en México (SEMARNAT y col, 2008). En el 2007, el consumo de gasolina era de 107 millones de litros al día, lo cual demandaría 16 millones de litros de bioetanol diariamente. El potencial energético del maíz, comparado con los otros cultivos para bioetanol, es bajo ya que se necesita casi el doble de extensión de tierra cultivada para producir la misma cantidad de bioetanol a partir de caña de azúcar, lo cual hace muy poco factible que este sea una opción de producción de bioetanol en México (Serna, 2007).

Por esa razón, entre otras, se aprobó la ley de bioenergéticos en el año del 2008 en la que se fomenta la utilización de bioetanol en el mercado de gasolina nacional

con el fin de disminuir el uso de agentes oxigenantes como el éter metil-terbutílico (MTBE), éter etil-terbutílico (ETBE) y el éter teramil-metílico (TAME) que ha resultado dañino al ecosistema, así como para contribuir en la reducción de la importación de gasolina procedente de EE.UU. Manteniéndose la exigencia de oxigenación de gasolinas utilizadas en la Zona Metropolitana en un 2% en masa, se requiere una mezcla con 11, 12 o 5.7 % de MTBE, ETBE o etanol en volumen, respectivamente (Aburto y col, 2008). En el mes de septiembre de 2009, PEMEX lanzó la adquisición de 176 millones de litros anuales de etanol que serán mezclados con las gasolinas que se comercializan en la Zona Metropolitana de Guadalajara. En meses pasados se realizó una prueba piloto en Monterrey, donde se utilizaron 151 mil 600 litros de Etanol anhidro obtenido de caña de azúcar y distribuidos en un total de 2.53 millones de litros de gasolina. Así, la introducción del etanol en la Ciudad de Monterrey y en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México dependerá de los resultados de la Zona Metropolitana de Guadalajara y cuya demanda está estimada en 626 millones de litros anuales (Ocaña, 2009).

I.1.4. Métodos de obtención de bioetanol

La producción de bioetanol se realiza principalmente a partir de fuentes ricas en azúcares fermentables como la sacarosa, obtenidos a partir de la caña de azúcar solamente o amiláceas por medio de tecnología de primera generación para hidrolizar almidones contenidos en granos de cereales como el maíz, trigo, entre otros. En menor manera, se produce etanol a partir de biomasa lignocelulósica pero la tecnología de segunda generación aun se encuentra en fase de desarrollo. Por esta razón, las materias primas para la producción de biocombustibles se clasifican en general en tres categorías básicas (SEMARNAT y col, 2008).

Las materias primas con alto contenido de almidón o de biomasa lignocelulósica deben procesarse para incrementar el área superficial del material a los diversos catalizadores de hidrólisis que permiten generar monosacáridos fermentables. En general, materiales ricos en azúcares seguidos de los amiláceos permiten obtener

un buen rendimiento de etanol con un costo competitivo con la gasolina (Menéndez, 2001). Por otro lado, el etanol obtenido a partir de materiales lignocelulósicos tienen un balance energético más favorable en comparación con el de primera generación, disminuye la generación de GEI pero su costo es aun alto (Tabla 2, Grassi y Tripsa, 2004).

La tecnología de tercera generación se refiere a los cultivos marinos utilizados para la producción de bioenergéticos como las algas marinas (SENARNAT y col, 2008), pero no abordaremos en éste trabajo dicho tema.

Categoría	Fuentes	Ejemplos	Proceso	Ventaja	Desventaja
Primera generación	Sacarosa (melazas)	Cultivos sacáridos: caña de azúcar, remolacha, sorgo dulce.	Extracción de jugo. Fermentación.	No requiere tratamiento ni hidrólisis previa.	Materia prima perecedera. Alto costo de transporte. Estacionalidad de producción.
		Azúcares invertidos y glucosa: melazas y lactosas.	Destilación.		
	Almidón	Granos de cereales: maíz, sorgo, trigo, cebada.	Molienda. Gelatinización.	Los granos pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo: Producción constante. Alto valor de subproductos.	Proceso que requiere mayor inversión y gastos de energía.
		Productos procesados: harina de trigo, cascarilla de maíz.	Licuefacción. Sacarificación.		
		Raíces: Yuca, papa, alcachofa de Jerusalén, pataca.	Fermentación. Destilación.		
	Segunda generación	Celulosa	Residuos lignocelulósicos: Aserrín, paja, residuos boscosos, residuos agrícolas, lejía celulósica.	Tratamiento fisicoquímico de la biomasa. Hidrólisis enzimática o con ácido.	Materia prima más abundante y barata.
Residuos urbanos e industriales: papel, fracciones celulósicas.			Fermentación. Destilación.		

Tabla 2. Características de la materia prima de primera y segunda generación (SEMARNAT y col, 2008; Serna, 2007).

Las diferencias de proceso de la materia prima con las tecnologías de primera y segunda generación consisten básicamente en el pretratamiento, sacarificación y fermentación de los azúcares reductores producidos (Figura 3). Al utilizar tecnologías de primera generación, los azúcares reductores se obtienen de la extracción de la caña de azúcar y del maíz, de la gelatinización e hidrólisis enzimática del almidón. La fermentación se realiza de manera convencional utilizando cepas del género *Saccharomyces*. En el caso de las tecnologías de segunda generación, es necesario realizar un pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para aumentar la accesibilidad del material a la sacarificación y posterior fermentación. En ambos casos al final de las etapas se destila para obtener etanol (Quintero, 2009).

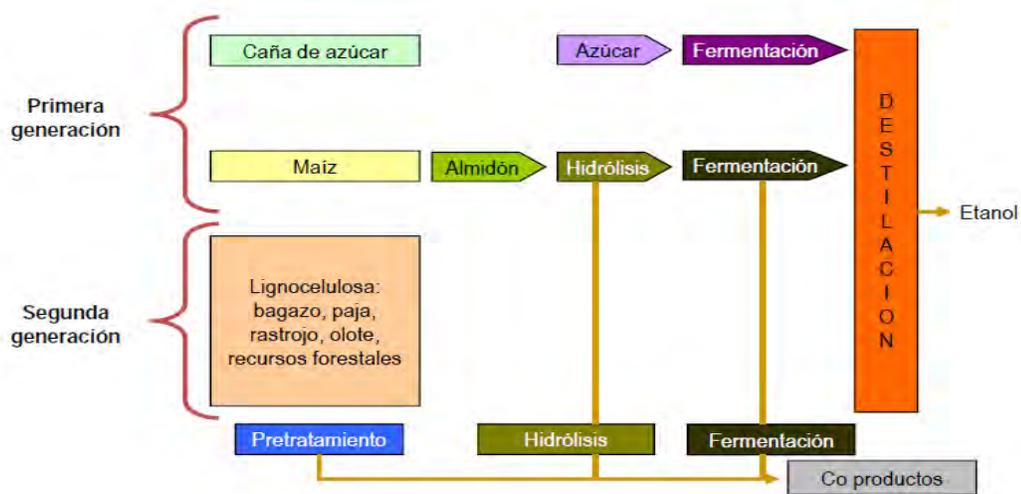


Figura 3. Tecnologías de 1^a y 2^a generación para producción de etanol (Quintero, 2009).

I.2. Material lignocelulósico

En EE.UU., la cantidad del olote de maíz que se genera se estima en 80-100 millones de toneladas secas/año (ton/año), la cual estaría disponible para las plantas de etanol y una parte se destinaría a productos de reemplazo de pulpa de madera en la madera aglomerada, alimento para ganado, y producción de furfural. Así, se contaría con un estimado de 60-80 millones de toneladas secas/año de olote de maíz disponible para la producción potencial de etanol de 11 mil millones litros por año. Por su parte, los EE.UU. requieren 20 millones de toneladas secas/año para satisfacer su demanda interna (Kadam y McMillan, 2003). Existen diversos materiales lignocelulósicos o “biomasa” que pueden ser utilizados, tales como los residuos agrícolas como el rastrojo de maíz (hojas, tallos y mazorca), paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, así como productos forestales (maderas duras como el álamo, y maderas suaves como el pino), y cultivos energéticos como pasto y hierva. Entre las ventajas que presentan la biomasa en la producción de etanol se mencionan (Gray, 2007):

- ✓ Materia de bajo costo y muy abundante.
- ✓ Mayor balance energético (energía producida/energía consumida) en comparación con el etanol de 1ª generación y combustibles convencionales fósiles.
- ✓ No compite en la generación de alimentos para el consumo humano.
- ✓ Retorno y crecimiento económico del campo abandonado.

La biomasa es un complejo material compuesto de celulosa (30-50%), hemicelulosa (20-40%), y lignina (15-30%). La celulosa es la molécula más abundante del mundo y forma parte de la pared de la célula vegetal, contribuye a la estructura e integridad de la planta, y está compuesta por un homopolímero de glucosa con enlaces

glucosídicos β -1,4. Su estado nativo es altamente cristalino, compacto y resistente a los ataques biológicos (Figura 4; Gray, 2007).

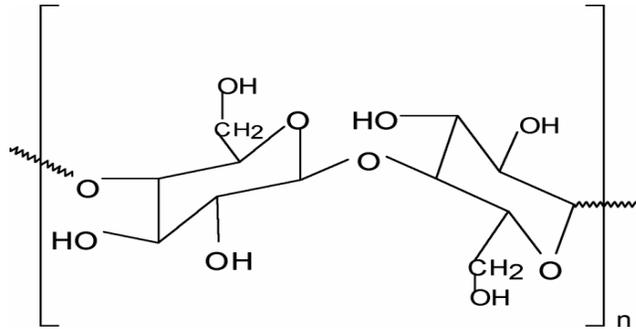


Figura 4. Estructura de la celulosa (Gray, 2007).

Por otro lado, la hemicelulosa es un heteropolímero formado de hexosas y pentosas, y a diferencia de la celulosa que es cristalina, la hemicelulosa tiene una estructura amorfa y de poca resistencia, fácilmente hidrolizable (Arnaldos y col, 2004). La hemicelulosa proviene principalmente de materiales herbáceos como el olote de maíz y pasto compuesto con alto contenido de arabinoxilana, galactosa, manosa y ácido glucorónico. El principal compuesto de hemicelulosa en las maderas duras es el glucuroxilano, mientras que las maderas suaves contienen más galactoglucomanano. Las hemicelulosa puede poseer también grupos acetilo así como enlaces éter y otros con la lignina, (Gray, 2007) así como poseer enlaces con microfibrillas de la celulosa formando una red tridimensional que conforma la pared celular (Figura 5; Yu y col, 2007).

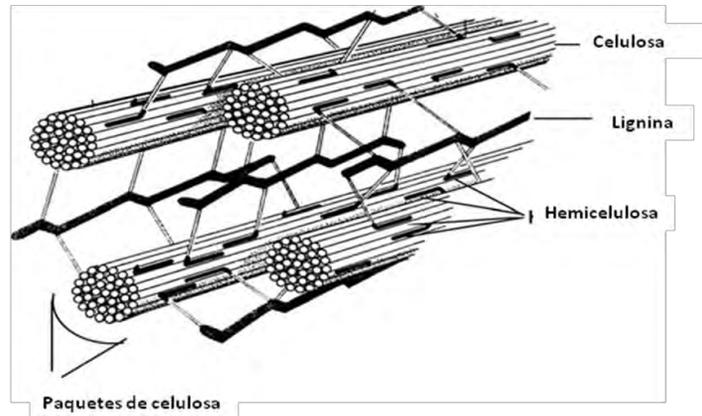


Figura 5. Esquema de material lignocelulósico (Adaptada de Yu y col, 2007).

La lignina imparte fuerza y resistencia a la interacción celulosa-hemicelulosa, y dificulta la accesibilidad a parásitos y enfermedades; por lo que su presencia impide la hidrólisis sencilla de los polisacáridos (Mosier y col, 2005). Después de la celulosa, la lignina es el compuesto más abundante en las plantas, un polímero altamente ramificado con grupos fenilpropanoides aunque no se sabe con exactitud su estructura ya que es difícil su extracción por dicha red que forma con la celulosa y otros polisacáridos de la pared celular (Taiz y Zeiger, 2006). La lignina es un material más complejo constituido por compuestos fenólicos como 4-hidroxi-3,5-dimetoxi (siringilo), 4-hidroxi-3-metoxi (guaiacilo), y p-hidroxifenilo (Gray, 2007). Las proporciones de los tres monómeros en la lignina varía entre las especies, órganos vegetales e incluso entre las capas de la pared celular. En el polímero existen con frecuencia enlaces C-C y C-O-C en cada unidad de alcohol fenilpropanoide, generando una estructura compleja que se ramifica en tres dimensiones. A diferencia de la celulosa, la lignina no se encuentra unida por unidades únicas y repetitivas. Se encuentra en la pared de tejidos vegetales que sirven como soporte y transporte, se deposita principalmente en la pared secundaria en contacto estrecho entre celulosa y hemicelulosas (Figura 6; Taiz y Zeiger, 2006).

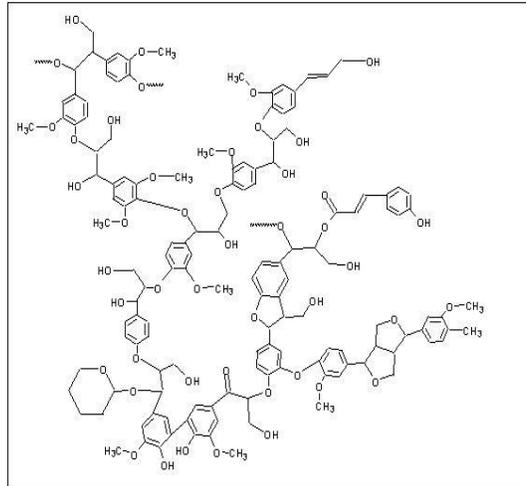


Figura 6. Estructura de la lignina (Taiz y Zeiger, 2006).

I.2.1. Composición del olote de maíz

El olote de maíz es el núcleo de la mazorca una vez quitado el grano (Reed, 2005) y que está compuesta por celulosa (35%), hemicelulosa (22%) y en menor proporción por lignina (18%; Gray, 2007). La celulosa y hemicelulosa constituyen la fuente potencial de azúcares fermentables, por lo que en el caso del olote es una ventaja tener a estos componentes en mayoría y la lignina en minoría. El olote de maíz así como los restos de los tallos secos de la cosecha de maíz no contienen almidón y su valor alimenticio es bajo, pero su contenido en celulosa y hemicelulosa lo hacen una fuente potencial para producir etanol (Paliwal, 2001).

I.2.2. Producción de maíz en el mundo

El maíz en el mundo tiene diversos usos pero se destina principalmente al consumo humano, insumo para la industria y producción (Vega y Ramírez, 2004). El maíz es la segunda materia prima que se produce en el mundo con 788 millones de toneladas, antecedido por la caña de azúcar y seguido por el arroz (Figura 7; FAOSTAT-agriculture, 2007).

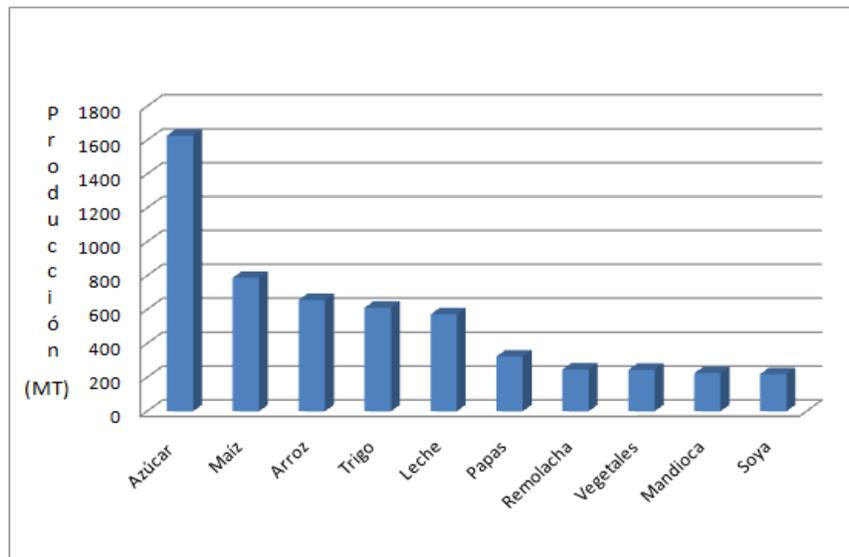


Figura 7. Los cultivos agrícolas más producidos en el mundo, millones de toneladas (MT) (FAOSTAT-agriculture, 2007).

México es el cuarto productor de maíz a nivel mundial con una producción de 19.2 millones de toneladas (Figura 8; FAOSTAT-agriculture, 2007). La participación de los EE.UU. es creciente puesto que el ciclo 1996 y 1997 participaba con el 59% del mercado mundial, cuatro años después se incrementó hasta el 70% (Vega y Ramírez, 2004).

