



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BAGAZO DE
SORGO PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES
A ETANOL Y EFECTO DE DIFERENTES PRETRATAMIENTOS**

T E S I S

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

PRESENTA

TANIA RAQUEL VÁZQUEZ BOLAÑOS



MÉXICO, D.F.

2012



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: Agustín López Munguía Canales

VOCAL: José Mariano García Garibay

SECRETARIO: Jorge Arturo Aburto Anell

1er. SUPLENTE: Inés Miranda Martínez

2do. SUPLENTE: Sandra Paola Sánchez Rodríguez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO

ASESOR

JORGE ARTURO ABURTO ANELL

SUSTENTANTE

TANIA RAQUEL VÁZQUEZ BOLAÑOS

“Hay en el mundo un lenguaje que todos comprenden: es el lenguaje del entusiasmo, de las cosas hechas con amor y con voluntad, en busca de aquello que se desea o en lo que se cree”

Paulo Coelho

“Da tu primer paso ahora. No es necesario que veas el camino completo, pero da tu primer paso. El resto irá apareciendo a medida que camines”

Martin Luther, Jr.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre: Magdalena, por ser mi fortaleza, mi ejemplo e inspiración, porque todo en lo que me he convertido te lo debo a ti.

A mis hermanas: Roxana y Verónica y a mis sobrinos, por acompañarme siempre, darme alegrías y soportar mis enojos, agradezco su paciencia.

A mi esposo: Juan Antonio, por tu paciencia, amor, apoyo y admiración. Por alentarme a seguir adelante y lograr mis metas.

Al resto de mi familia: Por creer en mí.

A mis amigos, colegas y compañeros: Iván, Leslie, Gabriela, Adla, Mónica, Luis Ángel... absolutamente a todos y a mis compañeros en el Instituto de Química Lab 2-10 y en el IMP, por los buenos años en la FQ, por estar siempre al pendiente de mi trabajo, acompañarme a lo largo de esta carrera, apoyarme, quererme y brindarme su amistad.

Al Dr. Jorge Aburto: Por darme la oportunidad de elaborar este proyecto, compartir su conocimiento conmigo y apoyarme en todo momento.

A la Facultad de Química: Por ser el lugar donde formé y cumplí este sueño, porque los años que pasé entre sus aulas, laboratorios y edificios, no han sido en vano.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México: Porque mi paso por esta institución me llena de orgullo y estoy feliz de formar parte de ella.

“El futuro pertenece a aquellos que creen en la belleza de sus sueños”

Eleanor Roosevelt

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	3
CAPÍTULO I. Antecedentes	5
1.1. Biocombustibles	5
1.2. Bioetanol	7
1.3. Panorama del bioetanol en México y el mundo	9
1.4. El sorgo.....	14
1.5. Material lignocelulósico	16
1.5.1. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica	22
1.5.2. El sorgo dulce como fuente de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol	24
1.6. Pretratamiento del material lignocelulósico	28
1.6.1. Pretratamientos Físicos (Mecánico)	29
1.6.2. Pretratamientos Fisicoquímicos	30
1.6.3. Pretratamientos Químicos.....	32
1.6.4. Pretratamientos Biológicos.....	37
1.7. Hidrólisis del material lignocelulósico	38
1.8. Fermentación	42
CAPÍTULO II. Objetivos e hipótesis.....	45
2.1. Objetivo general	45
2.2. Objetivos particulares.....	45
2.3. Hipótesis	45
CAPÍTULO III. Metodología y Diseño de Experimentos	46
3.1. Diagrama general	46

3.2.	Reactivos y equipo	47
3.3.	Metodología descriptiva	49
3.3.1.	Obtención del bagazo de sorgo dulce	49
3.3.2.	Hidrólisis enzimática	50
3.3.3.	Diseño de experimentos para la optimización de la Hidrólisis Enzimática	50
3.3.3.1.	Dominio experimental de la hidrólisis enzimática de bagazo de sorgo dulce sin pretratamiento	51
3.3.3.2.	Método 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)	55
3.3.3.3.	Identificación y cuantificación de azúcares mediante HPLC	56
3.3.4.	Pretratamiento del material lignocelulósico y su hidrólisis enzimática	59
3.3.4.1.	Básico-Oxidante	59
3.3.4.2.	Pretratamiento ácido diluido	61
3.3.4.3.	Básico con Hidróxido de Sodio	62
3.3.4.4.	Básico con Óxido de Calcio (Cal)	63
3.3.4.5.	Ozonólisis	65
3.3.4.5.1.	Determinación de la concentración de ozono	69
3.3.4.6.	Lignina soluble	72
3.3.4.7.	Caracterización mediante espectrofotometría de Infrarrojo	73
3.3.4.8.	Difracción de Rayos X	75
CAPÍTULO IV. Resultados y Discusión		78
4.1.	Diseño de Experimentos: Hidrólisis enzimática	78
4.1.1.	Dominio experimental e idoneidad del modelo matemático de la hidrólisis enzimática de bagazo de sorgo sin pretratamiento	78

4.1.2. Efecto de la proporción de enzima, cantidad de harina de bagazo y tiempo de reacción en la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo dulce	82
4.2. Pretratamientos	96
4.2.1. Lignina soluble	97
4.2.2. Efecto del pretratamiento sobre la estructura química de los polisacáridos. Caracterización mediante espectrofotometría de Infrarrojo	101
4.2.3. Efecto del pretratamiento sobre la cristalinidad de la celulosa. Difracción de Rayos X	107
4.2.4. Hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo sujeto a pretratamiento. Cuantificación de azúcares mediante HPLC	113
CAPÍTULO V. Conclusiones	116
Anexo A	119
• Identificación de azúcares por HPLC	119
• Curvas de calibración de azúcares para el método DNS y HPLC con estándar interno	120
• Análisis de varianza de la evaluación de la actividad enzimática	122
• Gráficos del diseño de experimentos	123
• Análisis de varianza de las respuestas del diseño de experimentos	127
Anexo B	129
• Equipo utilizado	129
• Índice de figuras	131
• Índice de tablas	134
Bibliografía	136

RESUMEN

El uso de materias primas lignocelulósicas constituye una de las variantes más promisorias para la producción de biocombustibles, un ejemplo de ello es el sorgo dulce, uno de los cultivos energéticos más atractivos para la producción de bioetanol.

La producción de etanol con sorgo dulce, posee alto potencial de generación de residuos como el bagazo, el cual puede utilizarse junto con el jugo procesado de la planta, o por sí solo, para producir etanol celulósico cuando sea viable a escala comercial. El rendimiento del proceso, depende no sólo de los métodos de pretratamiento de la biomasa, sino también de las condiciones de un procesamiento que sea eficiente y de las propiedades físicas y químicas de la biomasa. Tres son las etapas principales en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica: pretratamiento, hidrólisis y fermentación, las cuales se ha buscado optimizar mediante diversas investigaciones, con el fin de mejorar el rendimiento del proceso global.