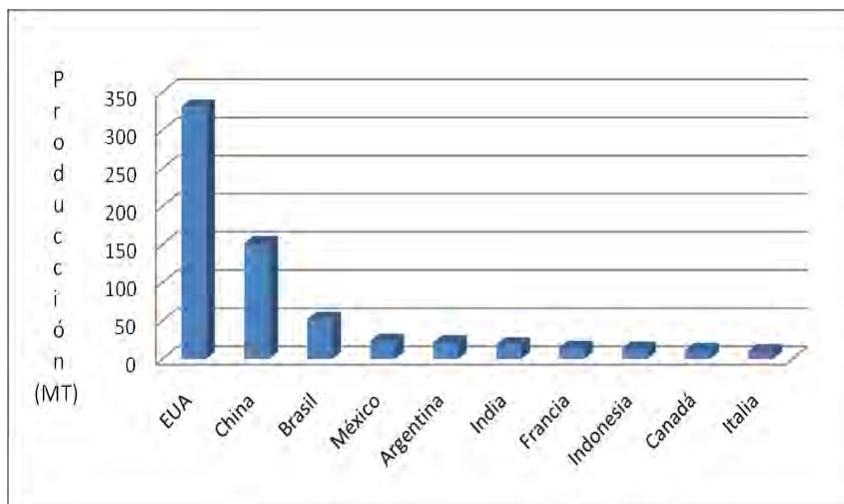


Figura 8. Los primeros diez países productores de maíz (FAOSTAT-agriculture, 2007).

I.2.3. Producción de maíz nacional

El maíz siempre ha sido el cultivo agrícola más importante de México en el sector alimenticio, como industrial, político y social. El maíz ocupa el segundo lugar en producción en México con 23.5 millones de toneladas, siendo el primer lugar de producción la caña de azúcar, y en tercer lugar la leche de vaca (Figura 9; FAOSTAT-agriculture, 2007). El volumen de la producción de maíz creció en el período del 1996 a 2006 un 2%, no obstante de los decrementos registrados en 2002 (4%) y 2005 (11%) en la producción. En México se producen diversas variedades de maíz, sin embargo la más importante es la del maíz blanco que se produce exclusivamente para el consumo humano por su alto contenido nutricional, y cuya participación en la producción total de maíz fue de 95% en 2004 y 93% durante 2005, lo que representa un volumen de producción promedio anual de 19.2 millones de toneladas. En tanto que el maíz amarillo utilizado en procesos industriales y alimentación animal representó el 6% en promedio durante 2004-2005 de la producción total. En México, el maíz es ocupado para diversos tipos de industrias agrícolas como (Vega y Ramírez, 2004):

- ✓ Molienda de nixtamal para masa de tortillas, tamales y atoles.
- ✓ Industria para la fabricación de harina industrializada de maíz nixtamalizado.
- ✓ Fabricación de almidones, féculas, levaduras y productos similares, que incluyen insumos de industrias químicas como la papelera, farmacéutica y textil.
- ✓ Industria botanera de frituras de maíz y palomitas.
- ✓ Industria cerealera como son las hojuelas de maíz.
- ✓ Industria de suplementos alimenticios.

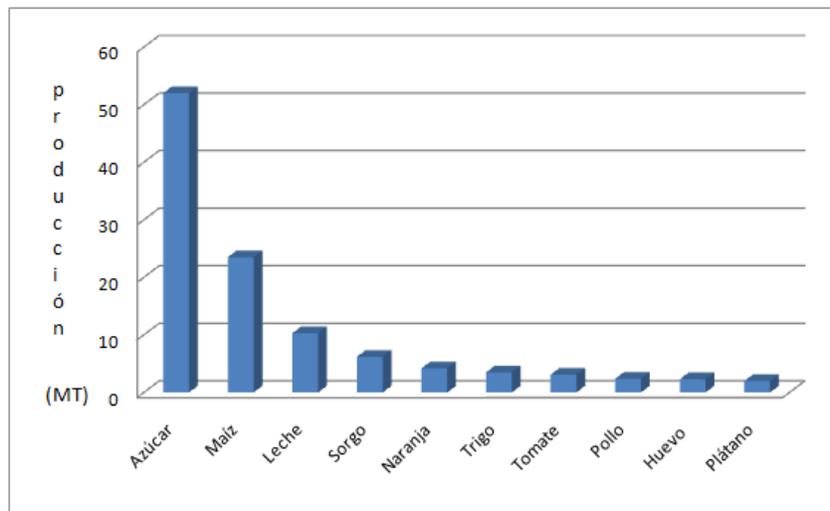


Figura 9. Los principales cultivos agrícolas y pecuarios en México (FAOSTAT-agriculture, 2007).

Como se puede observar, el maíz es el segundo producto agrícola más producido a nivel mundial y en México, que a nivel internacional es el cuarto país productor de maíz (FAOSTAT-agriculture, 2007). La producción de etanol a partir de maíz se estima en 0.95 USD/galón, mientras que su producción a partir de olote de maíz se evalúa en 1.45 USD/galón (Minteer, 2006). Sin embargo, el uso de almidón de maíz para la producción de etanol pone en riesgo a la alimentación humana y sólo podría

utilizarse el excedente de las zonas de producción. Así, se podría valorizar al olote de maíz en la producción de etanol y disminuir la cantidad de éste “desperdicio urbano” (CATIE, 1991).

El maíz es producido en las 32 entidades federativas del país, en el período comprendido entre 1995 al 2000 el 70% de la producción fue de 17.9 millones de toneladas, la cual se obtuvo de 8 estados: Jalisco, Sinaloa, México, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Puebla y Oaxaca (Vega y Ramírez, 2004).

En términos generales, se estima que la producción de maíz mantendrá su tendencia ascendente, ya que se pronostica que la producción para el periodo 2007-2012 será de 1.6% con 23.5 millones de toneladas anuales ya que habrá una mayor inversión financiera en los principales estados productores (Vega y Ramírez, 2004).

1.2.4. Importancia de la hidrólisis y conversión en azúcar del olote de maíz

La producción de bioetanol como combustible a partir del olote incluye cinco pasos principales (Gray, 2007):

- 1) Recolección de material agrícola,
- 2) El pretratamiento del material lignocelulósico,
- 3) Sacarificación fisicoquímica o enzimática de polisacáridos,
- 4) Fermentación de monosacáridos (pentosas y hexosas) a etanol y
- 5) Purificación de etanol.

La composición del olote influye en la digestibilidad para la fermentación de la materia prima, por lo cual, si se desea que el proceso de obtención de etanol sea eficiente se necesita una conversión de celulosa y hemicelulosa a glucosa (azúcar fermentable) a partir de la hidrólisis, ya que los componentes no azucarados como la

lignina de la pared celular tiene un impacto negativo en la sacarificación y por consiguiente en la fermentación (Gray, 2007).

Lo que afecta principalmente la accesibilidad del área superficial de la celulosa es el grado de polimerización, el contenido de humedad (Hendriks y Zeeman, 2008) y la protección por lignina y hemicelulosa; Sin embargo se debe de tomar en cuenta un factor mayor, la cristalinidad de la celulosa ya que previene la hidrólisis de la misma, por lo que se debe de usar un método eficaz que además reduzca al mínimo la degradación del azúcar (Mosier y col, 2005).

Al disminuir el tamaño de partícula del material aumenta la disponibilidad de la superficie de contacto de la celulosa, por lo que disminuye su cristalinidad y polimerización, esto a su vez, beneficia a una mejor hidrólisis (Hendriks y Zeeman, 2009).

I.2.4.1 Pretratamiento del material lignocelulósico

Para que el material lignocelulósico sea hidrolizable, este se tiene que pretratar de forma que debe romper principalmente la red de lignina y destruir la estructura cristalina de la celulosa en el proceso de conversión de la biomasa a azúcares fermentables. De este modo los agentes químicos o las enzimas hidrolíticas penetran y causan la hidrólisis, por eso es uno de los pasos más costosos como se ilustra esquemáticamente en la figura 10 (Mosier y col, 2005). El objetivo principal de los pretratamientos es mejorar el rendimiento (Hendriks y Zeeman, 2009).

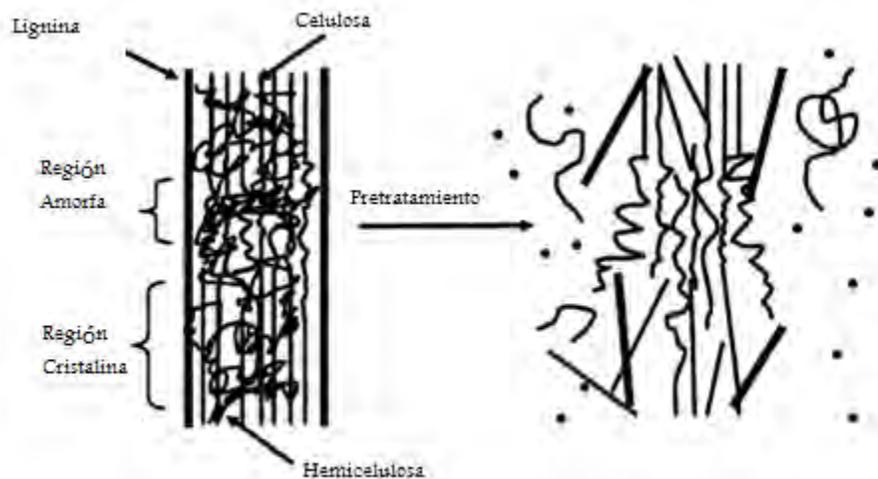


Figura 10. Esquema del efecto del pretratamiento de material lignocelulósico.

Para que el pretratamiento sea eficaz se debe de tomar en cuenta los siguientes criterios (Mosier y col, 2005):

- Sí se cuenta con un material lignocelulósico de partículas diminutas, se evita la reducción de tamaño, lo cual ahorra un gasto.
- Conservar las pentosas provenientes de las fracciones de la hemicelulosa.
- Producir la mínima cantidad de productos de degradación que inhiben el crecimiento de microorganismos fermentativos.
- Reducir el uso de catalizadores.
- Seleccionar la mejor opción de pretratamiento de acuerdo al que genera menor cantidad de lignina.
- Realizar un balance general de acuerdo a los volúmenes de etanol a obtener, basándose en la inversión financiera de cada uno de los procesos, desde el pretratamiento que el más costoso hasta la obtención de biomasa lignocelulósica que es el de menor costo.

La clasificación de los pretatamientos depende de los efectos que estos causan a la biomasa, los cuales pueden ser físicos o químicos o ambos. En caso del lavado con agua, esta es excluida como pretratamiento porque no causa cambios químicos en la biomasa (Mosier y col, 2005).

1) Pretratamiento físicos: Reducen el tamaño de partícula mecánicamente.

a) La pulverización:

- Por molinos de bolas o martillos.
- Molienda de compresión.
- Explosión de vapor e hidrotermólisis.

2) Pretratamientos químicos:

a) Ácidos o bases promueven la hidrólisis y mejoran la recuperación de glucosa de la celulosa removiendo hemicelulosa o lignina. Los más usados son el ácido sulfúrico, H_2SO_4 , e hidróxido de sodio, NaOH, respectivamente.

b) Solventes que disuelven a la celulosa en el bagazo, tallo, maíz y hierba, los cuales causan la conversión de celulosa a la glucosa.

c) Alcalino/peróxido NaOH/ H_2O_2 , ozono, organosolv (usa ácidos de Lewis, $FeCl_3$ o $(Al)_2SO_4$ en alcoholes acuosos), glicerol, dioxano, el fenol, o el etilenglicol, entre solventes conocidos que afectan la estructura de la celulosa para promover la hidrólisis.

d) Ácidos concentrados (H_2SO_4 , HCl), disolventes a base de amoníaco (NH_3 , hidracina), disolventes apróticos (DMSO), complejos metálicos (tartrato férrico de sodio) y una oxidación ligera también reducen la cristalinidad de la

celulosa e interrumpe la asociación de la lignina con la celulosa, así como la disolución de la hemicelulosa.

- e) Otros como la explosión de vapor con ácido diluido o con SO_2 , extracción con agua caliente, base débil con amonio (AFEX) o cal (Gray, 2007).

Para la separación de los componentes de la materia prima, los tratamientos pueden adaptarse al disolvente de extracción. Los métodos de pretratamiento afectan la subsecuencia enzimática de la sacarificación y de la fermentación de azúcar. Por ejemplo los pretratamientos con ácido, es simultanea la sacarificación y sin necesidad de la utilización de enzimas, mientras que un pretratamiento con álcalis es necesaria su posterior sacarificación. El pretratamiento ácido forma compuestos que inhiben los microorganismos fermentativos como furfural e hidroximetil furfural (HMF) como lo muestra la figura 11. Mientras que los pretratamientos con álcalis liberan fragmentos de acetato, ferulato y lignina (Gray, 2007). En el caso del pretratamiento térmico, este favorece la solubilización de la hemicelulosa y acidificación del medio, lo cual coadyuva a su despolimerización y decremento del índice de cristalinidad (I_C) del material que contiene más celulosa (Hendriks y Zeeman, 2009).

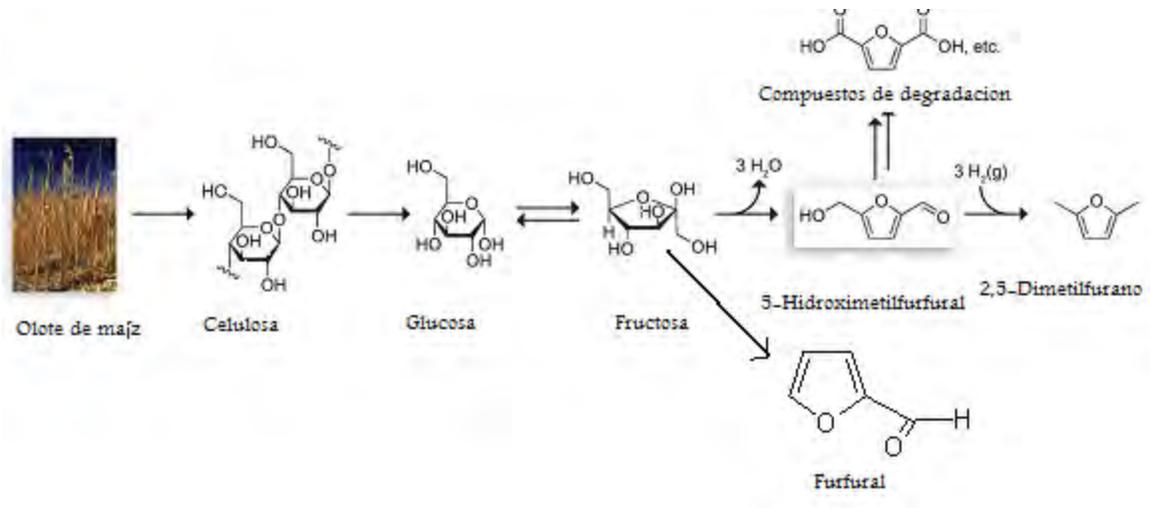


Figura 11. Conversión de la celulosa del olote de maíz a Furfural, HMF y otros compuestos de degradación (Binder y Raines, 2009).

Ahora, se presentará de manera más detallada los pretratamientos utilizados en la experimentación: mecánico, alcalino-peróxido, ácido diluido y organosolv.

I.2.4.1.1. Mecánico

Consiste en un corte de la biomasa lignocelulósica en piezas cada vez más pequeñas, cuyo objetivo principal es una reducción de tamaño de partícula por lo que aumenta la superficie de contacto y una reducción del grado de polimerización (GP), a consecuencia la celulosa se hidroliza más rápido, por lo que incrementa el rendimiento de la hidrólisis de la lignocelulosa. Esto depende de (Hendriks y Zeeman, 2009):

- Tipo de biomasa.
- Tipo de molienda.
- Duración de la molienda.

- Tamaño de partícula: Por ejemplo la partícula inferior a 40 mallas tiene poco efecto en cuanto el rendimiento de la hidrólisis así como el tiempo de digestión.

I.2.4.1.2. Alcalino/Peróxido

Consiste en la adición de un solvente oxidante, como el peróxido de hidrógeno o ácido peracético, a la biomasa, que está suspendida en el agua. El principal objetivo es eliminar la hemicelulosa y lignina para aumentar la accesibilidad a la celulosa (Hendriks y Zeeman, 2009) y disminuir su cristalinidad, lo cual ayudará a generar mayor cantidad de azúcares fermentables. De este modo se pueden obtener rendimientos hasta de 97%, como en la paja de trigo (Saha y Cotta, 2007).

Es importante de que el solvente oxidante utilizado sea selectivo, de no ser así existen pérdidas de hemicelulosa y celulosa, además de ocurrir la formación de compuestos inhibidores, ya que la lignina se oxida. Por esta razón se ha optado el uso de peróxido de hidrogeno, H_2O_2 , para la deslignificación y se han ajustado condiciones favorables como el intervalo de pH de 10 a 11.5. La deslignificación es probablemente causada por el ión hidroxilo (HO^-), el cual es un producto de degradación de peróxido de hidrógeno en un máximo de pH 11.5, además de que la mitad de la lignina se solubiliza a temperaturas cercanas de 25 °C con una duración de 18 a 24 horas (Hendriks y Zeeman, 2009).

I.2.4.1.3. Ácido diluido

El ácido sulfúrico diluido ha sido añadido a materiales celulósicos durante algunos años para producir furfural; Sin embargo, los ácidos: nítrico, hidroclicórico y fosfórico también han sido utilizados (Mosier y col, 2005). Además de ser el pretratamiento más popular para la producción de bioetanol lignocelulosico vía a hidrólisis enzimática (Teramoto y col, 2009) y ser el método más empleado para retirar la

hemicelulosa en maderas duras, hierbas y residuos agrícolas (Mosier y col, 2005). En contraste, tiene el inconveniente de formar aldehídos como furfural, los cuales impiden la conversión de polisacáridos a monosacáridos, además de inhibir la fermentación del etanol (Teramoto y col, 2009).

El mecanismo de acción de este pretratamiento empieza desde que se añade el ácido sulfúrico a la biomasa y después con la dilución del mismo, se remueve la hemicelulosa (Herrera y col, 2004) trayendo como efecto una mejor digestión de todos los sólidos a una temperatura de 160 °C (Mosier y col, 2005) por esta razón la sacarificación y fermentación son simultáneas (Herrera y col, 2004).