En este trabajo, se evaluó el proceso de hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo dulce (biomasa lignocelulósica), utilizando un coctel enzimático llamado E7, para ello, se elaboró un diseño de experimentos que permitió establecer el tiempo, proporción de enzima y contenido de sólidos adecuado para la hidrólisis enzimática a 50°C. Así, se determinaron las condiciones más favorables en las cuales el coctel E7 es capaz de producir la mayor cantidad de azúcares fermentables a partir del bagazo de sorgo dulce sin pretratamiento.

A sí mismo, se evaluaron los efectos de 5 pretratamientos diferentes sobre la biomasa lignocelulósica: Básico-Oxidante, Básico con NaOH, Básico con CaO, Ozonólisis y Ácido diluido. El efecto de cada pretratamiento se evaluó mediante la medición de lignina soluble, espectrofotometría de infrarrojo y difracción de rayos X. De ésta manera se determinó el pretratamiento más adecuado y que favorece en mayor medida la hidrólisis del bagazo de sorgo dulce.

Al final de este trabajo se obtuvieron las condiciones óptimas para el desarrollo de la hidrólisis enzimática a 50°C, esto es, una proporción de enzima de 0.9 mL_{enzima}/g_{bagazo}, 5 % p/v de harina de bagazo y 2 h de reacción enzimática, los cuales fueron los parámetros establecidos para desarrollar el resto del experimento.

El pretratamiento más eficaz fue el Básico con NaOH, el cual mostró mayor capacidad para la remoción de lignina y exposición de las fibras de celulosa, así mismo, permitió un aumento en el rendimiento de azúcares fermentables.

INTRODUCCIÓN

El etanol producido a partir de biomasa (cultivos agrícolas, forestales, desechos agroindustriales, etc.) o “bioetanol” es de interés a causa de la naturaleza renovable de las materias primas, además de que puede reemplazar en parte el uso de los combustibles fósiles. Se puede producir a partir de una gran variedad de substratos azucarados o amiláceos, principalmente granos de cereales, pero también de los residuos de éstos, ejemplo de ello son los residuos de malta, bagazo de trigo, bagazo de sorgo, etc. (ARPEL & IICA, 2009).

El sorgo, es una planta de la familia de las gramíneas con cañas de 1 ½ m de altura, de las cuales principalmente se usan los granos en la preparación de harina, alimentos para humano y en su mayoría para alimentar al ganado. El material restante, es decir, el bagazo de sorgo, compuesto principalmente de material lignocelulósico, se puede emplear para la producción de bioetanol con los correspondientes procesos de sacarificación y fermentación (Sipos, 2010, ARPEL & IICA, 2009). Sin embargo, la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica, en general, es complicada pues su alta cristalinidad y difícil acceso a las fibras de celulosa dificultan el proceso. Por ello, se han desarrollado diversos métodos que mejoran la hidrólisis de la lignocelulosa, como los pretratamientos físicos, químicos y biológicos. El pretratamiento ayuda a reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina y aumentar el área superficial del material sometido después a sacarificación. De esta manera, el pretratamiento ayuda a mejorar el rendimiento en la obtención de azúcares fermentables desde la biomasa inicial (Sun y Cheng, 2002; Lozanoff, 2007). Además, las condiciones del proceso de sacarificación son de vital importancia para poder obtener el mayor rendimiento posible, sobre todo si se trata de una hidrólisis enzimática.

Este proyecto se elaboró con el fin de evaluar el proceso de hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica, utilizando como materia prima el bagazo de sorgo dulce. En estudios anteriores, llevados a cabo por el equipo de trabajo, se analizó la sacarificación tanto ácida como enzimática, estableciendo diferentes parámetros de estudio tales como el tamaño de partícula del material lignocelulósico, la temperatura de reacción, la concentración de ácido y actividades de diferentes

cocteles enzimáticos. En este caso, se trabajó con un coctel enzimático de origen fúngico llamado E7, uno de los cuales ha presentado mayor actividad enzimática comparándolo con otras preparaciones comerciales (Vera, 2012; Tapia, 2010; Hernández, 2010; Guzmán, 2012). Se elaboró un diseño de experimentos que permitió determinar las condiciones más favorables en las cuales el coctel E7 es capaz de producir la mayor cantidad de azúcares fermentables a partir del bagazo de sorgo dulce sin pretratamiento.

Así mismo, se han evaluado distintos pretratamientos para la optimización de dicha sacarificación en diferentes materiales lignocelulósicos como el salvado de trigo, residuos de malta, olote de maíz, entre otros (Caballero, 2010; Medrano, 2010; Villaseñor, 2010). Algunos de los pretratamientos estudiados con anterioridad, han mostrado la capacidad de aumentar significativamente el rendimiento de la sacarificación ácida o enzimática, por ello, se decidió estudiar su efecto sobre el bagazo de sorgo y se eligieron 5 de ellos: Básico-Oxidante, Básico con NaOH, Básico con CaO, Ozonólisis y Ácido diluido. Posteriormente, el bagazo de sorgo pretratado se sometió a hidrólisis enzimática con E7 y los jarabes obtenidos se analizaron por HPLC para la identificación y cuantificación de azúcares. De esta manera se determinó el pretratamiento más adecuado y que junto con las mejores condiciones de hidrólisis, resultan en el mayor rendimiento posible de azúcares fermentables obtenidos a partir del bagazo de sorgo dulce.

1.1. BIOCOMBUSTIBLES

En la actualidad, el incremento del nivel de la población, la necesidad de mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero, las graves consecuencias del cambio climático, así como el desarrollo de las economías, han generado un aumento persistente de la demanda energética. Esto ha obligado a la búsqueda de mayor eficiencia en la producción y uso de los energéticos, así como a desarrollar el potencial del uso de fuentes de energía diferentes a las fósiles (SENER, 2011b).

Los combustibles de origen fósil han sido muy útiles en el desarrollo de la sociedad mundial; el petróleo, el gas natural y sus derivados representan el 55 % del consumo mundial de energía, sin embargo, estas fuentes no van a durar más que algunas décadas, ya que, como combustibles fósiles, sus reservas son finitas. La seguridad de abastecimiento es un problema para muchos de los países que importan combustibles fósiles y su uso es la principal causa de la emisión de gases que están provocando cambios climáticos y el calentamiento global (Goldemberg, 2008; SENER, 2009).

La diversificación de fuentes primarias de energía favorece la seguridad energética al disminuir nuestra dependencia de una sola fuente de energía (SENER, 2009), por ello, es preciso encontrar sustitutos para los combustibles fósiles y lo más racional sería producirlos en base a materia orgánica renovable como la biomasa (Goldemberg, 2008). La biomasa en general son los recursos naturales que poseen bioenergía y que se pueden procesar para obtener formas bioenergéticas más elaboradas (BNDES y CGEE, 2008), como combustibles gaseosos (biogás) o líquidos (bioetanol y biodiesel; Torres y Gómez, 2006). Actualmente, el mundo está viviendo la era de la biomasa (la bioenergía), con la generación de un nuevo modelo de agricultura no alimenticia, responsable de la producción de materias primas energéticas renovables que podrían sustituir gradualmente el uso del carbón mineral y del petróleo (Pasa, 2010).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

La energía renovable es aquella que, administrada en forma adecuada, puede explotarse ilimitadamente ya que su cantidad disponible no disminuye a medida en que ésta se aprovecha.

La utilización de estas energías tiene ventajas como:

- La preservación de las fuentes energéticas, debido a su carácter sustentable.
- Garantizan la seguridad y diversidad del suministro energético.
- Proveen servicios de energía que evitan en gran medida el impacto ambiental, contribuyendo a la protección del ecosistema.
- Su tecnología en forma natural es de tipo modular, lo que permite ir desarrollando infraestructura en forma gradual y conforme a los requerimientos del mercado.

Además, el uso de las energías renovables representa nuevas fuentes de empleo, la reactivación de muchas industrias tradicionales (SENER, 2010) y su participación permitiría conservar nuestros recursos no renovables (Alatorre, 2009).

Los biocombustibles son renovables y de bajo impacto ambiental (ciclo cerrado de carbono) y son especialmente viables en países que disponen de tierras para sus cultivos, que poseen disponibilidad de mano de obra rural y en aquellos en los que históricamente la biomasa tiene representación en su matriz energética. Si es posible utilizar los biocombustibles en sustitución de los combustibles derivados del petróleo, sin ninguna o con pequeñas modificaciones en los motores y en las infraestructuras de distribución preexistentes, podrán obtenerse beneficios significativos en relación con sus costos de producción y otros como las ventajas del uso de energías renovables mencionadas anteriormente. Por todo esto, los combustibles alternativos derivados de la biomasa, con ciclo cerrado de carbono y exentos de azufre como el etanol (y las mezclas con gasolina base) y el biodiesel, han mostrado ser alternativas viables (Pasa, 2010).

1.2. BIOETANOL

El bioetanol (alcohol etílico) se puede producir a partir de cultivos con altos contenidos de azúcares (como la caña, la remolacha y el sorgo dulce), cultivos feculentos (como el maíz y la yuca) y materiales celulósicos o biomasa lignocelulósica (Alatorre, 2009; Figura 1).

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

Primera Generación: Proviene de cultivos que pueden ser empleados también para la alimentación humana o animal. Los cultivos adecuados son los que tienen altas concentraciones de azúcares, como la caña de azúcar, el sorgo dulce o la remolacha; o altas concentraciones de almidón, como el maíz, la yuca o la papa.

Segunda Generación: Se produce a partir de materias primas con alto contenido de celulosa, como los residuos de la madera o de cultivos alimenticios como los desechos del maíz y el trigo o el bagazo de la caña de azúcar y el de sorgo dulce. Su procesamiento requiere de tecnologías avanzadas y aunque ya hay algunas plantas productoras en el mundo, todavía está en fase experimental.

Tercera Generación: Proviene de fuentes específicamente cultivadas para producir biocombustibles, como las algas marinas. Ésta producción aún se encuentra en fase experimental y no está lista para producir bioetanol en cantidades industriales de una manera rentable (SAGARPA, 2011).

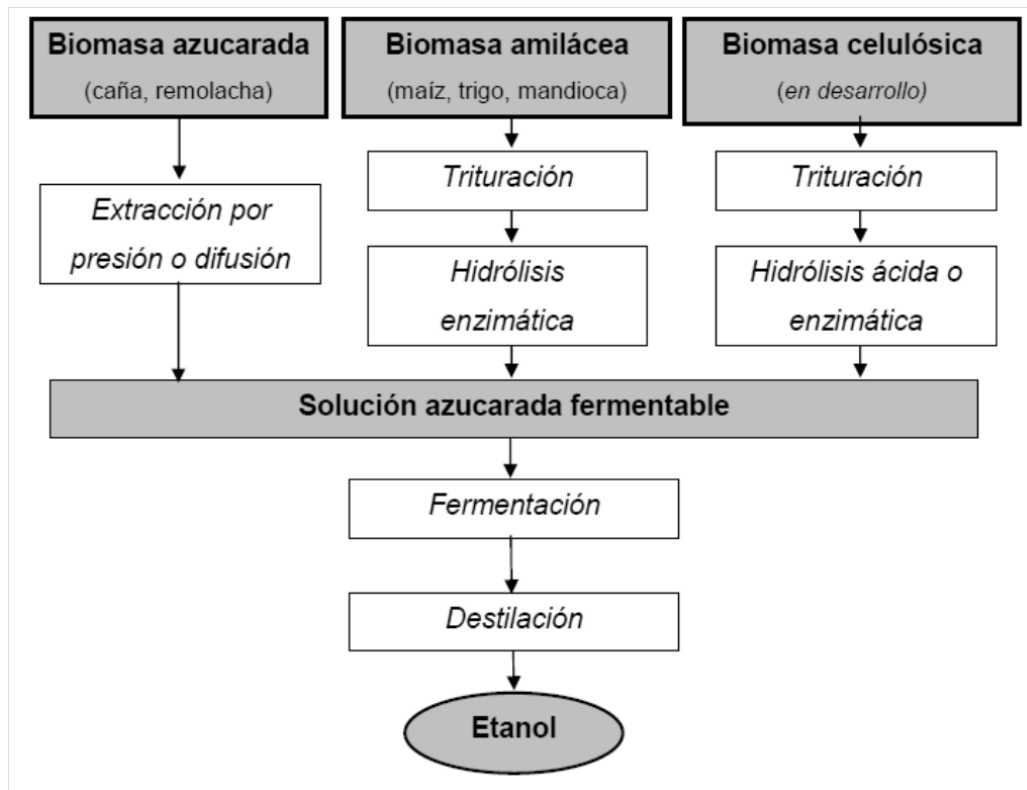


Figura 1. Rutas tecnológicas para la producción de bioetanol (BNDES y CGEE, 2008).

Como biocombustible, el etanol es más puro que el empleado para los otros fines. Por ejemplo, mientras que la pureza del etanol o alcohol etílico para la medicina y las bebidas alcohólicas es de 96 %, la del biocombustible debe ser del 99.5 % al 99.9 % (SAGARPA, 2011). Se utiliza en motores de combustión interna con ignición a chispa de dos maneras: 1) en mezclas de gasolina y etanol anhidro o 2) como etanol puro, generalmente hidratado (BNDES y CGEE, 2008).