La comparación de los efectos de la materia lignocelulosa de los pretratamientos: mecánico, alcalino/peróxido y ácido diluido se muestran en la tabla 3.

Pretratamiento	Accesibilidad de la superficie	Cristalización de la celulosa	Solubilidad de la hemicelulosa	Formación de Furfural y HMF
Mecánico	+	-	ND	ND
Ácido diluido	+	-	+	+
Térmico + ácido	+	ND	+	+
Alcalino/peróxido	+	ND	-	--
Térmico + alcalino/peróxido	+	ND	-	+

Tabla 3. Efectos de los diferentes pretratamientos sobre la estructura de la materia lignocelulósica. +: Efecto importante, - : Efecto menor, ND: no determinado (Hendriks y Zeeman, 2009).

I.2.4.1.4. Organosolv

Este pretratamiento consiste en pasar por varios procesos de deslignificación (eliminación de lignina) con el apoyo de disolventes orgánicos y soluciones de ácido diluidas en agua; también se utilizan hidróxido de sodio o sulfato de sodio (Mesa y col, 2010). Una vez que se separa la lignina de la celulosa, esta última puede ser fácilmente hidrolizada a glucosa y a su vez ser fermentada por las levaduras (Araque y col, 2008).

Una ventaja del pretratamiento de organosolv, es que se genera un bajo nivel de inhibidores de la fermentación (Mesa y col, 2010), los cuales se pueden dividir de acuerdo a su origen (Araque y col, 2008):

- Ácidos débiles como: Ácido fórmico, ácido acético y ácido levulínico.
- Derivados de furanos como: Furfural, 5-hidroxi-2-metilfurfural (HMF).
- Compuestos fenólicos que son los productos de degradación de la lignina.

Ahora analicemos lo que sucede con la masa lignocelulósica, sí esta se calienta por encima del intervalo de 150-180 °C. Lo que primero se empieza a solubilizar es la hemicelulosa y poco después la lignina. Los dos componentes dominantes de las hemicelulosas; Xilano y glucomanano, son estables a 180 °C, por lo que una reacción exotérmica de solubilización de la hemicelulosa comienza. Durante el calentamiento térmico una parte de la hemicelulosa se hidroliza y forma ácidos. Estos ácidos catalizan la hidrólisis de la hemicelulosa y la solubilizan (Hendriks y Zeeman, 2009).

I.2.4.2. Sacarificación del material lignocelulósico

El objetivo principal de sacarificación consiste en convertir los polímeros de carbohidratos presentes en la materia pretratada a monosacáridos, es decir, azúcares fermentables para un mejor rendimiento en la obtención de etanol (Mosier y col, 2005). Este paso se puede llevar a cabo mediante hidrólisis ácida o enzimática, esta última es de gran costo, además de que su actividad disminuye en función del tiempo, es inestable a elevadas temperaturas y es difícil su recuperación (Whitaker, 2003), en cambio, con la hidrólisis ácida se obtiene mayor cantidad de azúcares fermentables (Zhang y col, 2009).

I.2.4.2.1. Hidrólisis ácida

Para que la celulosa y la hemicelulosa puedan ser hidrolizables, una forma de degradar celulosa es por hidrólisis enzimática con celulasas o por hidrólisis química con ácido sulfúrico, ya que rompen los enlaces β -1,4 glucosídicos que mantienen unidos a los monómeros de las moléculas de celulosa y hemicelulosa (Mosier y col, 2005).

Cuando se lleva a cabo la hidrólisis ácida, se comienza con una explosión al vapor la cual genera compuestos que inhiben la fermentación del etanol, como el furfural, HMF y compuestos fenólicos solubles. El efecto positivo que genera el vapor se debe principalmente a la eliminación de una gran parte de la hemicelulosa, causando un aumento de la reactividad de la celulosa (Hendriks y Zeeman, 2009).

Al ser expuestos los monómeros de celulosa y hemicelulosa al vapor se corre el riesgo de que se condensen y precipiten los componentes solubles de lignina, haciendo la biomasa menos digerible y reduciendo la producción de etanol (Hendriks y Zeeman, 2009).

I.2.4.3. Factores que influyen en la fermentación del olote de maíz

El bioetanol vendido en el mercado es normalmente obtenido a partir de caña de azúcar o maíz (Zhang y col, 2009), ya que su procesamiento es más factible debido a su composición, la sacarosa y el almidón, no requieren de pretratamiento ya que en una fermentación tradicional solo se requiere de glucosa (Lehninger y col, 1995).

Cuando es utilizado el olote de maíz es necesario dicho pretratamiento para mejorar la producción de los azúcares monoméricos en la fase de hidrólisis (Hendriks y Zeeman, 2009). La celulosa, al ser el componente mayoritario, está constituida por una cadena de glucosa y esta última es fácil de fermentar. Pero se contrarresta con las pentosas como xilosa y arabinosa de la hemicelulosa, las cuales no pueden ser fermentadas por *Saccharomyces cerevisiae*. En cambio sí se empleara una bacteria modificada genéticamente que fermentara hexosas y pentosas por igual, se elevaría la eficiencia en la obtención de etanol (Mosier y col, 2005).

Otro de los factores que afectan la fermentación son los productos inhibidores de la producción de etanol como el furfural y sus derivados, e incluso los compuestos solubles de la lignina, ya que afectan el crecimiento de la levadura (Hendriks y Zeeman, 2009).

También es importante tomar en cuenta parámetros como pH, temperatura, medio de cultivo, nutrientes y concentración del inóculo en la fermentación (Hendriks y Zeeman, 2009).

1.3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes pretratamientos fisicoquímicos en la generación de azúcares fermentables.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de los pretratamientos: Alcalino/peróxido al 4.5, 10 y 15 % (p/v), ácido diluido y organosolv en la cristalinidad y morfología de la celulosa del olote de maíz.
- Evaluar el efecto de los pretratamientos: Alcalino/peróxido al 4.5, 10 y 15 % (p/v), ácido diluido y organosolv en la generación de azúcares reductores y totales.
- Evaluar el efecto de los pretratamientos: Alcalino/peróxido al 4.5, 10 y 15 % (p/v), ácido diluido y organosolv en el grado de polimerización.
- Evaluar el efecto de la sacarificación sobre la cristalinidad y morfología del olote de maíz pretratado.
- Evaluar el efecto de la sacarificación del olote de maíz pretratado en la generación de azúcares reductores y totales.
- Evaluar el efecto de la sacarificación del olote de maíz pretratado en el grado de polimerización alcanzado.

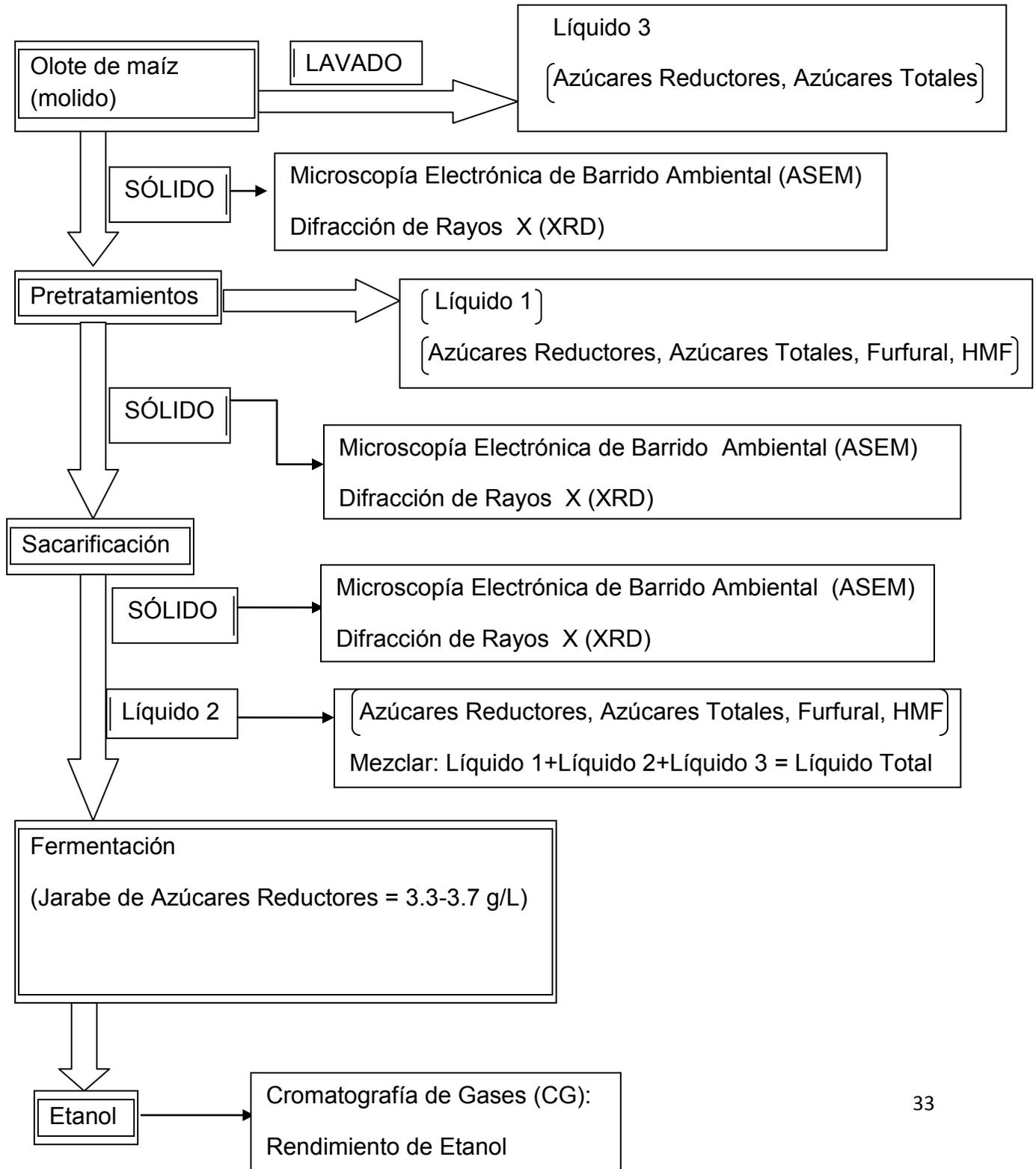
- Determinación de furfural y HMF en los jarabes generados para cada pretratamiento y sacarificación.
- Evaluar la producción de etanol de la fermentación de cada una de las series de pretratamiento-sacarificación.

Hipótesis

- Los pretratamientos: Alcalino/peróxido al 4.5, 10 y 15 % (p/v), ácido diluido y organosolv del olote de maíz permitirá aumentar la accesibilidad de su estructura química al agente ácido de sacarificación, por lo que se espera un incremento en la producción de azúcares reductores y totales en comparación con el olote de maíz lavado. Así mismo, el mayor contenido de azúcares reductores permitiría la producción de una mayor cantidad de etanol.

CAPÍTULO II. Metodología y diseño de experimento

II.1. Diagrama general



II.2. Reactivos y equipos

Reactivos

Ácido sulfúrico concentrado al 96.6% (J.T.Baker), glucosa (sigma-Aldrich), agua destilada, reactivo DNS al 1% (ácido 3,5-Dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich), hidróxido de Sodio (J.T.Baker), tartrato de sodio y potasio (J.T.Baker), fenol (Sigma-Aldrich), bisulfito de Sodio (Sigma-Aldrich), solución de furfural al 0.01 % (Aldrich), solución de hidroximetil furfural al 0.01% (Safco), etanol al 99.74%, peróxido de oxígeno al 7.5%, solución de hidróxido de sodio 2M (J.T.Baker), acetona 99.9 % (Alyt), extracto de levadura (Power Ultrapure), levadura liofilizada *S. cerevisiae* (Oviedo).

Equipo

- Termobalanza (OHAUS)
- Estufa de secado (Thermolyne Oren Series 9 000)
- Molino de bolas WEG
- Tamizador, modelo Rx-24
- Pipetas electrónicas de 5 mL y de 10 mL (Labsystems) y micropipetas 100 μ L y 1 000 μ L (eppendorf)
- Parrilla Corning Stirrer / Hot Plate
- Espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Spectronic, Helios α)
- Homogenizador Vortex (Fisher 6-560)
- Baño con agitación (Haake SW-B25)
- Balanza Triple Beam (OHAUS)
- Refractómetro ATAGO, modelo PAL-1
- Esterilizadora (Yamato SE510)

- Horno de convección (Felisa s/m)
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) (Hewlett Packard Serie 1100)
- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (HP 6890)
- Difractómetro de Rayos X (D8-Discover)
- Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ASEM)
- Autoclave (Parr 4870)
- Rotavapor (Buchi B-480)
- Microjeringa (Micro-mate interchangeable popper & sons, inc)
- Filtro de nylon para jeringas (syringe filters)
- Papel pH

II.3. Métodos

Determinación de humedad en el olote de maíz por el método de termobalanza

La humedad inicial en el olote de maíz facilita el desarrollo de los microorganismos además de dificultar la molienda, por lo que el material se sometió a secado en un horno y se determinó su contenido por medio de una termobalanza. El contenido de humedad en los tejidos vegetales se encuentra en mayor proporción en agua libre o absorbida, la cual puede ser removida con gran facilidad (Hart y col, 1991). La termobalanza se programó a una temperatura de secado de 100 °C para evaporar el agua de la muestra del olote de maíz por calentamiento de forma que va registrando la humedad y el peso hasta que la muestra mantiene un peso constante. Debido a que la muestra no se expone al ambiente, el error experimental se minimiza (Nollet, 2004).

Secado de olote de maíz

El agua es eliminada por calentamiento en la estufa de secado a 40°C durante 48 horas para minimizar la degradación térmica del material (Nollet, 2004). Se colocaron trozos de olote de maíz de 2 cm de largo aproximadamente en charolas de acero inoxidable de 40X25X5.

Molienda del olote de maíz

Como se mencionó con anterioridad se necesita exponer la superficie de la materia prima para favorecer una mejor hidrólisis del material, por lo que se sometió el olote a una molienda, la cual consiste en la fractura de los pedazos de olote de maíz del material por el impacto sucesivo de bolas o rodillos del molino (Figura 12). La reducción final es función directa de la velocidad y tiempo de este tratamiento mecánico y se ha reportado que el tamaño del material puede reducirse hasta 10 μ (Ferrer y Amigó, 2003). Debido a la fuerte estructura del olote, fue necesario realizar 13 ciclos de molienda y al final se determinó la eficiencia de molienda.

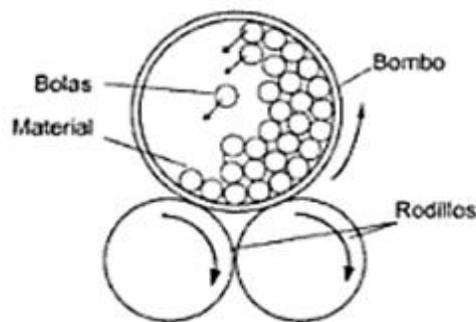


Figura 12. Esquema molino de bolas (Seoáñez, 2002).

Tamizado de la harina de olote de maíz

El tamizador realiza una operación mecánica de manera que separa los sólidos del olote de maíz molido en diferentes fracciones en función de su tamaño, por el paso a través de varias mallas durante 10 minutos. Cada tamiz está constituido por una red metálica con poros de un tamaño determinado que retienen las partículas de dimensiones superiores (20-40) dejando pasar las menores (50-80) (Seoáñez, 2002). Posteriormente del tamizado, se pesaron las fracciones retenidas de los tamices 20 a 40 y de 50 a 80 y se determinó el % de retención en cada una de ellas, así como el rendimiento de molienda del olote de maíz.

Lavado de harina de olote de maíz

Se colocaron 25 g de harina de olote de maíz retenida en los tamices de 50 a 80 (por ser los polvos más finos) en un vaso de precipitado y se lavó con 250 mL de agua destilada. Los sólidos resultantes del lavado se obtuvieron por filtración al vacío y se secaron en una estufa a 80 °C hasta peso constante. Esta muestra servirá de comparación con los sólidos obtenidos después de cada pretratamiento para comprobar la eficacia de cada uno. Se calcula el porcentaje de sólidos retenidos con filtración al vacío, con el fin de conocer por diferencia la cantidad de muestra que se solubiliza en el lavado. La pérdida de peso registrada en el lavado se debe a la solubilización de los componentes de la HOM tales como oligosacáridos, monosacáridos y otros extractivos solubles (Chen y col, 2009). Se analizó la morfología del sólido por Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ASEM) y se identificaron la zona amorfa y cristalina mediante Difracción de rayos X (XRD, véase más adelante).

Por otro lado, se determinó la concentración de Azúcares Totales (AT) por el método fenol-sulfúrico y Azúcares Reductores (AR) por el método DNS por duplicado en el agua resultante del lavado (líquido 3). A partir de éstos resultados se determinó el grado de polimerización (GP) por medio de la fórmula:

$$GP = AT \text{ (gramos azúcares totales)} / AR \text{ (gramos azúcares reductores)} \dots\dots\dots (1)$$

Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental (ASEM)

La ASEM es una técnica que permite revelar la morfología de la superficie de muestras biológicas (Buseck y col, 1992) de forma que se obtiene una noción del tamaño de las fibras, de la porosidad y de algunos factores de los cuales depende la solubilidad de la celulosa (Ramos y col, 2005). El material se estudió a tres diferentes aumentos, 300, 1000 y 3000 X; pero se muestran únicamente las imágenes a 300 X por razones de fácil visualización.