Los principales biocombustibles, bioetanol y biodiesel, se pueden mezclar en proporciones pequeñas (de menos del 10 %) con gasolina y diesel respectivamente, sin necesidad de hacer adaptaciones en los motores de vehículos modernos. El bioetanol entonces, puede ser empleado directamente como combustible, pues es considerado un excelente sustituto para la gasolina, y

puede usarse también como un añadido a la gasolina en distintas concentraciones. La mezcla más común se realiza en una concentración de alrededor de 5 %, para reemplazar como oxigenante al MTBE, que es altamente contaminante del suelo y aguas subterráneas (SAGARPA, 2011). Los programas de introducción del etanol como sustituto de la gasolina, están justificados por la eliminación de aditivos oxigenantes (MTBE) en la gasolina, la sustitución de ésteres derivados del petróleo y la reducción de las emisiones de gases que provocan el calentamiento global (Goldemberg, 2008; Pasa, 2010).

1.3. PANORAMA DEL BIOETANOL EN MÉXICO Y EL MUNDO

La existencia de países con buenas condiciones para la producción sostenible de bioetanol y la necesidad mundial de un combustible renovable y ambientalmente adecuado, indican perspectivas interesantes para que este biocombustible sea un producto global (BNDES y CGEE, 2008).

El mayor productor mundial de bioetanol es Estados Unidos, con una producción a partir de maíz. El segundo mayor productor mundial de bioetanol es Brasil, el etanol brasileño es producido a partir de caña de azúcar y ha sido usado desde hace más de treinta años en ese país, como sustituto de gasolina automotriz derivada del petróleo. En Brasil, el etanol producido de caña de azúcar ya sustituye la mitad de la gasolina que sería usada si no existiera y su costo es competitivo sin los subsidios que hicieron este programa viable en un inicio. Así mismo, Brasil tiene una gran disponibilidad de tierras para la expansión de la producción de etanol de caña de azúcar y se coloca como un potencial exportador de este combustible.

En Europa Occidental, el bioetanol también es producido pero en menor escala a partir de remolacha y de trigo, pero el costo es más elevado. Otros países productores de caña de azúcar que también utilizan el etanol combustible son

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Colombia, Venezuela, Mozambique y las Islas Mauricio (Goldemberg, 2008; Pasa, 2010).

En los últimos años, la capacidad de producción global de energías renovables, creció a tasas de entre 15 y 50 % anual entre 2005 y 2010, para algunas de las tecnologías. En el período citado, la producción de biocombustibles creció a tasas de 23 % anual para el etanol y 38 % anual para el biodiesel, sin embargo, estas tasas de crecimiento han ido disminuyendo (SENER, 2011b).

En 2010, la producción mundial de etanol combustible alcanzó un estimado de 86,000 millones de litros, un incremento del 17 % más que en 2009 (Figura 2). Los Estados Unidos y Brasil representaron el 88 % de la producción de etanol en 2010, con los EEUU produciendo solo el 57 % del total mundial. Estados Unidos representó la mayor parte del aumento, produciendo 8,400 millones de litros más que en 2009, para un total de 49,000 millones de litros, además después de ser varios años un importador neto, en 2010 se convirtió en un exportador neto, enviando 1,300 millones de litros de bioetanol al extranjero, principalmente a Canadá, Jamaica, Holanda, Emiratos Árabes Unidos y Brasil, lo cual provocó que este último tuviera pérdidas en el mercado internacional, particularmente en su mercado tradicional en Europa (REN21, 2011).

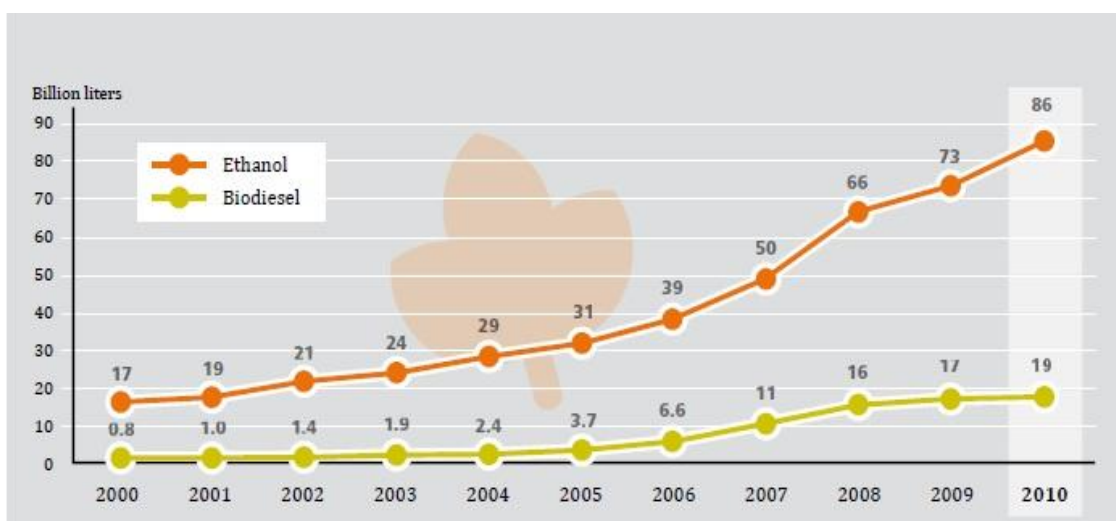


Figura 2. Producción global de Etanol y Biodiesel 2000-2010 (REN21, 2011).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

La producción de etanol de Brasil en 2010, aumentó en más del 7 %, a 28,000 millones de litros y el país representó casi un tercio del total mundial. Por su parte, China con 2,000 millones de litros, se mantuvo como el mayor productor de etanol de Asia, seguido por Tailandia y la India.

En la Unión Europea, el Reino Unido tuvo su mayor aumento en la producción anual, alcanzando aproximadamente un 325 %, es decir, 320 millones de litros. Francia y Alemania siguieron siendo los mayores productores europeos en 2010. Otros productores importantes fueron Canadá, Colombia, Polonia y España (REN21, 2011).

En total, la producción mundial de biocombustibles en el 2009, incluyendo el biodiesel y el bioetanol, fue de alrededor de 90,000 millones de litros los cuales equivalen al 3 % de la demanda mundial del sector transporte (SENER, 2011b).

Como condición fundamental para que se desarrollen en los próximos años los potenciales de producción y el mercado global de bioetanol, se han propuesto e implementado en diversos países, políticas volcadas a la introducción de los biocombustibles, con un grado variable de claridad y objetividad dependiendo de cada país, como es el caso de México. Un análisis de éstos programas de introducción de biocombustibles muestra que el aumento de la seguridad energética y la mitigación de cambios climáticos están entre los factores más importantes de motivación para programas bioenergéticos en la mayoría de los países (BNDES y CGEE, 2008).