Difracción de Rayos X

Las estructuras cristalinas difractan los rayos X de acuerdo a la ley de Bragg:

$$\Delta = PO + OR = 2d \text{ sen } \theta = n\lambda \dots\dots\dots(2)$$

Donde *d* es la distancia entre dos planos de difracción, *n* es el índice de difracción, θ es el ángulo incidente del haz y λ es la longitud de onda (Dunitz, 1979). Los diagramas de difracción de rayos X obtenidos dan la intensidad difractada (*I*) en función del ángulo de difracción (2θ). El equipo utilizado es del tipo D8-Discover con una potencia de 40 kV y una longitud de onda de Cu $K\alpha_{1,2}$ de 1.5418. Los diagramas de difracción fueron obtenidos en un rango de ángulo (2θ) entre 4 a 80 grados en el laboratorio de Catálisis Combinatoria del IMP. El diagrama de difracción de rayos X como el de la Figura 13, nos proporciona información sobre el estado cristalino y amorfo de un sólido y por lo que se puede determinar el grado de cristalinidad (*I_c*) de cada una de las muestras (Wallace, 2004). El índice de cristalinidad de los materiales lignocelulósicos se obtiene mediante la siguiente formula (Ramos y col, 2005):

$$I_c = 1 - (I_{\text{mín}} / I_{\text{máx}}) \dots\dots\dots (3)$$

Donde:

I_{min} : Es la intensidad de la zona amorfa a $2\theta = 18$ grados.

$I_{máx}$: Es la intensidad de la zona cristalina a $2\theta = 22$ grados.

De la ecuación se deduce que un material altamente cristalino tendrá un alto valor de la intensidad $I_{máx}$, y el valor de I_C tenderá a 1. Si el material es amorfo, el valor de I_{min} es mayor que $I_{máx}$, por lo que el valor de I_C será menor a 1 y tenderá a cero (Ramos y col, 2005).

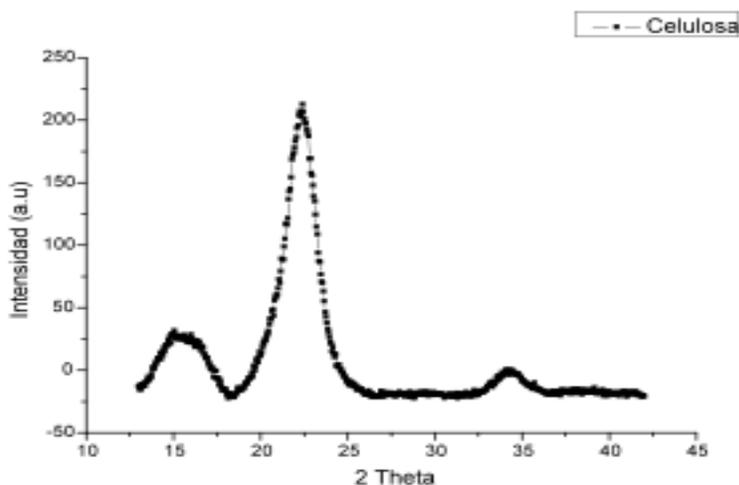


Figura 13. Diagrama de dispersión de Rayos X de la α-celulosa.

Determinación de Azúcares Totales por el método de Fenol-Sulfúrico

A 1 mL de jarabe neutralizado se le agrega 1 mL de una solución de fenol al 5% (v/v) y después 5 mL de ácido sulfúrico concentrado que libera calor. Los azúcares son sensibles a ácidos fuertes y a altas temperaturas, por lo que a estas condiciones ocurrirá la hidrólisis y deshidratación de los polisacáridos a derivados de furfural. Los

derivados de furfural se condensan con el fenol a compuestos complejos y coloridos que absorben luz a una longitud de onda de 490 nm (Figura 14; Nielsen, 2003). La reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo que es necesario realizar una curva patrón de glucosa en el intervalo de 10-100 $\mu\text{g}_{\text{glucosa}}/\text{mL}$ (Nielsen, 2003).

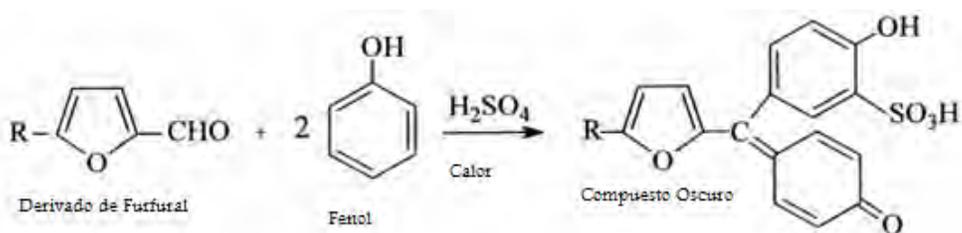


Figura 14. Esquema de la reacción entre derivados de furfural y fenol (Nielsen, 2003).

Determinación de azúcares reductores por el método de ácido dinitrosalicílico (DNS)

A 1 mL de jarabe neutralizado se le agrega 1 mL del reactivo de DNS y se calienta 5 min a 80 °C en baño maría. Lo anterior favorece la reacción de reducción del grupo nitro del DNS a un grupo amino (Figura 15) lo que ocasiona la aparición de un color rojo ladrillo. Se enfría el tubo de muestra y se agregan 8 mL de agua destilada. Posteriormente se lee la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS, utilizando un blanco de reactivos. Para determinar la concentración se elaboró una curva patrón de glucosa en el intervalo de 100-1000 $\mu\text{g}_{\text{glucosa}}/\text{mL}$ (Southgate, 1991).

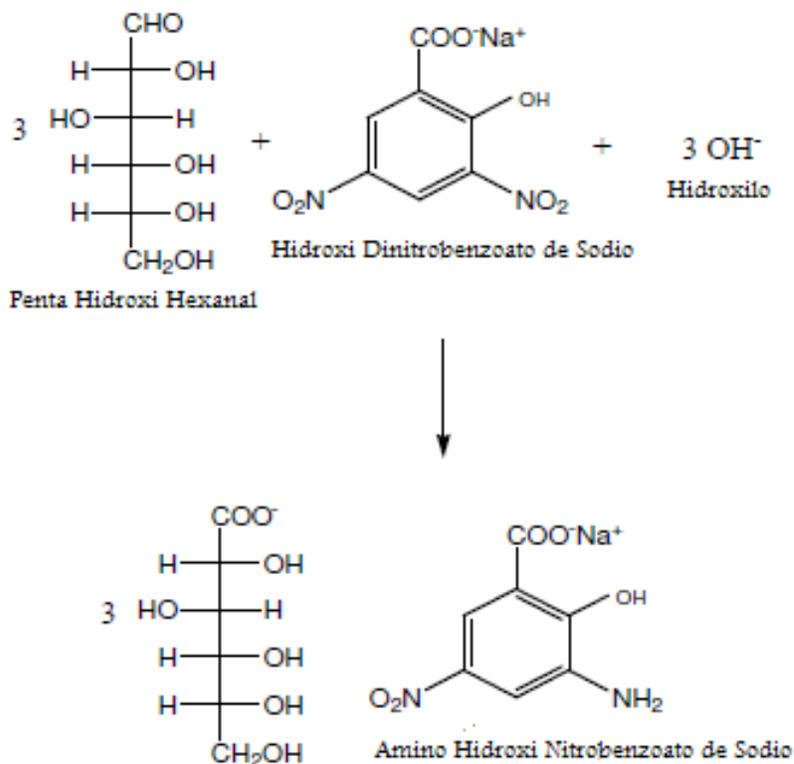


Figura 15. Esquema de la reacción de reducción del ácido 3,5-dinitro salicílico por un azúcar reductor (Nielsen, 2003).

Pretratamiento alcalino/peróxido

El pretratamiento alcalino/peróxido, al cual se sometió al olote de maíz (35% de celulosa y 22% de hemicelulosa) tomando en consideración las condiciones aplicadas sobre la cáscara de arroz (36 % de celulosa y 12% de hemicelulosa. Así, los sólidos del olote de maíz al 4.5, 10 y 15% (p/v) en un matraz Erlenmeyer se les agregó una solución de hidroperóxido al 7.5 % (v/v) como agente oxidante, ajustado a un valor de pH 11.5 con una solución de hidróxido de sodio 2 M. Los matraces Erlenmeyer con rosca de 250 mL se pusieron en un baño con agitación de 150 rpm a 35 °C durante 24 horas para facilitar la solubilización de la lignina (Saha y Cotta, 2007). El pH final de la solución fue de 14. Los sólidos residuales se filtraron al vacío y después se colocaron en una estufa de secado a 80 °C hasta peso constante.

Posteriormente se calculó el porcentaje de los sólidos retenidos y se analizó su morfología por Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ASEM) así como se determinó su patrón de difracción de rayos X y se calculó el índice de cristalinidad (I_c).

A los jarabes obtenidos de cada pretratamiento (líquido 1) se les determinó la concentración de Azúcares Totales (AT) por el método fenol-sulfúrico y Azúcares Reductores (AR) por el método DNS mediante espectrofotometría UV-VIS, por duplicado. A partir de éstos resultados se determinó el grado de polimerización (GP). La concentración de furfural (F) e hidroximetil furfural (HMF) se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) utilizando una columna SUPELCOSIL LC-18-DBC) de dimensiones 15 cm x 4.6 mm x 3 μ m, una fase móvil consistente de ACN/H₂O (1:1) con un flujo de 0.8 mL/min, y un detector de arreglo de diodos de UV-Vis a una longitud de onda de 254 nm y 30 °C. Se preparó una curva patrón de furfural y HMF en un intervalo de 0.001-0.01 % a partir de una solución madre de 0.01 % en ACN/H₂O (1:1).

Pretratamiento ácido diluido

Se pesaron 0.5 g de sólidos de la harina del olote de maíz y se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico al 72% en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se colocó en un baño con agitación a 30 °C durante una hora. Al término de éste tiempo, se agregaron 115 mL de agua destilada para diluir la concentración del ácido a 3%. Posteriormente, el matraz fue colocado en una autoclave a 121 °C durante una hora (Araque y col, 2008). Los sólidos residuales del pretratamiento se filtraron al vacío y después se colocan en una estufa de secado a una temperatura de 80 °C hasta peso constante. Se realizó su análisis por ASEM y difracción de Rayos X como se menciona anteriormente. Al jarabe (líquido 1) obtenido se le analizó el contenido de AT, AR, GP y derivados de furfural como se menciona anteriormente.

Pretratamiento organosolv

Las condiciones del pretratamiento se definieron conforme al método organosolv descrito para *Pinus radiata* (Araque y col, 2008). Así, se pesaron 2.7 g de la harina de maíz y se colocaron en un reactor Parr de 0.1L de capacidad. Se agregaron 19 mL de una mezcla acetona-agua (1:1) y ácido sulfúrico (0.9 % v/v). La relación de sólido y fase disolvente es 1:7 (p/p). El pretratamiento se realizó a 180 °C durante 45 min y se alcanzó una presión máxima de 250 psig (17 bar) y un pH final de 6. La recuperación de los sólidos residuales se efectuó mediante evaporación de la acetona en un rotavapor, filtración al vacío y secado a 80 °C hasta peso constante. Se realizó su análisis por ASEM y difracción de Rayos X como se menciona anteriormente. Al jarabe (líquido 1) obtenido se le analizó el contenido de AT, AR, GP y derivados de furfural como se menciona anteriormente.

Sacarificación de harina de olote de maíz

Se pesaron alrededor de 0.5 g en un matraz Erlenmeyer (250 mL) de los sólidos del lavado del olote de maíz y de cada uno de los pretratamientos, a excepción del pretratamiento alcalino/peróxido al 4.5 % (p/v) que fue de 0.26 g debido a su bajo rendimiento. Posteriormente, se agregaron 120 mL de ácido sulfúrico al 3 % (v/v) por cada 0.5 g de sólido y se sometió a una temperatura de 121 °C y 20 bar de presión en una autoclave. Los sólidos se analizaron por ASEM y difracción de Rayos X y al líquido 2 se analizó el contenido de AT, AR, GP, y derivados de furfural.

Obtención de etanol por fermentación de jarabes obtenidos

Los jarabes obtenidos a partir del lavado y de cada línea de pretratamiento y sacarificación (líquido 1+ líquido 2+ líquido 3) se mezclaron de forma a ajustar el contenido de AR alrededor de 3.3 a 3.7 g/L en un volumen constante de 100 mL (Tabla 4).

Volumen total 0.1 L						
Lavado						
	Volumen (L)	Volumen muestra (L)	AR (g)	AT (g)	AR (g/L)	AT (g/L)
Lavado	0.35	0.01	0.1768	0.2763	1.7675	2.7632
Pretratamiento	0	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Sacarificación	0.111	0.09	0.1557	0.1669	1.5566	1.6690
Totales			0.3324	0.4432	3.3241	4.4322
OH/peroxido 15% (p/v)						
	Volumen (L)	Volumen muestra (L)	AR (g)	AT (g)	AR (g/L)	AT (g/L)
Lavado	0.35	0.01	0.1768	0.2763	1.7675	2.7632
Pretratamiento	0.0452	0.01	0.0091	0.0276	0.0913	0.2759
Sacarificación	0.096	0.08	0.1799	0.1979	1.7987	1.9788
Totales			0.3658	0.5018	3.6575	5.0179
Acido						
	Volumen (L)	Volumen muestra (L)	AR (g)	AT (g)	AR (g/L)	AT (g/L)
Lavado	0.35	0.01	0.1768	0.2763	1.7675	2.7632
Pretratamiento-Sacarificación	225	0.09	0.1746	0.2346	1.7460	2.3460
Totales			0.3514	0.5109	3.5135	5.1092
Organosolv						
	Volumen (L)	Volumen muestra (L)	AR (g)	AT (g)	AR (g/L)	AT (g/L)
Lavado	0.35	0.02	0.3535	0.5526	3.5350	5.5265
Pretratamiento	0.06	0.01	0.0092	0.0183	0.0919	0.1830
Sacarificación	0.115	0.07	0.0100	0.0295	0.1000	0.2951
Totales			0.3627	0.5709	3.7269	6.0046

Tabla 4. Mezclas de jarabes provenientes del lavado, pretratamiento y sacarificación utilizados en la fermentación.

A cada mezcla de jarabes fue neutralizada con una solución de hidróxido de sodio 2 M y se le agregaron a cada matraz 0.5 g de carbón activado para eliminar los derivados de furfural presentes. Se determinó nuevamente la concentración de AT y AR para verificar su contenido. Para preparar el medio de cultivo se le agregó 1 g de extracto de levadura a las mezclas de jarabe y se sometió a esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Después se inoculó el medio con 1 mL de una levadura comercial que se encubó durante 24 h a 28 °C, cuya concentración fue de 36.21 g/L de biomasa húmeda.

Finalmente, la fermentación se llevó a cabo a 28 °C, 60 rpm por un periodo de 20 horas y al final del período de fermentación, cada mosto se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos para separar la biomasa producida. Se determinó el contenido de AT y AR residuales como ya se ha descrito anteriormente y el contenido de etanol se determinó por cromatografía de gases (CG) con un detector de ionización de flama (FID), utilizando una columna cromatográfica AT-WAX (30mm x 0.53 mm) y una rampa de temperatura de 50 a 120 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C. Se construyó una curva patrón de etanol en el rango de 1- 15% v/v a partir de una solución madre de etanol al 20% v/v en agua.

CAPÍTULO III. Resultados y Discusión

III.1. Obtención de la harina de olote de maíz

El olote de maíz se recolectó de los desperdicios de un puesto de maíz rebanado y elotes crudos del tianguis de la colonia Sagitario III, ubicada en Ecatepec, Estado de México.

La humedad del olote de maíz es de 70.6 % p/p y se encuentra en el intervalo de humedad de los tejidos vegetales que es de 60 a 95% (Hart y col, 1991).

Finalmente se obtuvo una harina con una recuperación de sólidos del 96.6 %, de la cual se obtuvo 577.6 g de las mallas 20-40 que representa el 84.7 % de la harina total y 104.5 g del molido más fino obtenido en las mallas 50-80 y que representa el 15.3% de la harina. Ésta última fracción la llamaremos: Harina de olote de maíz (HOM) y fue la que se utilizó durante todo el trabajo debido a que es de menor tamaño y posee mayor área superficial susceptible a ser pretratada y sacarificada con mayor eficiencia (Ramos y col, 2005).

De acuerdo a la micrografía (Figura 16 a) obtenida mediante ASEM de la HOM inicial se puede observar hendiduras de las fibras de la celulosa así como sólidos depositados en la superficie de las fibras y que podría tratarse de gránulos de almidón.

III.2. Lavado de la harina de olote de maíz

La micrografía de los sólidos retenidos de la HOM lavada, muestra fibras más pequeñas, con presencia de agujeros en superficie así como fibras huecas resultantes de la molienda y lixiviación de sólidos solubles (Figura 16 b). Se obtuvo

así mismo un valor de 74.52 % de sólidos retenidos o insolubles y una pérdida de peso de 18.63% que corresponde a la fracción obtenida en el agua de lavado.

III.3. Efecto del pretratamiento en la harina de olote de maíz

III.3.1. Efecto del pretratamiento en la morfología de la HOM por medio de microscopia electrónica de barrido ambiental (ASEM)

El pretratamiento alcalino/peróxido al 15 % (p/v) de la HOM se observa un efecto sobre la superficie del material de manera que se observan detalles nuevos no observados en la HOM inicial y lavado (Figura 16 a y 16 b, correspondiente). En la imagen se observan las fibras de celulosa con un mayor desgaste y exposición resultante del pretratamiento alcalino/peróxido que muestra varias capas apiladas (Figura 16 c). Los sólidos resultantes del mismo pretratamiento pero utilizando una relación de 4.5 y 10 % (p/v) no fueron observados por ASEM. En este pretratamiento se observó una pérdida de peso importante en el material tratado que correspondió a 60, 21.33 y 12.89 % en las condiciones de 4.5, 10 y 15 % (p/v), respectivamente. Es importante hacer notar que la pérdida de peso disminuye con el incremento de los sólidos en el pretratamiento, lo cual puede deberse a una menor capacidad de solubilización de la lignina y la hemicelulosa en la fase acuosa principalmente. A comparación lo reportado en el rastrojo de maíz sometido a un pretratamiento de álcalis, cuya pérdida de peso se evaluó en un 41.4 %, de lo cual corresponde a la eliminación de lignina principalmente (73.9 %), seguido de la hemicelulosa de 33.5 % y con una mínima eliminación de la celulosa de 2.8 %. Las diferencias de las condiciones de pretratamiento fueron las siguientes (Chen y col, 2009):

La concentración de sólidos utilizada fue de 0.125 %, solubilizada con hidróxido de sodio al 2% (v/v) a 120 °C durante 30 minutos, mientras que en nuestro proyecto, se utilizaron mayores concentraciones de sólidos de 4.5, 10 y 15% (p/v) y se solubilizó con una solución de hidroperóxido al 7.5 % (v/v) y la solución de hidróxido de sodio

2M fue para ajustar un pH alcalino, la temperatura utilizada fue menor (35 °C) y se mantuvo por más tiempo (14 horas).

El pretratamiento que más disolvió a las fibras de celulosa (sólo se aprecian fragmentos) es sin duda el pretratamiento ácido diluido (Figura 16 d). La solubilización de la HOM correspondió de 68% en donde se realiza no sólo el pretratamiento, sino también la sacarificación del material lignocelulósico. Que a comparación con lo reportado en el rastrojo de maíz sometido con un pretratamiento de ácido diluido, cuya pérdida de peso corresponde del 40.3 % (Chen y col, 2009), siendo la mayor parte de la hemicelulosa (76.6 %) que debido a su naturaleza amorfa se hidroliza primero (Ramos y col, 2005). En menores proporciones corresponde a la lignina del 12.2 % y celulosa del 4.5 % (Chen y col, 2009), esta última es de menor solubilidad debido a su alto grado de cristalinidad (Herrera y col, 2003). Siguiendo el artículo al cual después del pretratamiento ácido, todavía se sometió el rastrojo de maíz con hidrólisis enzimática, por lo que la pérdida de lignina corresponde de 39.4 %. Las variantes de dicho pretratamiento fueron las siguientes (Chen y col, 2009):

La masa de rastrojo de maíz utilizada fue de 20 g y el volumen de ácido sulfúrico fue de 200 mL al 1.5% y se mantiene a 106 °C por 6 horas. En cambio la masa y el volumen utilizado en nuestro estudio fue menor, corresponde a 0.5 g y 120 mL de ácido sulfúrico, cuya concentración fue mayor (al 3 %), de igual forma la temperatura fue mayor (120 °C) a un menor tiempo, de 1 hora.

Por otro lado, los sólidos de la HOM resultantes del pretratamiento organosol muestran fibras de celulosa ya desgastadas con sólidos adheridos en la superficie (Figura 16 e). Sin embargo, en nuestro caso el efecto fue menor en comparación con el pretratamiento alcalino/peróxido (véase Figura 16 c). La solubilización de sólidos en este caso correspondió del 49.52 %, siendo sólo menor al pretratamiento alcalino/peróxido 4.5 % (p/v) y al ácido diluido.

En general, recordemos que el objetivo principal de los pretratamientos es incrementar el área superficial del material lignocelulósico, disolver y degradar la lignina así como solubilizar una fracción de hemicelulosa presente (Gray, 2007).

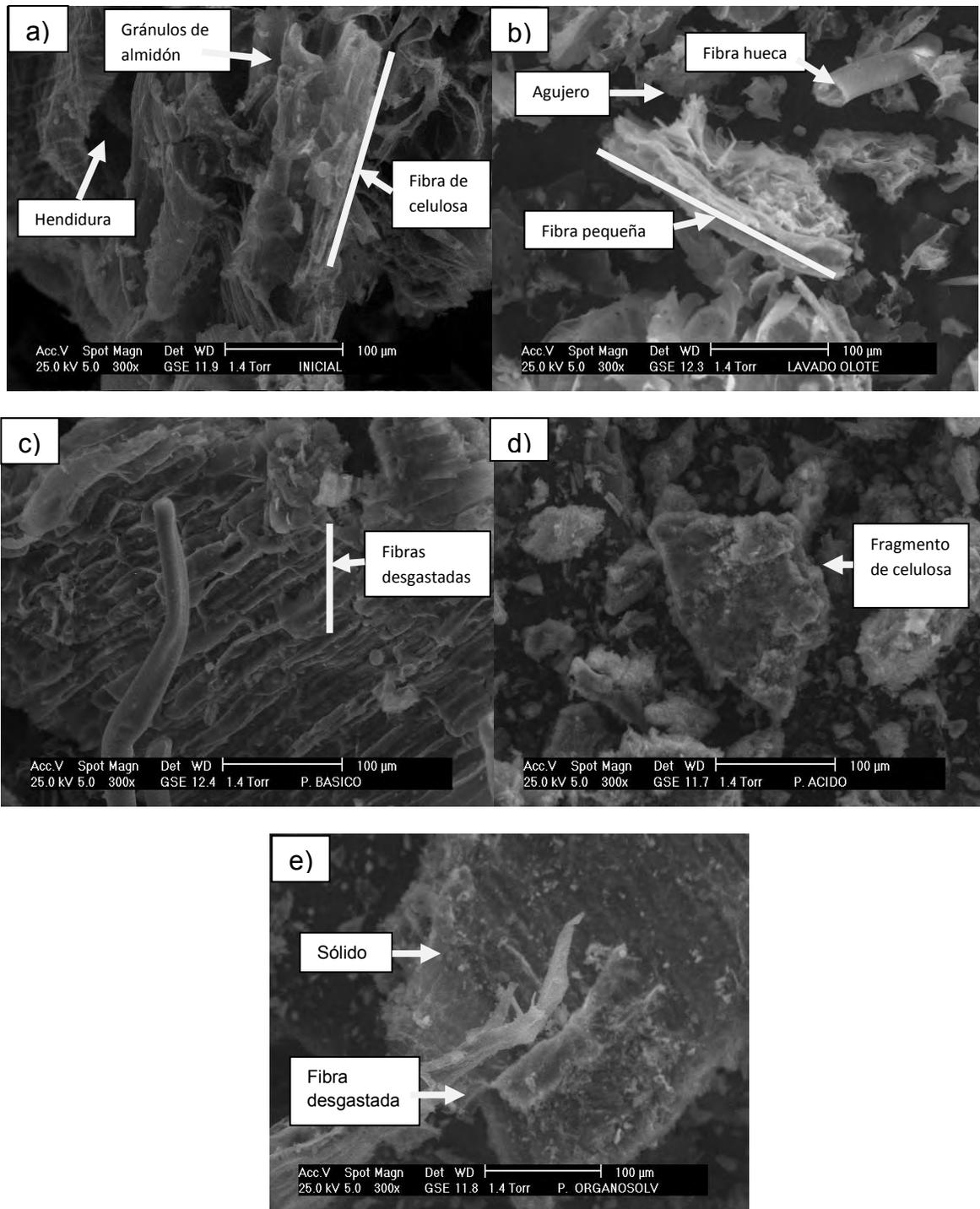


Figura 16. Micrografía de los sólidos de la HOM resultantes de: a) Inicial, b) Lavado, Pretratamiento: c) Alcalino/peróxido al 15% (p/v), d) Organosolv y e) Ácido diluido.

III.3.2. Efecto del pretratamiento de los sólidos de la HOM sobre la cristalinidad de la celulosa por medio de Difracción de Rayos X

Primeramente, cabe explicar que tanto en la Figura 17 como en la 18 no se encuentran los resultados del pretratamiento alcalino/peróxido al 4.5% (p/v) debido a que el sólido de la HOM obtenido fue poco (0.27 g) y este se utilizó para sacarificación.

El lavado de la HOM resulta en un diagrama de dispersión muy parecido al diagrama del HOM inicial y con la particularidad de mostrar un incremento de la señal en la región amorfa (Figura 17). Esto causa un decremento importante del valor del índice de cristalinidad (I_C) como se observa en la Figura 18. Una forma de conocer mejor el grado de cristalinidad de la celulosa de los sólidos de la HOM inicial, lavado y pretratados es mediante el I_C , ya que toma en cuenta el balance de la zona cristalina y amorfa de los datos de XRD (Mosier y col, 2005). El valor del índice varía entre 0 y 1 y corresponde a un material altamente amorfo y cristalino, respectivamente.

En el caso de la HOM sujeto a diferentes pretratamientos, el XRD muestra diferentes efectos sobre la estructura del material lignocelulósico. En el caso del pretratamiento alcalino/peróxido al 10 y 15% (p/v), los diagramas de XRD son muy parecidos entre sí y muestran un incremento de la región amorfa como en el caso del sólido lavado y que puede ser atribuido a la exposición de las hemicelulosas y las ligninas que no fueron solubilizadas en la fase líquida y que permanecieron en el sólido obtenido. El valor del I_C disminuyó con el contenido de sólidos en el pretratamiento, por lo que infiere que los polímeros extraídos de la HOM no solubilizados en la fase líquida, contribuyen a la disminución de la cristalinidad del material.

Mientras que, el diagrama de XRD de los sólidos pretratados con ácido diluido muestra una disminución de la señal a 22 grados y que puede asociarse a un cambio considerable de la zona cristalina de la celulosa. El valor de I_C de ácido diluido, mayor a los pretratamientos básico/peróxido y organosolv, sugiere un mayor balance entre las fases amorfas y cristalinas de la HOM pretratada. Por último, el diagrama de XRD de los sólidos pretratados con organosolv muestra una

disminución importante de la región cristalina pero con el menor valor de I_C obtenido en los otros pretratamientos. Aquí, la permanencia de polímeros amorfos extraídos del material puede ser la razón de la menor cristalinidad del material pretratado.

Así, el valor de I_C de los sólidos de la HOM inicial es mucho mayor a la del lavado, seguido del ácido diluido, de alcalino/peróxido al 10 %, al 15 % (p/v) y por último organosolv. Es de esperarse que la sacarificación sea más eficiente en materiales con menor valor de I_C , por lo que el pretratamiento organosolv y alcalino/peróxido deberían mostrar un mejor rendimiento de azúcares por gramo de biomasa tratada.

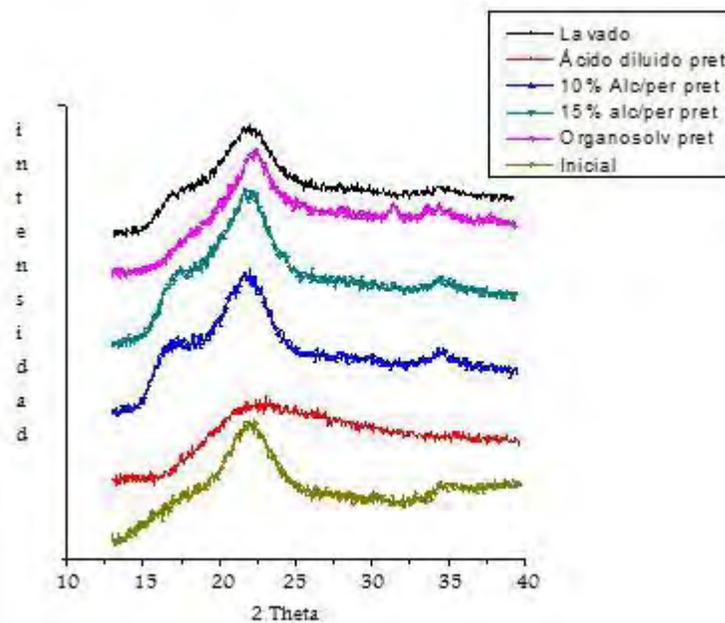


Figura 17. Diagrama de dispersión de Rayos X de los sólidos de la HOM inicial, lavado y sujetos a diferentes pretratamiento.

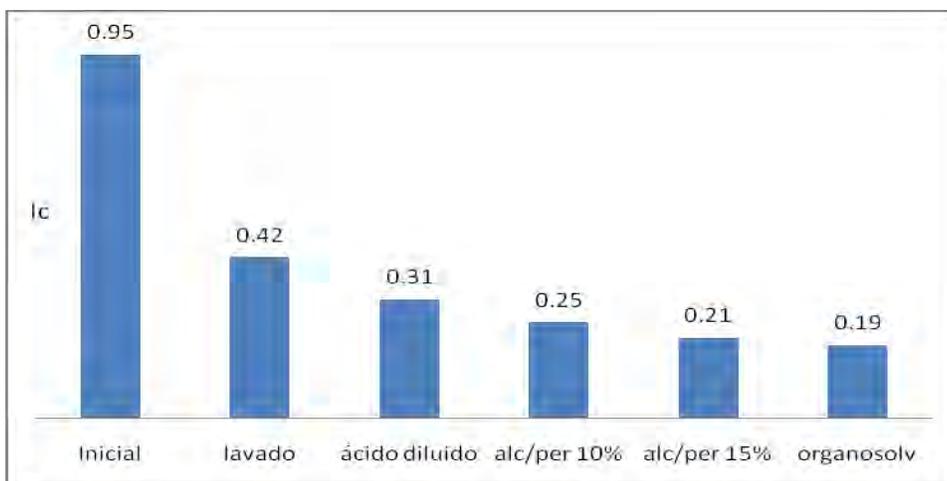


Figura 18. Índice de cristalinidad (I_c) de los sólidos de la HOM resultantes del lavado y pretratamientos aplicados.

III.3.3. Efecto del pretratamiento de la HOM en la generación de azúcares reductores (AR) y azúcares totales (AT)

La Figura 19 presenta la masa de azúcares reductores y totales por gramo de biomasa de los jarabes obtenidos en los diferentes pretratamientos (líquido 1) y en el lavado de la HOM (líquido 3). Se observa que el jarabe proveniente del lavado presenta un contenido importante de ambos tipos de azúcares contenidos originalmente en el olote de maíz y que son lixiviados durante el lavado.

De la misma forma, el jarabe proveniente del pretratamiento ácido diluido presenta un alto contenido de azúcares por condiciones de hidrólisis (Herrera y col, 2003). Sus sólidos totales del jarabe corresponden a un valor de 3.6 °Bx y un pH final de 0. Aquí podemos tener la hidrólisis del grupo acetilo de la hemicelulosa o la formación de ácido levulínico o ácido fórmico (Herrera y col, 2003).

Sin embargo, los otros pretratamientos no solubilizan de manera importante a polisacáridos y monosacáridos debido a que están orientados a la solubilización y

degradación de la lignina. En el caso del pretratamiento básico/peróxido se observa una disminución del contenido de AT en los jarabes con el incremento de la cantidad de biomasa utilizada, por lo que se comprueba la menor capacidad de solubilización de polisacáridos por la fase líquida. Es de notar que el contenido de AR se incrementó ligeramente con el incremento de sólidos en el pretratamiento básico/peróxido (0.003, 0.36, 0.91 g AR/L correspondiente). También se determinó la concentración de los sólidos totales de los jarabes provenientes de los pretratamientos alcalino/peróxido al 4.5, 10 y 15 % (p/v), los cuales corresponden: 1.2, 1.4 y 1.3 °Bx, respectivamente. Se registró asimismo un aumento de pH de los jarabes de 11.5 a 14 y que se atribuye al aumento de la concentración de especies básicas generadas por la degradación de la lignina (Hendriks y Zeeman, 2009) y saponificación de enlaces ésteres (grupos acetato y ferulato) presentes en la hemicelulosa por el medio básico/peróxido (Gray, 2007).

Por último, el pretratamiento por organosolv de la HOM fue el que presentó la menor cantidad de AR y AT generados en el líquido resultante (Figura 19), aquí, el contenido de sólidos solubles del jarabe del pretratamiento de organosolv fue de 2.8 °Bx y un pH de 6, por lo que el incremento del pH puede deberse a la generación de grupos acetatos provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa que tampona a la fracción líquida (Herrera y col, 2004).

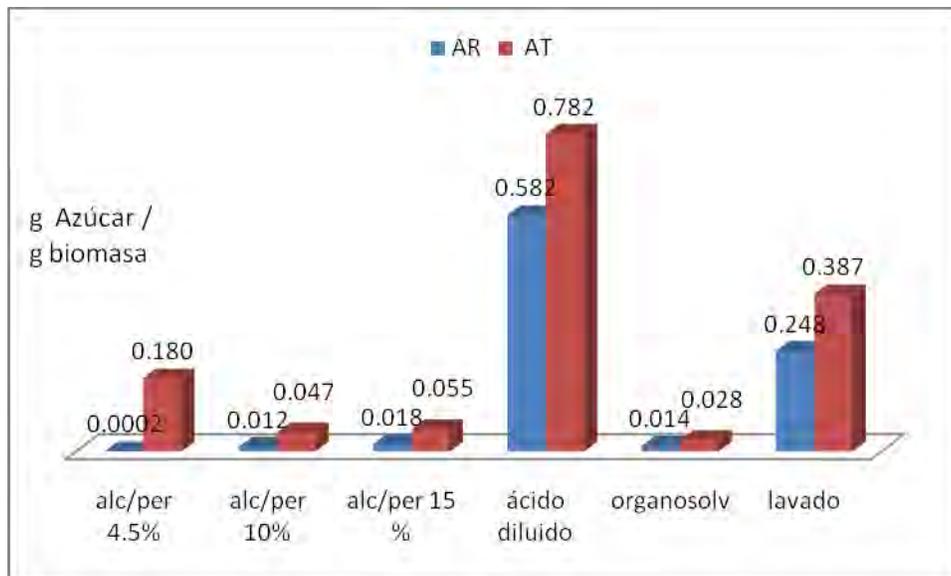


Figura 19. Relación de azúcares totales (AT) y reductores (AR) generados en el lavado y diferentes pretratamientos de la HOM.