En la producción actual de biocombustibles se utilizan tecnologías convencionales, creando biocombustibles de primera generación. Sin embargo, nuevas tecnologías de biocombustibles de segunda generación a partir de residuos de biomasa (como el bagazo), están repuntando y se espera que en los próximos años dominen el mercado (SENER, 2011b).

En el caso de México, el tema de los bioenergéticos es relevante en función del gran potencial para el desarrollo de las energías renovables. Actualmente, la

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

biomasa se está utilizando para producir y aprovechar el biogás, y en algunas regiones del país se están desarrollando mercados locales de biodiesel. También se contempla el uso de los bioenergéticos de segunda y tercera generación, pero aún se encuentra en etapa de desarrollo e investigación (SENER, 2011a).

En México, el sector energético contribuye con el 61 % de las emisiones de gases de efecto invernadero. El aprovechamiento de las energías renovables, al desplazar el consumo de combustibles fósiles, constituye una de las principales estrategias de mitigación del cambio climático a nivel mundial. Debido a su alta vulnerabilidad ante el cambio climático, nuestro país tiene un interés particular para promover mecanismos globales de mitigación (Alatorre, 2009).

Como suele suceder, en los mercados nuevos no existe una rentabilidad asegurada para ninguno de los cultivos ni de los métodos de producción, pero todos presentan oportunidades para los inversionistas que deseen tomar el reto (SAGARPA, 2011). México requerirá de grandes cantidades de bioetanol para cumplir con su programa de introducción.

El mercado nacional está representado por la necesidad de PEMEX que, tal y como lo mandatan las políticas públicas para los biocombustibles, debe agregar un 6 % de bioetanol a la mezcla de las gasolinas de las tres principales zonas metropolitanas del país, Guadalajara, Monterrey y Valle de México, para este 2012. Ello equivale a una demanda total de 592 millones de litros de bioetanol para el período 2011-2012. Después del 2012, si a toda la gasolina del país se le agregara el 6 % de bioetanol, como lo indican los programas de bioenergéticos, entonces la demanda total de bioetanol sería de 2,644 millones de litros anuales (SAGARPA, 2011; SENER, 2006; SENER, 2011c).

La Secretaría de Energía (SENER), ha establecido acciones para fomentar el aprovechamiento de fuentes renovables de energía, como estrategia para diversificar las fuentes de energía disponibles en el país y asegurar un suministro confiable, de calidad, y a precios competitivos, de los energéticos que demandan

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

los consumidores. A finales del 2011, se estableció el Programa de Introducción de Etanol Anhidro, como un instrumento que permitirá asegurar su efectiva introducción en nuestra matriz energética, con base en las condiciones reales del mercado y las capacidades nacionales identificadas. Éste programa sustituye lo establecido en el Programa de Introducción de Bioenergéticos (2009) en materia de etanol anhidro y oxigenantes para gasolina (SENER, 2011c).

De los ingenios azucareros que existen en México, 18 de ellos cuentan con destilería para la producción de etanol, de los cuales solamente producen alcohol actualmente los siguientes: Ingenio La Concepción (19,751 m³/año); Ingenio San José de Abajo (2,027 m³/año); Ingenio San Nicolás (4,159 m³/año); Ingenio Constanca (1,079 m³/año); Ingenio Puljitic (8,640 m³/año); Ingenio Tamazula (1,795 m³/año); Ingenio Calipan (426 m³/año) e Ingenio San Pedro (196 m³/año). Dicha producción se destina a satisfacer la demanda de bebidas alcohólicas y de la industria química.

Asimismo, la SENER tiene identificados 13 proyectos de investigación para la producción de etanol de segunda generación, a partir de residuos y de algas, siendo el más relevante el de la empresa BLUE FUEL S. A. P. I. de C. V., ubicada en el estado de Jalisco, la cual produce etanol anhidro a partir de agave y residuos con un potencial aproximado de 9.2 millones de litros mensuales (SENER, 2011b).

Entre las líneas estratégicas y acciones para la introducción de etanol anhidro como combustible, está que Petróleos Mexicanos adquirirá etanol anhidro conforme a los volúmenes y plazos que a continuación se señalan:

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Tabla 1. Volumen de etanol anhidro que PEMEX adquirirá conforme a los plazos establecidos (SENER, 2011c).

AÑO	Volumen (millones de litros por año)	
	Mínimo	Máximo
2011	0	0
2012	50	100
2013	75	150
2014	85	175
2015	100	200
2016	115	230

Se espera que lo anterior contribuya a la creación de una nueva industria, que beneficie a productores agrícolas e industriales y que contribuya al fortalecimiento de la seguridad energética y a la protección del medio ambiente, sin poner en riesgo la seguridad alimentaria del país (SENER, 2011c).

1.4. EL SORGO

El sorgo es una gramínea tropical cultivada principalmente en zonas con altas temperaturas, semiáridas y secas, especialmente en zonas que son demasiado secas para el maíz. Además, es más barato producirlo y tiene rendimientos comparables (Corredor, 2009; SAGARPA, 2011). Estas cualidades lo hacen una de las materias primas potenciales para la producción de bioetanol.

En su variedad de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.), Moench ssp. *Sacharatum*) puede crecer hasta una altura que va de 2 a 4 metros, sus granos son pequeños y amargos, pero su tallo es dulce (SAGARPA, 2011). Es una planta originaria de África y extendida a todos los continentes. Crece en zonas templado-cálidas (entre 25 y 31°C) y zonas húmedas subtropicales. Se destaca por su gran resistencia a la sequía, altas temperaturas y vientos fuertes (ARPEL & IICA, 2009).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

El sorgo dulce puede producirse en una amplia variedad de tipos de suelos, pero los rendimientos son mayores en suelos profundos, bien drenados y con buena fertilidad. Tolera la salinidad y diferentes niveles de acidez en el suelo (pH 5.5-8.2; SENER, 2006) y si bien es más tolerante a la sequía que muchos otros cultivos, la humedad abundante durante el período de crecimiento es importante para obtener buenos rendimientos en tallo y jugo. A diferencia del sorgo granífero, cuyo mayor contenido de material fermentable se encuentra en el almidón del grano, el sorgo dulce se caracteriza por su alto contenido de azúcares fermentables en el tallo. De acuerdo al tipo de azúcares contenido en los tallos, el sorgo dulce puede dividirse entre los de tipo “sacarino”, que contienen principalmente sacarosa, y los de tipo “jarabe”, que contienen principalmente glucosa (ARPEL & IICA, 2009). En México se cultiva principalmente para el autoconsumo como alimento animal en las granjas lecheras.