III.3.4. Efecto del pretratamiento en el grado de polimerización (GP) de los jarabes obtenidos

El objetivo de determinar el grado de polimerización de los polisacáridos presentes en los distintos jarabes es el de evaluar el número promedio de unidades de monosacáridos existentes en los diversos glicanos extraídos (Figura 20; Ramos y col, 2005). Se espera que el valor del GP de los glicanos disminuya en los jarabes pretratados en comparación con el jarabe del lavado. Recordemos que la biomasa de HOM fue lavada previamente con agua para extraer glicanos y monosacáridos solubles, de manera que éstos carbohidratos no fueran degradados durante el pretratamiento químico. Una buena eficiencia del pretratamiento químico debe aumentar la accesibilidad de los glicanos a la sacarificación y permitir obtener un GP cercano a uno, es decir, a la generación de azúcares reductores que puedan ser fermentados posteriormente a etanol (Hendriks y Zeeman, 2008). Se observa el

decremento del GP con el aumento de la cantidad de sólidos en el pretratamiento básico/peróxido y que confirma la menor solubilización de glicanos en la fase líquida como se ha mencionado anteriormente, sin embargo, el valor del GP fue mayor en éste pretratamiento en comparación con el jarabe proveniente del lavado, organosolv y ácido diluido. En éste último caso, la hidrólisis de los glicanos permitió obtener un azúcar reductor por cada cuatro unidades de glicano ($1.34 \times 3 = 4.0$) lo que evidencia la eficiencia tanto pretratamiento como de sacarificación simultánea del método de ácido diluido (Herrera y col, 2003).

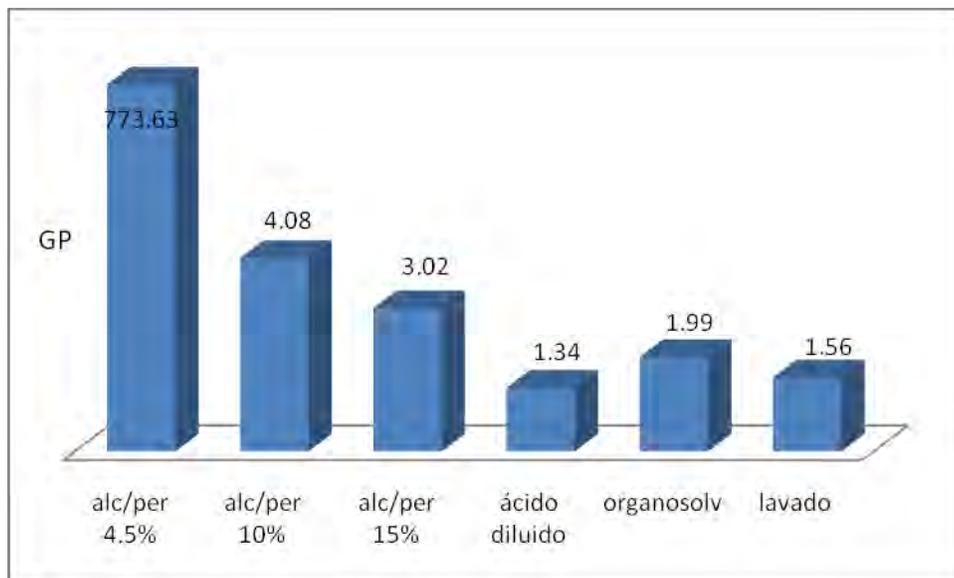


Figura 20. Relación del grado de polimerización (GP) de los jarabes obtenidos del lavado y distintos pretratamientos químicos de la HOM.

III.3.5. Efecto del pretratamiento en la formación de furfural (F) e hidroxi-metil-furfural (HMF) presentes en los jarabes provenientes del pretratamiento

La identificación y cuantificación de derivados de furfural en los jarabes provenientes del pretratamiento es importante ya que inhiben de manera importante la actividad fermentativa de las levaduras y se disminuye en consecuencia la producción de etanol (Gray, 2007). Estos compuestos, entre otros, se generan mediante la deshidratación de monosacáridos en condiciones ácidas, a altas temperaturas y contribuyen a la generación de color en los jarabes (Binder y Raines, 2009). En nuestro caso, no se detectaron éstos compuestos en ningún jarabe de pretratamiento por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), ya que los espectros de UV-Vis obtenidos no coincidían con los de los estándares. Sin embargo, sí se detectaron algunas señales de compuestos que no fueron identificados que pueden provenir de una deshidratación más extensa de los monosacáridos o bien compuestos fenólicos de la degradación de la lignina (Aranque y col, 2008).

IV.1. Efecto de la sacarificación sobre la harina de olote de maíz

IV.1.1. Efecto de la sacarificación en la morfología de la HOM por medio de microscopia electrónica de barrido ambiental (ASEM)

La sacarificación ácida de los sólidos lavados de la HOM muestran una degradación intensa del material que permite que el 66.44 % de la masa inicial se solubilice en la fase líquida con 33.55% de retención de sólidos insolubles (Figura 21 a). La sacarificación ácida hidroliza a la hemicelulosa y celulosa presente en el material lignocelulósico (Mosier y col, 2005).

En el caso de los sólidos sacarificados del pretratamiento alcalino/peróxido al 15 % (p/v; Figura 21 b), se observa un aumento notable de la porosidad de las fibras de la

celulosa, con apariencia de “panal de abejas” y una superficie más rugosa por el efecto de la hidrólisis ácida (Ramos y col, 2005); en comparación con el material únicamente pretratado en el cual se observan las celdas celulares con material (Figura 16 c). El porcentaje de sólidos retenidos es del 39.79 % y la cantidad de materia lignocelulósica solubilizada es de 60.21%. De acuerdo con lo reportado en la literatura, el pretratamiento de álcalis (condiciones especificadas en la página 47) mediante hidrólisis enzimática con celulosas y celobiasas se obtiene una pérdida de lignina hasta del 81.2 % (Chen y col, 2009).

Por otro lado, los sólidos sacarificados en el pretratamiento organosolv conducen a una reducción importante del tamaño de las fibras de la HOM así como un incremento de la rugosidad de la superficie (Figura 21 c). En este caso, se obtuvo el 66.52 % de los sólidos retenidos, el resultado difiere un poco con lo reportado en *Pinus radiata* a las mismas condiciones de pretratamiento en este trabajo, que corresponde de 46.3 %, una parte de esta pérdida de peso, se debe principalmente a la solubilización de la lignina (34.2 %) y una mejor exposición de las fibras de celulosa (Aranque y col, 2008).

Así podemos observar que la sacarificación de sólidos pretratados de la HOM provoca diferencias a nivel morfológico que podría permitir el aumento de la accesibilidad del catalizador ácido al material con la subsecuente producción de azúcares de menor tamaño.

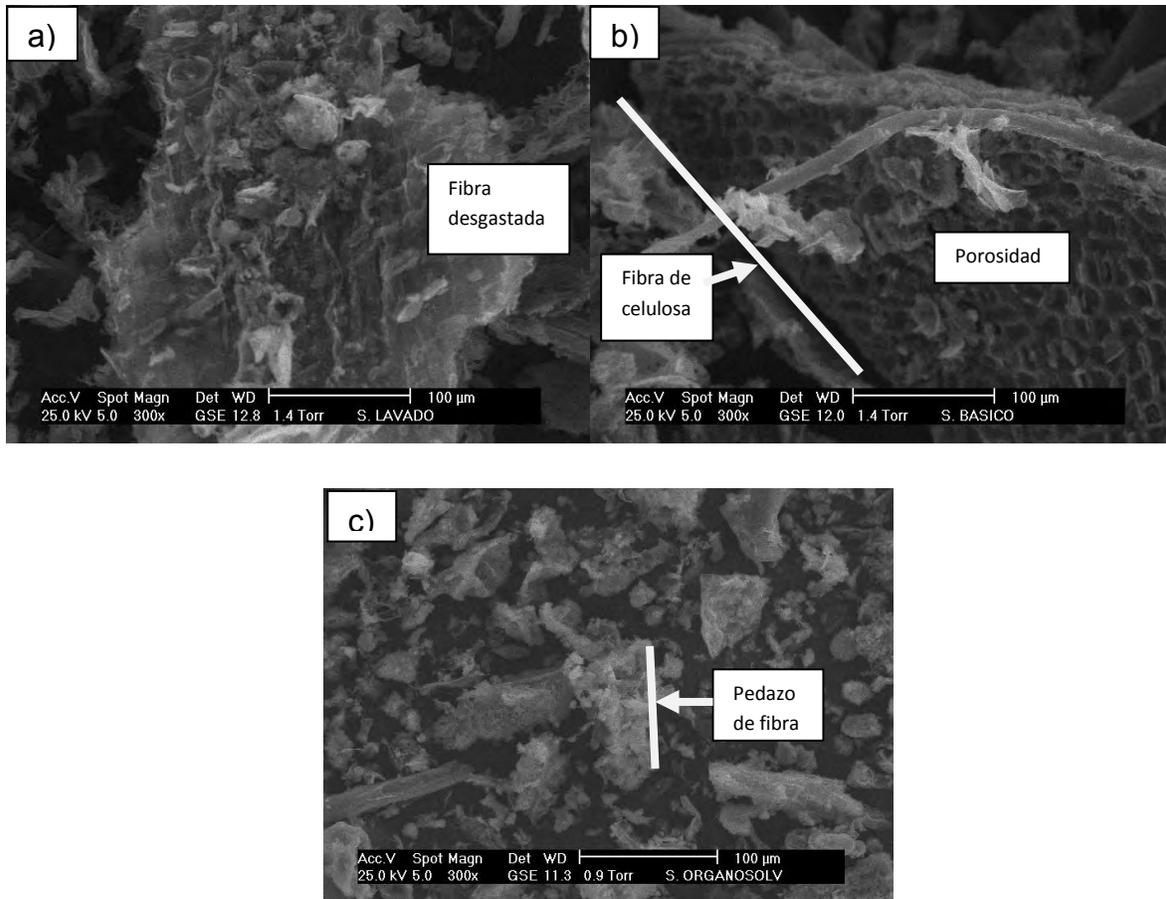


Figura 21. Micrográficas de los sólidos sacarificados de: a) Lavado, pretratamientos: b) Alcalino/peróxido al 15 % (p/v) y c) Organosolv.

IV.1.2. Efecto de la sacarificación sobre la cristalinidad de la HOM por Difracción de Rayos X

La hidrólisis ácida de los sólidos de la HOM pretratados tiene un efecto significativo sobre la estructura de las regiones amorfas y cristalinas, observándose una disminución importante de la cristalinidad del material por la reducción de la señal a 22 grados (Figura 22). La sacarificación del sólido lavado de la HOM tiene un menor efecto sobre la cristalinidad del material como se observa por la mayor intensidad de la señal a 22 grados y el aumento del valor del I_C . En efecto, dicho valor aumentó de

0.42 a 0.77 (Figura 23), lo que indica que el proceso de sacarificación tuvo mayor efecto sobre las regiones del material celulósico, de tal manera que la región cristalina sufrió un menor ataque (Ramos y col, 2005).

En el caso de los sólidos sacarificados provenientes del pretratamiento alcalino/peróxido, se observa que la región cristalina ($2\theta = 22^\circ$) del material disminuye con la cantidad de sólidos utilizados y se confirma con su valor de I_C (Figura 23). Este comportamiento también se observa en la HOM después del pretratamiento alcalino/peróxido, pero disminuye aun más el valor de I_C con la sacarificación (véase la Figura 17 y 18). Esto puede atribuirse a la mayor presencia de polisacáridos de menor peso molecular que no fueron solubilizados en el pretratamiento con mayor cantidad de sólidos y que efectivamente fueron hidrolizados en la sacarificación.

Por último, la sacarificación de sólidos de la HOM pretratados por organosolv muestran el menor valor de I_C , al disminuir de 0.19 a 0.11 en el pretratamiento a la sacarificación, respectivamente. Así, la sacarificación de sólidos de la HOM sujetos a algún pretratamiento resulta en la disminución del I_C del material.

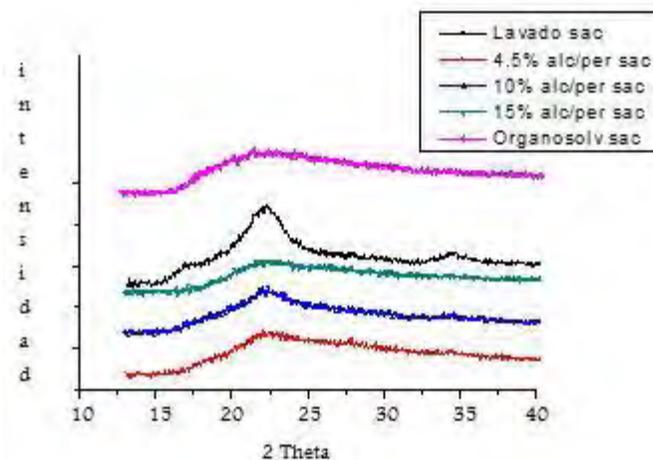


Figura 22. Diagrama de dispersión de Rayos X de los sólidos sacarificados de la HOM del lavado y los pretratados.

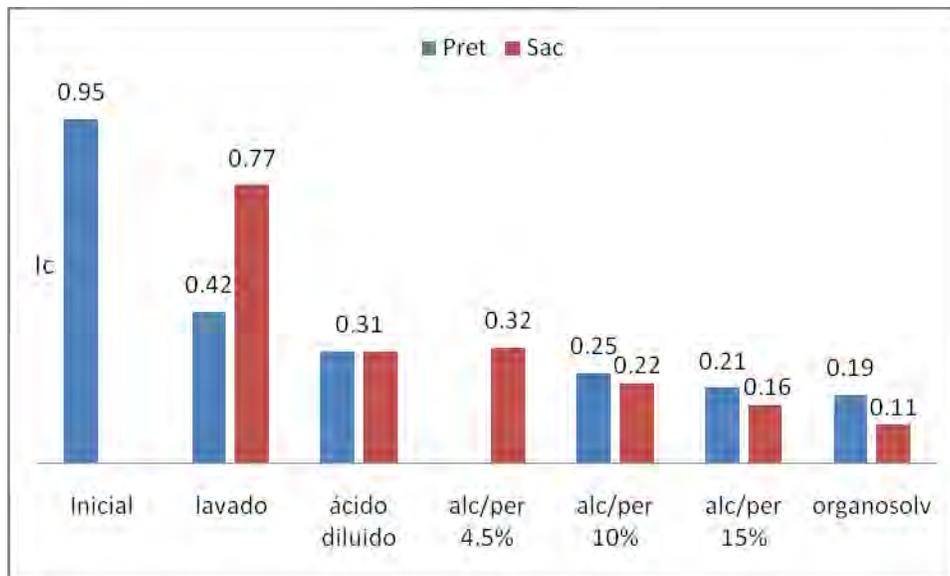


Figura 23. Índice de cristalinidad (I_c) de los sólidos de la HOM del lavado, pretratamientos y sacarificación.

IV.1.3. Efecto de la sacarificación de sólidos de la HOM pretratados en la generación de azúcares reductores (AR) y azúcares totales (AT)

La sacarificación de los sólidos de la HOM sujetos a diferentes pretratamientos permitió generar tanto azúcares reductores (AR) como totales (AT) en los jarabes obtenidos (Líquido 2; Figura 24) y en mayor cantidad en comparación con los jarabes obtenidos en el pretratamiento (Líquido 1; Figura 19). Esto es esperado ya que el objetivo de la sacarificación es convertir a los polisacáridos en azúcares fermentables para un mejor rendimiento en la obtención de etanol (Mosier y col, 2005).

Por ejemplo, la sacarificación de los sólidos de la HOM sujetos al pretratamiento básico/peróxido al 4.5, 10 y 15% (p/v), se obtuvieron: 2.24, 2.27 y 2.25 g AR/L, con sólidos totales solubles de 6.6, 4.6 y 5.1 °Bx, correspondiente. Que a comparación con lo reportado a partir del rastrojo de maíz, pero con hidrólisis enzimática de

celulasas y celobiasas, cuyas condiciones de pretratamiento de álcalis ya se mencionó en la página 47, se obtuvo una mayor cantidad de azúcares (64.1 g AR/L). Sin embargo si se compara con lo evaluado a partir de cascara de arroz al 15 % concentración de sólidos, sometido a las mismas condiciones de pretratamiento que en nuestro trabajo, seguido de hidrólisis enzimática con la combinación de celulasas, β -glucosidasas y xylanases, se reporta una obtención de 0.249 g AT/ g biomasa (Saha y Cotta, 2007), lo cual es casi la mitad de lo obtenido a la partir de HOM (0.472 g AT/g biomasa).

De igual forma el pretratamiento ácido diluido de 3.6 °Bx permitió generar una mayor cantidad de azúcares en comparación con los sólidos que sólo fueron lavados (4.5 °Bx). Que a comparación con lo reportado en el rastrojo de maíz, sometido al mismo pretratamiento, pero con diferentes condiciones, ya antes mencionadas en la página 48, seguida de una hidrólisis enzimática de celulasas y celobiasas, se obtuvo una mayor concentración de AR correspondiente del 24.6 g/ L (Chen y col, 2009).

A excepción de los azúcares obtenidos en la sacarificación de sólidos pretratados con organosolv de 4.1 °Bx (Figura 24), ya que es el pretratamiento donde se obtienen menor cantidad de azúcares (0.036 g AR/ g biomasa) a comparación del lavado a partir de la HOM. Dicho resultado es superior a un estudio reportado a partir de la remolacha de la caña de azúcar con hidrólisis enzimática de celulosas y β -glucosidasa correspondiente de 0.34 g glucosa/100g biomasa. Las variables fueron las siguientes (Mesa y col, 2010):

La masa utilizada fue de 500 g en una solución de etanol al 50% (v/v) con una relación de solido-liquido de 1:5. El catalizador ocupado fue ácido sulfúrico al 1.25 % (v/v). La temperatura se mantuvo constante a 175 °C, durante 60 minutos. Mientras que en nuestro estudio ocupamos olote de maíz y una menor masa (1.7 g) solubilizada en una solución de acetona-agua (1:1), con una relación más diluida de concentración de sólidos de 1:7, ocupando ácido sulfúrico más diluido (0.9 %), en cuanto a la temperatura no hay variación considerable, siendo la mitad del tiempo en este caso.

Por lo que el jarabe resultante del pretratamiento ácido diluido se constituyó como el método que mayor producción de azúcares fermentables genera como ha sido indicado en la literatura (Zhang y col, 2009).

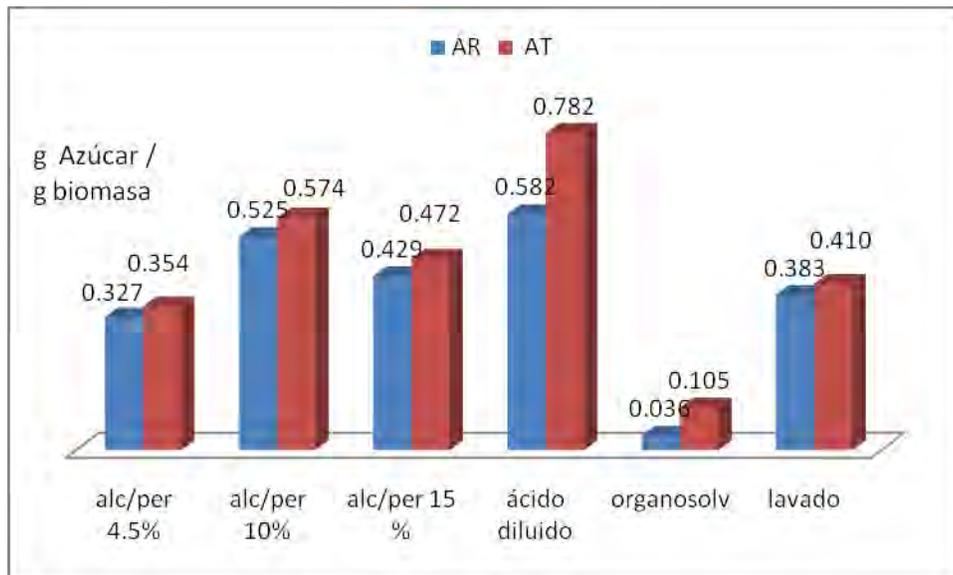


Figura 24. Azúcares reductores (AR) y totales (AT) generados en la sacarificación de sólidos de la HOM con diferentes pretratamientos.

La sacarificación de los sólidos pretratados genera azúcares reductores y totales, por lo que la relación $GP = AT/AR$ nos permite evaluar el grado de polimerización promedio de los polisacáridos presentes en cada jarabe de sacarificación y evaluar la eficiencia de la hidrólisis de los polisacáridos, de manera que se obtenga un valor de GP cercano a uno, es decir, de una unidad de azúcar reductor susceptible de ser fermentado a etanol (Gray, 2007). En general, el pretratamiento de los sólidos de la HOM genera azúcares con un mayor valor de GP en comparación con los jarabes de sacarificación (Figura 25). Así, la sacarificación permite efectivamente reducir el GP de los azúcares presentes en el jarabe, en el caso del pretratamiento ácido diluido

su GP es el mismo que a comparación del GP del lavado, éste disminuye con la sacarificación, mientras que la mayor reducción del GP se observa en los jarabes obtenidos de la sacarificación de los sólidos pretratados con alcalino/peróxido. En cambio, el valor del GP del jarabe sacarificado proveniente del pretratamiento organosolv aumenta y se convierte en el GP más alto obtenido en la sacarificación, por lo que la hidrólisis ácida de dicho pretratamiento en la HOM es menos eficaz en comparación con los pretratamientos de ácido diluido y alcalino/peróxido.

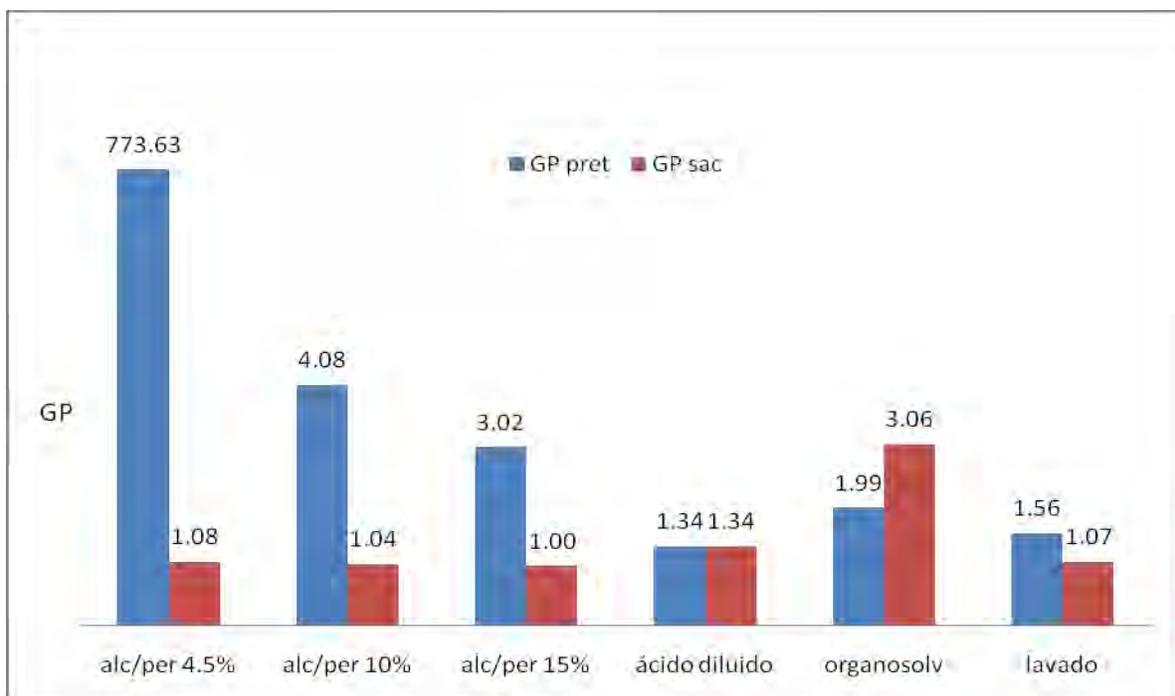


Figura 25. Grado de polimerización (GP) de los polisacáridos generados en diversos pretratamientos y sacarificación de la HOM.

IV.1.4. Efecto de la sacarificación en la formación de compuestos de inhibición como furfural (F) e hidroximetilfurfural (HMF) en los jarabes

Debido a que ni el jarabe del lavado ni en los jarabes pretratados se encontró furfural ni hidroximetilfurfural, no se esperaba tampoco encontrar éstos compuestos en la etapa de sacarificación. Se ha reportado que las condiciones de esterilización por calor húmedo en la autoclave o bien con el tratamiento en agua caliente (LHW) no permiten su generación (Hendriks y Zeeman, 2009). En efecto, el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) no mostró la presencia de compuestos de furfural y HMF en los jarabes sacarificados provenientes del lavado y pretratamientos de los sólidos de la HOM. Sin embargo, se detectaron señales de baja intensidad que podrían deberse a la presencia de compuestos de degradación de la lignina, es decir, compuestos fenólicos (Araque y col, 2008).

Si lo comparamos con un estudio reportado en el rastrojo de maíz, solamente se encontró furfural en el pretratamiento ácido diluido, correspondiente al 0.01 g/L, además de encontrarse ácido acético de 0.35 g/L y en el caso del pretratamiento alcalino, solo se registró ácido acético de 0.19 g/L, cuyas condiciones en ambos pretratamientos ya se mencionaron en las páginas 47 y 48 (Chen y col, 2009).

En el caso del pretratamiento organosolv en el *Pinus radiata*, se encontró lignina del 53.2 %, seguido de furfural del 0.05 g/L y el HMF de 0.02 g/L, cuyas condiciones fueron las mismas que las utilizadas en este trabajo (Araque y col, 2008).

V.1. Fermentación de los jarabes

Esta etapa es el punto crítico del experimento para evaluar el efecto del pretratamiento en la producción de etanol por medio de levaduras (Monsier y col, 2004). Ya que no se encuentran compuestos como el furfural e hidroximetil furfural en los jarabes a fermentar, se considera que la inhibición de las levaduras será mínima (Gray, 2007).

Primero se realizó la mezcla de jarabes del lavado, pretratamiento y sacarificación de manera a tener un solo jarabe por tipo de pretratamiento que se fermentará a etanol utilizando una cepa panadera de *S. cerevisiae*. La mezcla de jarabes se efectuó de tal manera que el contenido de AR fueran casi de la misma concentración, por lo que se obtuvieron jarabes de alrededor de 2.5 g AR/L (Figura 26).

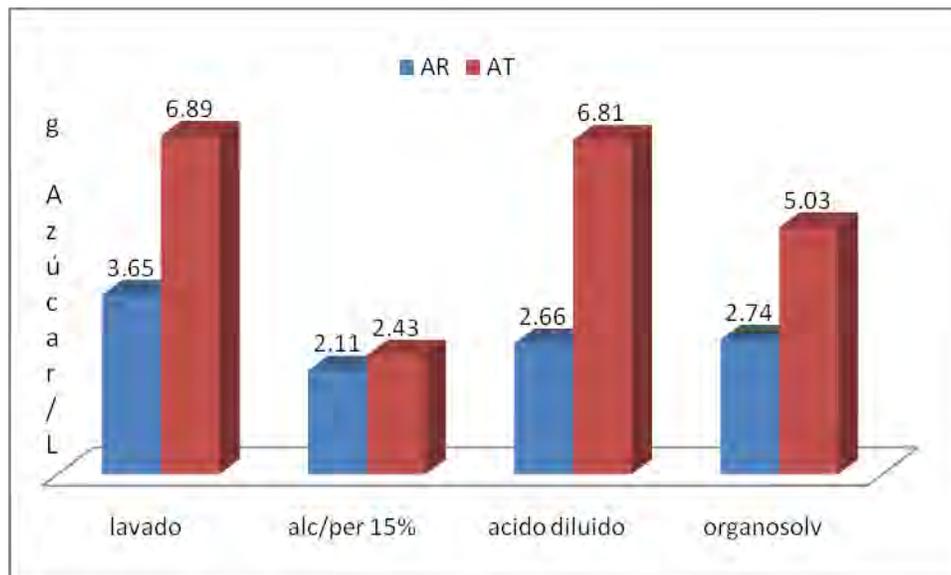


Figura 26. Contenido de azúcares reductores (AR) y totales (AT) en la mezcla de jarabes antes de la fermentación.

Debido a que no se encontraron productos inhibidores de la fermentación como furfural y HMF en cada una de la mezcla de jarabes, se espera que las levaduras asimilen los AR presentes y produzcan etanol (Gray, 2007). Se observa que la levadura comercial utilizada no llegó a consumir todos los azúcares y que puede deberse a que el tiempo de fermentación no fue el suficiente, o bien, que había azúcares presentes que la levadura no es capaz de fermentar como las pentosas

(xilosa y arabinosa) provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa (Figura 27; Mosier y col, 2005). Es posible además que otros parámetros de la fermentación como pH, temperatura, medio de cultivo y fuente de nitrógeno, tamaño del inóculo no fueran los óptimos. Por ejemplo, en caso del extracto de algarrobo se determinó un pH óptimo de 5.5 y una temperatura de 30 °C con 150 rpm, como fuente de nitrógeno extracto de levadura y una concentración de inóculo del 3%, obteniendo una concentración de etanol final de 42.6 g/L a partir de 250 g/L de azúcar inicial (Turhan y col, 2010). De acuerdo a la Figura 27, se encontró que el jarabe ajustado del lavado es el que se aprovechan más los azúcares debido a que sólo queda el 19.88 % de AR y 10.99 % de AT seguido del jarabe pretratado con organosolv con el 22.16 % de AR y 20.95 % de AT. En el jarabe pretratado con alcalino/peróxido 15 % (p/v) fue el que se observó con una mayor cantidad de azúcares residuales con el 48.78 % de AR y 47.50 % de AT, de la misma forma que el jarabe pretratado con ácido diluido con el 39.10 % de AR y 19.33 % de AT residuales. Esto puede deberse a que no se eliminaron por completo derivados de furfural o bien residuos de lignina que pudieron haber inhibido la fermentación alcohólica.

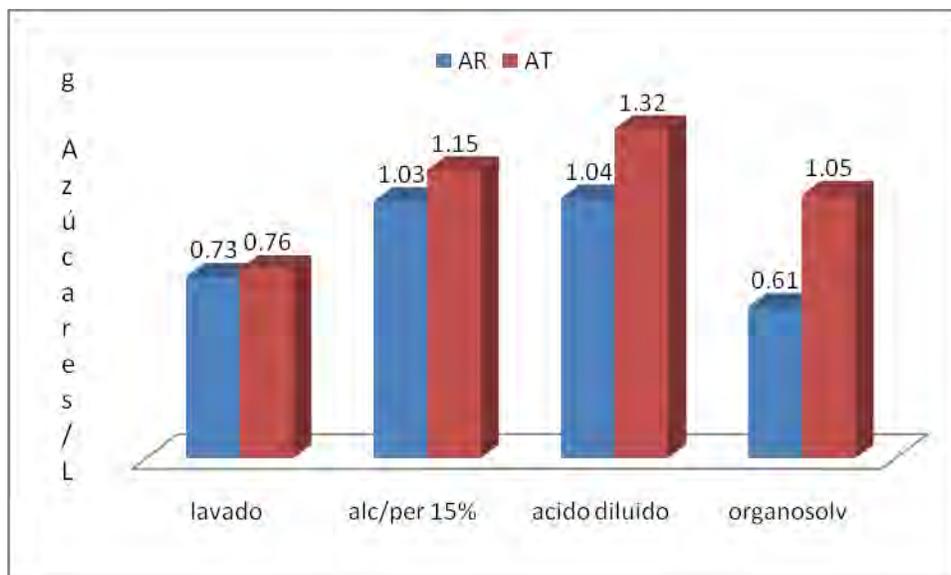


Figura 27. Contenido de azúcares reductores (AR) y totales (AT) en los jarabes después de la fermentación.

VI.1. Evaluación de la producción de etanol en los jarabes resultantes de cada pretratamiento

VI.1.1. Rendimiento de etanol

La Figura 28 muestra el rendimiento de etanol por litro de los jarabes del lavado y de los pretratamientos, donde se puede observar su respectiva correspondencia de acuerdo con los mostos donde se aprovechan mejor los azúcares (véase Figura 27), por lo que el primer lugar coincide con el jarabe del lavado, seguido del mosto pretratado con organosolv (0.55 g/L), que se obtiene muy poco a comparación de *P. radiata* con un rendimiento de 27.79 g/L (Araque y col, 2008), el penultimo lugar corresponde al mosto pretratado con ácido diluido y por ultimo se obtuvo una menor producción de etanol con el mosto pretratado con alcalino/peróxido 15% (p/v) con

0.31 g/L que a comparacion con lo obtenido a partir de la cascara de arroz de 8.2 g etanol/ L (Saha y Cotta, 2007) es muy inferior.

En general, se observa la poca producción de etanol debido a su baja concentración de azucres iniciales (Chen y col, 2009), los cuales asilan entre 2.5 g AR/L.