Por otro lado, mientras que la mayoría de las plantas conocidas utiliza el ciclo fotosintético C3, en algunas gramíneas tropicales, como en el caso del sorgo, se ha identificado el ciclo C4. Tal distinción es relevante para el desarrollo de bioenergéticos, ya que las plantas C4 presentan una elevada tasa fotosintética (absorben más energía solar), tienen una alta eficiencia en la utilización del agua, mayor tolerancia salina y bajo punto de compensación para el CO₂, es decir, responden mejor bajo menores concentraciones de éste gas, por lo que se puede afirmar que los vegetales con ciclo C4, como el sorgo dulce, son los más aptos para la producción bioenergética (BNDES y CGEE, 2008).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Tabla 2. Composición de la planta completa de Sorgo dulce (SAGARPA, 2011; SENER, 2006).

Componente	Composición (kg/ton)	Composición (%)
Agua	774.7	77.5
Materia seca	225.3	
<i>De la cual</i>		
Sólidos en solución	146.6	
<i>De los cuales</i>		
Azúcares fermentables y almidones	96.5	9.6
Sólidos no fermentables	50.1	5.0
Insolubles	78.7	
<i>De los cuales</i>		
Fibra	75.8	7.6
Cenizas	2.9	0.3
TOTAL	1000	100

Debido a su alto contenido de azúcares fermentables en el tallo, el etanol de sorgo dulce se obtiene a partir de la trituración de los tallos y de la posterior destilación de los jugos dulces obtenidos.

El sorgo dulce es considerado como una de las materias primas alternativas más promisorias para la producción de bioetanol. Actualmente, tiene una producción poco significativa a nivel mundial, en EEUU se ha cultivado tradicionalmente para la producción de jarabes y para alimentación animal, otros países también productores son India, algunos países africanos y China (ARPEL & IICA, 2009).

1.5. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Los materiales lignocelulósicos son fuentes renovables de energía que no son utilizadas en su mayoría y están disponibles en abundancia como materias primas para la producción de etanol combustible. Pueden ser obtenidas a un bajo costo a

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

partir de varias fuentes como residuos forestales, municipales, desechos de papel y residuos de cultivos (Taherzadeh, 2007).

Algunos residuos de la agricultura como paja de trigo, colza, avena y cebada, representan una fuente abundante, barata y fácilmente disponible de biomasa lignocelulósica renovable para la generación de biocombustibles (Tabil, 2011).

El material lignocelulósico (Figura 3) se refiere a la biomasa vegetal compuesta por polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y por la lignina (BNDES y CGEE, 2008; Tabil, 2011).

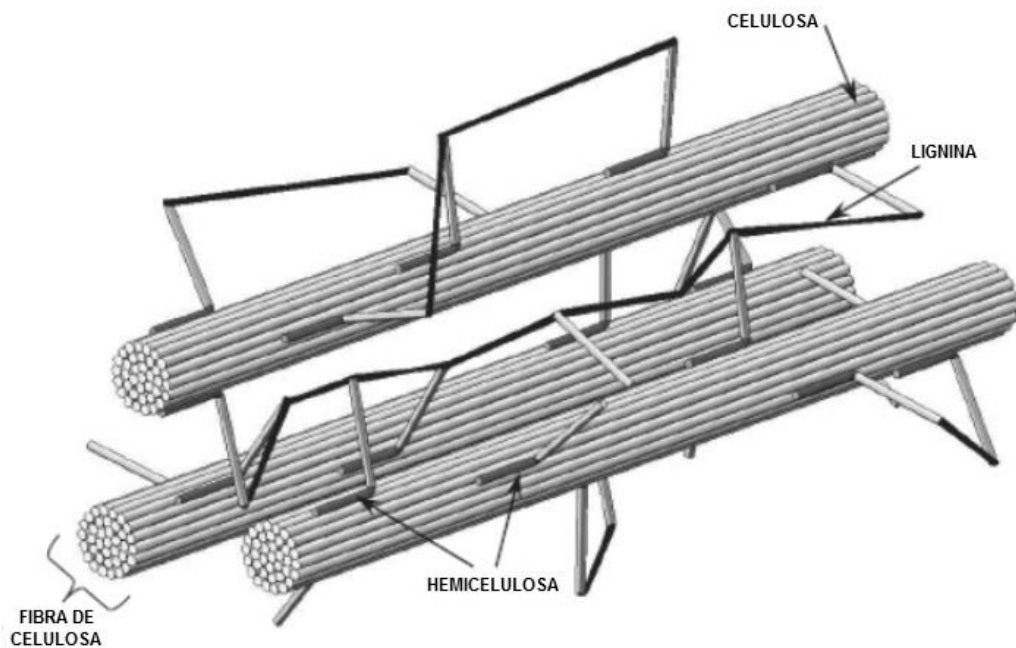


Figura 3. Estructura de la biomasa lignocelulósica (Tabil, 2011).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

La celulosa es el componente principal de la pared celular de todas las células vegetales, constituye alrededor del 30-60 % (materia seca) de la biomasa (BNDES y CGEE, 2008; Taherzadeh, 2007). Se encuentra principalmente en tallos, ramas, troncos y todas las partes leñosas del cuerpo de las plantas (Tabil, 2011). Es un polisacárido orgánico completamente lineal cuya unidad básica es la D-glucosa unida por enlaces β -1,4; su dímero, glucosa-glucosa, es llamado celobiosa (Figura 4; Roncero, 2001; BNDES y CGEE, 2008). La longitud de la molécula de celulosa está determinada por el número de unidades de glucano en el polímero y es a lo que generalmente se refiere como grado de polimerización. El grado de polimerización de la celulosa depende de la fuente de donde provenga pero es estimado entre 2000 y 2700 unidades de glucano (Taherzadeh, 2007).

Su estructura (Figura 3) es fibrosa, las cadenas de glucosa se asocian en una estructura conocida como protofibrilla que a su vez se asocia con otras protofibrillas para formar las microfibrillas de celulosa. Por último, las microfibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Lynd, 2002; Martínez, 2008). La celulosa es insoluble en agua, además de rígida y difícil de romper; su hidrólisis genera glucosa, cuya fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* ya es bien conocida (Roncero, 2001; BNDES y CGEE, 2008; Tabil, 2011).