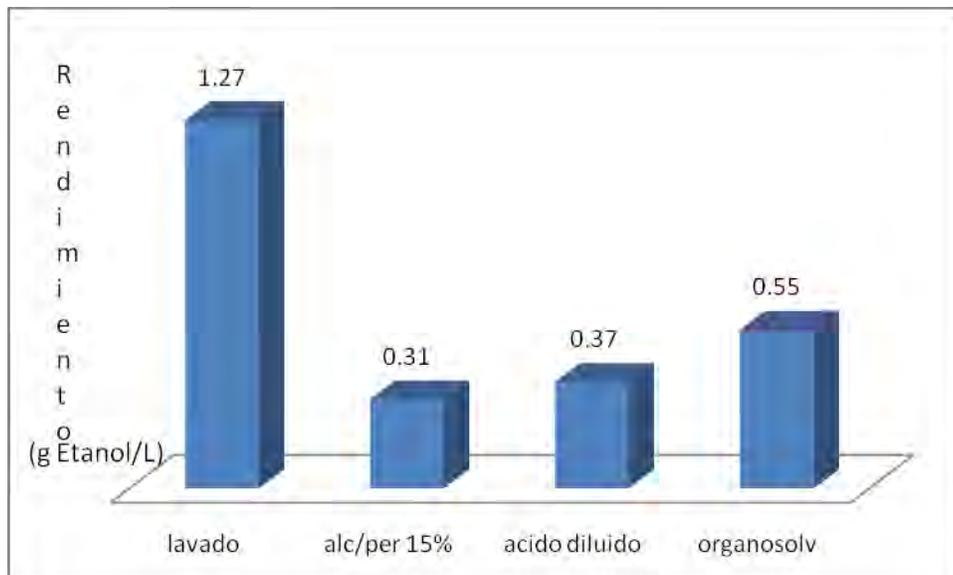


Figura 28. Rendimiento de etanol por litro, producido en cada jarabe del lavado y pretratamientos.

En la figura 29 nos muestra el rendimiento de etanol en base la cantidad producida por cada azúcar fermentado de los jarabes del lavado y de los pretratados, así podemos observar que en el pretratamiento alcalino/peróxido al 15% (p/v) se obtiene la mayor cantidad de etanol por masa de azúcares fermentados de 0.26 g/g A_{ferm} , que a comparacion con la cascara de arroz es inferior (0.49 g/g A_{ferm}) (Saha y Cotta, 2007), seguido del lavado, siendo el penultimo lugar el pretratamiento de organosolv y el último el pretratamiento ácido diluido.

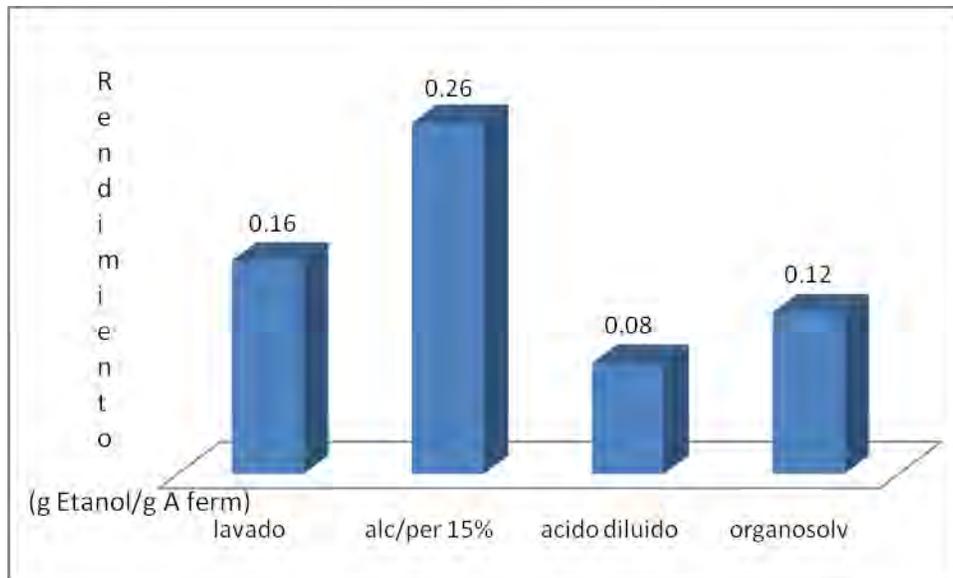


Figura 29. Rendimiento de etanol del lavado y pretratamientos en relación a los azúcares fermentados.

El rendimiento estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g etanol por gramo de glucosa y no considera la generación de biomasa de la levadura (Vázquez y Dacosta, 2007). Conociendo esto, se muestran los porcentajes de rendimiento de etanol para el lavado y para cada uno de los pretratamientos en la Figura 30. Así, se obtuvo un mejor rendimiento de etanol con el pretratamiento de alcalino/peróxido al 15 % (p/v) que a comparación con lo obtenido a partir de la cascara de arroz.

Como ejemplo, tenemos un estudio de comparación de pretratamientos (ácido diluido, cal, amonio y álcalis) mediante hidrólisis enzimática en rastrojo de maíz, de los cuales, el mejor pretratamiento resultó ser el alcalino. Ya que este pretratamiento permite la eliminación de la lignina y mejora la accesibilidad y digestibilidad de la celulosa, por lo que genera un mayor contenido de azúcares fermentables (principalmente glucosa y xilosa), además de no encontrarse compuestos inhibidores

(ácido acético y furfural), por lo que es considerado un buen pretratamiento para la fermentación y producción de etanol (Chen y col, 2009).

El segundo mejor rendimiento se obtuvo en el jarabe resultante del lavado de la HOM. En cambio, los pretratamientos de organosolv (comparación con *P.radiata* se obtuvo un rendimiento del 78.2%; Araque y col, 2007) y ácido diluido son los que se obtienen bajos rendimientos para la obtención de etanol.

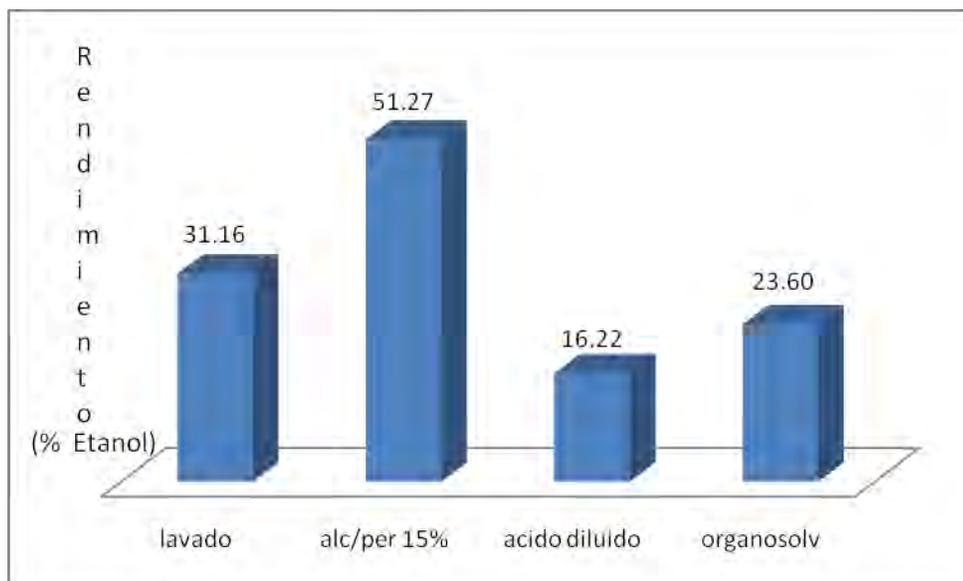


Figura 30. Rendimiento de etanol (%) del jarabe del lavado y de los pretratamientos.

Conclusiones

Se evaluaron 3 diferentes pretratamientos (alcalino/peróxido 4.5, 10 y 15 % (p/v), ácido diluido y organosolv) de la HOM. El análisis del I_C obtenido por difracción de Rayos X nos indica que todos los pretratamientos disminuyen la cristalinidad de la celulosa presente en el olote de maíz, siendo el pretratamiento organosolv y alcalino/peróxido 15 % (p/v) el de mayor efecto. La producción de AR en el lavado se le atribuye a la lixiviación de monosacáridos presentes originalmente de la HOM y al pretratamiento ácido diluido sucede que se hidrolizan los enlaces glucosídicos de la celulosa generando azúcares reductores. Así mismo, el valor del GP es más pequeño en el lavado y en el pretratamiento ácido diluido.

La sacarificación de los sólidos pretratados de la HOM presentaron una disminución importante de su I_C , salvo en el caso de la HOM lavada, lo que indica un efecto significativo del pretratamiento sobre la cristalinidad de la celulosa de la HOM. Sin embargo, los pretratamientos alcalino/peróxido y organosolv disminuyeron de manera más importante el valor del I_C . En cuanto a los AR generados durante la sacarificación, el contenido aumentó de la siguiente forma organosolv < alc/per 4.5 % < lavado < Alc/per 15% < Alc/per 10% < ácido diluido. El valor del GP fue cercano a uno para todos los pretratamientos excepto el de organosolv. Por lo que es evidente que el pretratamiento alcalino/peróxido permitió hidrolizar los oligosacáridos a monosacáridos.

Para efectuar la fermentación, se mezclaron los jarabes provenientes de lavado-pretratamiento-sacarificación a un valor de AR cercano a 2.5 g/L. A pesar de que no se detectó furfural, ni HMF, quedaron algunos AR (0.6-1 g/L) después de la fermentación. Estos AR podrían ser pentosas que no pueden ser fermentadas por las levaduras.

La evaluación del rendimiento de etanol en función de los azúcares fermentados, corresponde al porcentaje del rendimiento de etanol. Siendo el pretratamiento alcalino/peróxido al 15 % (p/v) el que presentó el mayor valor, seguido del lavado, el pretratamiento de organosolv y por último el de ácido diluido.

Recomendaciones

Si se requiere obtener un mejor rendimiento con el pretratamiento alcalino/peróxido al 15% (p/v), se tendría que realizar pruebas para encontrar las condiciones óptimas de pretratamiento, sacarificación y de fermentación del olote de maíz, de manera que se reduzca el volumen de agua utilizada en el mismo y aumentar la eficiencia de la relación de sólidos con respecto al volumen del medio de reacción utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

Aburto J., Martínez T., Murrieta F. (2008), *Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos*, Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ) **23** (1), 23-30.

Araque E., Parra C. y col (2008), *Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of Pinus radiata D. Don to ethanol*, Enzyme Micro. Technol. **43**, 214-219.

Arnaldos J., Navalón X. y col (2004), *Manual de ingeniería básica para la prevención y extinción de incendios forestales*, Editorial Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 83-84.

Binder J. y Raines R. (2009), *Simple Chemical Transformation of Lignocellulosic Biomass into Furans for Fuels and Chemicals*, J. Am. Chem. Soc. **131**(5), 1987.

Bullis K. (2008), *Un desarrollo tecnológico de avanzada "ya se fabrica de celunol"*, Portal Energético Internacional, página de internet consultada el 09/03/10: http://www.gabinete.org.ar/Julio_2008/celunol.htm

Buseck P., Cowley J., Eyrin L. (1992), *High Resolution Transmission Electron Microscopy*, Editorial Oxford University Press, EE.UU., pp. 569-570.

CATIE (1991), *Informe de la caracterización rural realizada en el departamento de Santa Ana*, Editorial CATIE, El Salvador, p. 42.

Chen M., Zhao J., Xia L. (2009), *Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility*, Biomass Bioenergy **33**, 1381-1385.

Duffey A. (2006), *Producción y comercio de biocombustibles y desarrollo de sustentables: los grandes temas*, Editorial IIED, Londres, Inglaterra, pp. 4-7.

Dunitz J. (1979), *X-Ray Analysis and the structure of organic molecules*, Editorial Cornell University Press, EE.UU., p. 25.

FAOSTAT-agriculture (2007), estadísticas, página en internet consultada el 03/03/10:
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

Ferrer C. y Amigó V. (2003), *tecnología de materiales*, Editorial Universidad Politécnica de Valencia, España, pp. 334.

Fulton L., Howes T., Hardy J. (2004), *Biofuels for Transport: An international Perspective*, Ed. International Energy Agency, Francia, p. 210.

Grassi G, Tripsa I (2004), *Bioenergy project for the production of bioethanol*, 9a ed., Editorial Universidad de Oxford, EE.UU., p. 260.

Gray K. (2007), *Cellulosic ethanol- state of the technology*, Internat. sugar jour. **109** (1299), 145-146.

Hart L., Fisher H., González J. (1991), *Análisis moderno de los alimentos*, Editorial Acribia, Zaragoza, España, p.619.

Hendriks A. y Zeeman G. (2009), *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*, Bioresour. Technol. **100**, 10-18.

Herrera A., Teallez L. y col (2004), *Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure*, J. Food Eng. **63**, 103–109.

Kadam K. y McMillan J. (2003), *Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production*, Bioresour. Technol. **88**, 17–25.

Lehninger A., Nelson D., Cox M. (1995), *Principios de Bioquímica*, 2a ed., Editorial OMEGA S.A, Barcelona, España, pp. 307,308, 418.

Market Research Analyst (2008), *Ninguna investigación de mercado siempre está bastante completo*, página de internet consultada el 06/02/10:

<http://www.marketresearchanalyst.com/2008/01/26/world-ethanol-production-forecast-2008-2012/>

Menéndez E. (2001), *Energías renovables, sustentabilidad y creación de empleo. Una economía impulsada por el sol*, 2da ed., Editorial Catarata, pp. 114, 177-179.

Mesa L., Gonzalez E., Ruiz E. (2010), *Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 2³ experimental design*, Appl. Energy **87**, 109–114.

Minteer S. (2006), *Alcoholic fuels*, Editorial CRC Press, EE.UU., p.72.

Mosier N., Wyman C. y col (2005), *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*, Bioresour. Technol. **96**, 673–686.

Mosquera J. y Merino L. (2006), *Empresa y energías renovables, lo que su empresa debe saber sobre energías renovables, eficiencia energética y Kioto*, Editorial Fundación Confemetal, Madrid, España, pp. 197-199.

Nielsen S. (2003), *Food Analysis*, 3a ed., Editorial Birkhauser, New York, EE.UU., pp. 105-113.

Nollet L. (2004), *Handbook of food analysis*, 2a ed., Vol. 138, Editorial CRC Press, New York, EE.UU., p. 55-71.

Ocaña J. (2009), *La Producción de Bioetanol en México no es un riesgo para la Seguridad Alimentaria*, Secretaria de Energía de la Ciudad de México, página en

internet consultada el 6/03/10:

<http://www.presidencia.gob.mx/prensa/sener/?contenido=47791>

Taiz L. y Zeiger E. (2006), *Fisiología vegetal, ciencias experimentales*, vol. 1, 3a ed., Ed. Universitat Jaume I, EE.UU, pp. 549-550.

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

The Royal Society (2008), *Sustainable biofuels: prospects and challenge*, página en internet consultada el 6/03/10: <http://royalsociety.org/Sustainable-biofuels-prospects-and-challenges/>

Turhan I., Bialka L. y col (2010), *Ethanol production from carob extract by using Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresour. Technol.* **101**, 5290.

Paliwal R., Gradanos G. y col (2001), *El maíz en los tópicos, mejoramiento y producción, colección FAO: Producción y protección vegetal No28*, Editorial Food and agricultura Org, Roma, Italia, p. 55.

Quintero R. (2009), *Biocombustibles lignocelulósicos: Estado del arte*, página en internet consultada el 7/03/10:

http://www.ine.gob.mx/descargas/con_eco/2009_sem_biocombustibles_pres_09_rquintero.pdf

Ramos L., Assaf J. y col (2005), *Influence of the Supramolecular Structure and Physicochemical Properties of Cellulose on Its Dissolution in a Lithium Chloride/N,N Dimethylacetamide Solvent System*, *Biomacromolecules* **6**, 2638-2648.

Reed J. (2005), *México insurgente*, Editorial Txalaparta, Nueva York, EE.UU., p. 342.

SAGARPA Y CAMBIO CLIMATICO (2009), tecnologías de mitigación, página en internet consultada el 6/02/10:

<http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/cambioclimatico/Tecnologías%20de%20mitigación.pdf>

Saha B. y Cotta M. (2007), *Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol*, *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 528-532.

Serna S. (2007), *Bioetanol en el noroeste de México, Taller práctico sobre energía renovable*, página de internet consultada el 07/02/10:

http://www.ine.gob.mx/descargas/cclimatico/taller_ener_ren_05.pdf

SEMARNAT, UNAM y col (2008), *Análisis integrado de las tecnología, el ciclo de vida y la sustentabilidad de las opciones y escenarios para el aprovechamiento de la bioenergía en México*, pp. 8-10, 16-17, página de internet consultada el 07/02/10: http://www.ine.gob.mx/descargas/cclimatico/e2008e_bioenergia.pdf

Seoáñez M. (2002), *colección de tecnología de alimentos*, Editorial grupo mundi-prensa, Madrid, España, pp.76-77.

Southgate D. (1991), *Determination of Food Carbohydrates*, 2a ed., Editorial Applied Science Publishers, EE.UU., pp. 170-178.

Vázquez J. y Dacosta O. (2007), *Fermentación alcohólica*, *Ingeniería Investigación y Tecnología* VIII No 4, pp. 249-259, página consultada el 13/04/10:

<http://www.ejournal.unam.mx/ict/vol0804/ICT000800404.pdf>

Vega D. y Ramírez P. (2004), *Situación y perspectivas del maíz en México*, Universidad Autónoma de Chapingo, pp.14-17,39-41, página consultada el 03/03/10: http://www.economia.gob.mx/pics/p/p1763/Maiz__270304.pdf

Wallace F. (2004), *ciencia de los polimeros*, Editorial Reverté, Barcelona, España, p.112.

Whitaker J. (2003), *Handbook of food enzymology*, Editorial Marcel Dekker Inc, EE.UU., pp. 771-774.

Yu, M., Chandra R. y Saddler J. (2007), *Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods*, *Energy & Fuels* **22**, 46-60.

Zhang S., Marechal F. y col (2009); *Process Modeling and Integration of Fuel Etanol Produccion from lignocellulosic Biomass Based on Double Acid Hydrolysis*, *Energy & Fuels* **23** (3), 1759-1765.