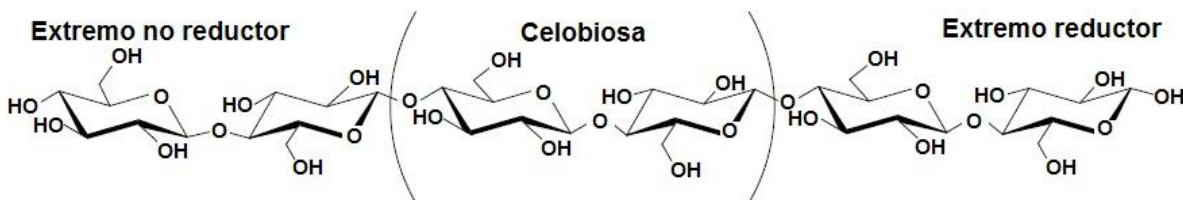


Figura 4. Estructura primaria de la celulosa.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Las moléculas de celulosa tienen una fuerte tendencia a formar enlaces por puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. La existencia de estos enlaces tiene un efecto importante en la reactividad de las cadenas celulósicas ya que permiten formar una estructura fibrilar terciaria que tiene una alta cristalinidad. Como consecuencia, la estructura se hace poco susceptible al ataque por reactivos y disolventes e incluso al ataque enzimático. Por otro lado, la celulosa tiene zonas menos cristalinas que son más accesibles y que favorecen las reacciones y el hinchamiento de la estructura, el cual se limita únicamente a la región amorfa sin cambiar la estructura cristalina (Roncero, 2001).

La fracción hemicelulósica constituye entre el 10-40 % (materia seca) y está compuesta por cadenas principales de xilosa unidas por enlaces β -1,4 (xilanos), y cadenas de glucosa y manosa unidas por enlaces β -1,4 (glucomananos) (Figura 5). Ambas cadenas tienen varias ramificaciones de manosa, glucosa, arabinosa, galactosa, ramnosa, ácido glucurónico, galacturónico, etc., unidas por enlaces α -1,2 y α -1,3 en xilanos y α -1,6 en glucomananos, también presentan grupos acetilo unidos por enlaces éster en posiciones 2 y 3 de los anillos. Estas cadenas ramificadas, proporcionan integridad estructural a la célula. En su estado natural, la hemicelulosa consiste en cadenas cortas con un grado de polimerización que no excede el número de 200 monómeros (BNDES y CGEE, 2008; Tabil, 2011; Taherzadeh, 2007; Lozanoff, 2007).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

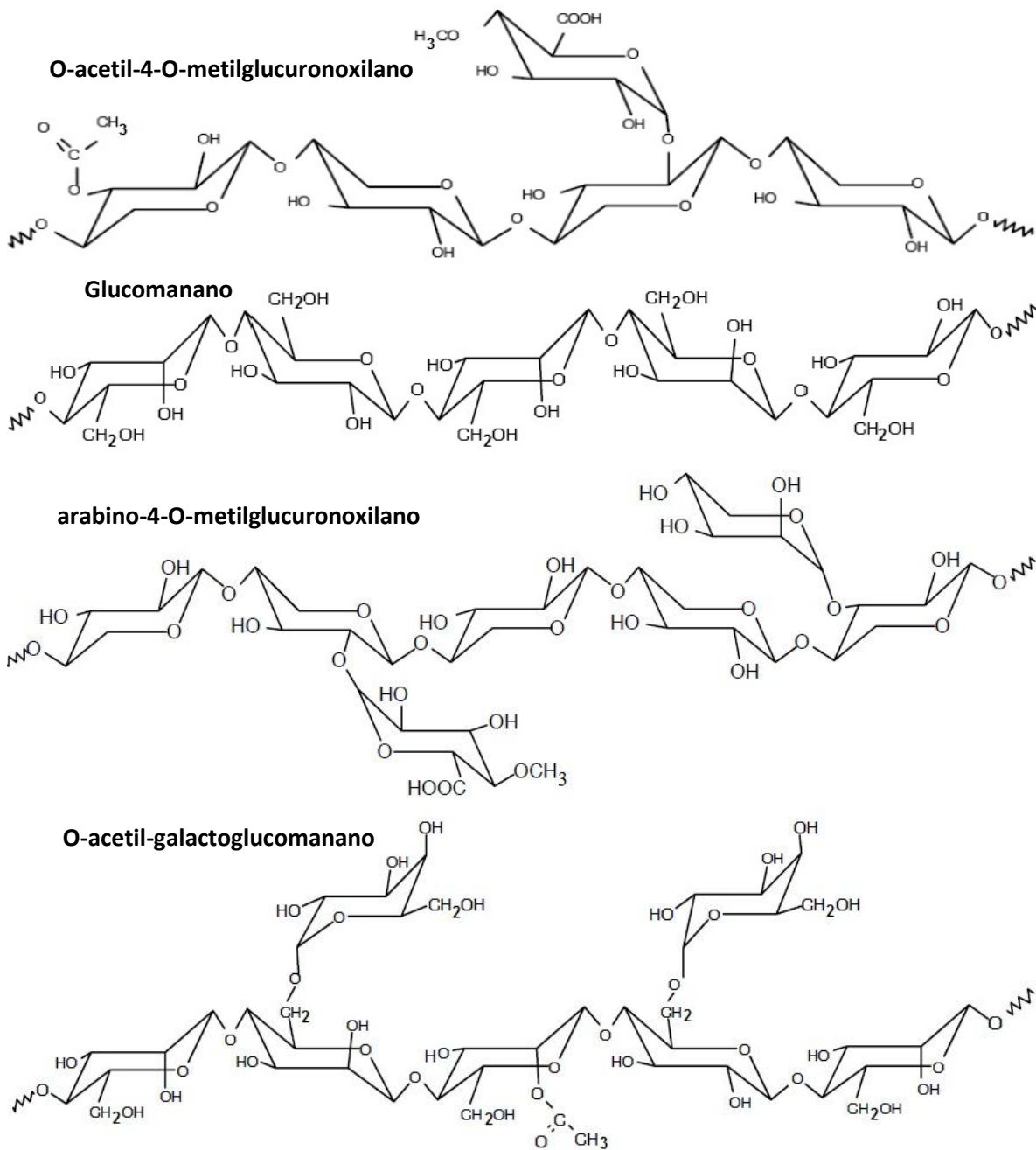


Figura 5. Estructura de las diferentes cadenas de hemicelulosa que pueden estar presentes en la biomasa lignocelulósica (Lozanoff, 2007).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Los azúcares de la hemicelulosa constituyen polímeros ramificados de estructura amorfa y fácilmente hidrolizables, los cuales nunca forman agregados, aunque pueden cocrystalizar con la celulosa (Roncero, 2001; Tabil, 2011). Puede disolverse fácilmente en soluciones alcalinas fuertes pero aunque es más fácil de hidrolizar que la celulosa, la fermentación industrial de sus azúcares de cinco carbonos (pentosas) todavía no está tan desarrollada como los procesos que involucran a la glucosa (BNDES y CGEE, 2008; Tabil, 2011). Su papel en la estructura lignocelulósica es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa (Oliva, 2003).

La lignina es un polímero complejo de grupos metoxi y fenilpropánicos, que mantiene a las células unidas en una estructura tridimensional (Figura 6). Es considerado un heteropolímero tridimensional amorfo que desde el punto de vista químico exhibe un alto grado de variabilidad estructural, dependiendo de la especie, el tejido y el tipo de célula. Los monómeros que la forman son los denominados alcoholes cinamílicos (alcohol *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico), diferenciados entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático (Tabil, 2011; Taherzadeh, 2007; Oliva, 2003; Hendriks y Zeeman, 2009).

La lignina rellena los espacios en la pared celular entre la celulosa y la hemicelulosa, está ligada covalentemente a las cadenas de hemicelulosa formando enlaces cruzados entre los polisacáridos que confieren resistencia mecánica a la pared celular, su deposición en las paredes celulares proporciona rigidez y dureza a los tejidos vegetales, a la vez que los impermeabiliza (Roncero, 2001; BNDES y CGEE, 2008; Tabil, 2011). A su vez, funciona como un aglutinante de las fibras de celulosa (Véase Figura 3; Tabil, 2011) y es extremadamente resistente a la degradación química y enzimática (Taherzadeh, 2007). La estructura bioquímica de la fracción de lignina (10-30 % materia seca) no está relacionada con moléculas simples de azúcar y desempeña un rol fundamental

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

para el éxito de la tecnología de la hidrólisis (BNDES y CGEE, 2008; Taherzadeh, 2007).

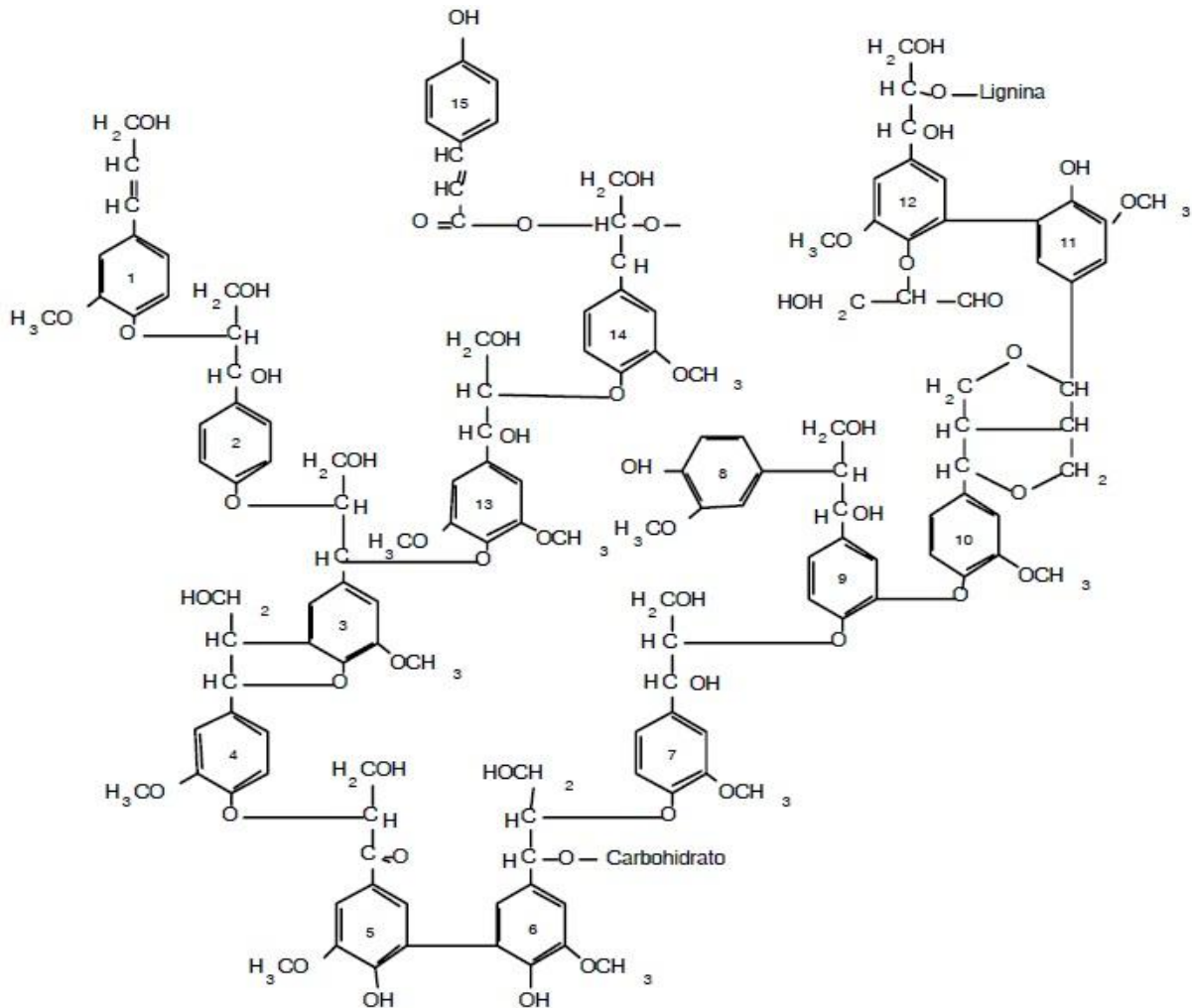


Figura 6. Estructura de la lignina.

1.5.1. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

La utilización de materias primas y cultivos con alto contenido de celulosa (lignocelulósicos) constituye una de las variantes más promisorias para la producción de biocombustibles. De los componentes de los materiales

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

lignocelulósicos, celulosa, hemicelulosa y lignina, los dos primeros son una fuente potencial de azúcares fermentables.

Existe una amplia variedad de materias primas lignocelulósicas, las cuales pueden ser agrupadas en las siguientes categorías:

- Residuos y desechos agrícolas y agroindustriales.
- Residuos forestales primarios e industriales.
- Cultivos energéticos dedicados, tales como hierbas perennes y árboles de rotación corta o crecimiento rápido.
- Partes orgánicas de desperdicios urbanos (ARPEL & IICA, 2009).

El uso de biomasa lignocelulósica para la producción de biocarburantes depende no sólo de los métodos de pretratamiento y las condiciones de un procesamiento que sea eficiente, sino también de las propiedades físicas y químicas de la biomasa (Corredor, 2009), como el contenido de lignina, la porosidad del material, la superficie disponible, etc.

Dentro de las tecnologías para la obtención de bioetanol a base de biomasa lignocelulósica, hay tres pasos principales: pretratamiento, la hidrólisis o sacarificación de los polisacáridos de la biomasa en azúcares fermentables y la fermentación (Figura 7; Corredor, 2009; BNDES y CGEE, 2008). Después de la fermentación el etanol es destilado y se obtiene con una pureza de 90-95 %, pero para utilizarlo como biocombustible y poder mezclarlo con gasolina, es necesaria una etapa de deshidratación hasta el > 99 % (Taherzadeh, 2007).

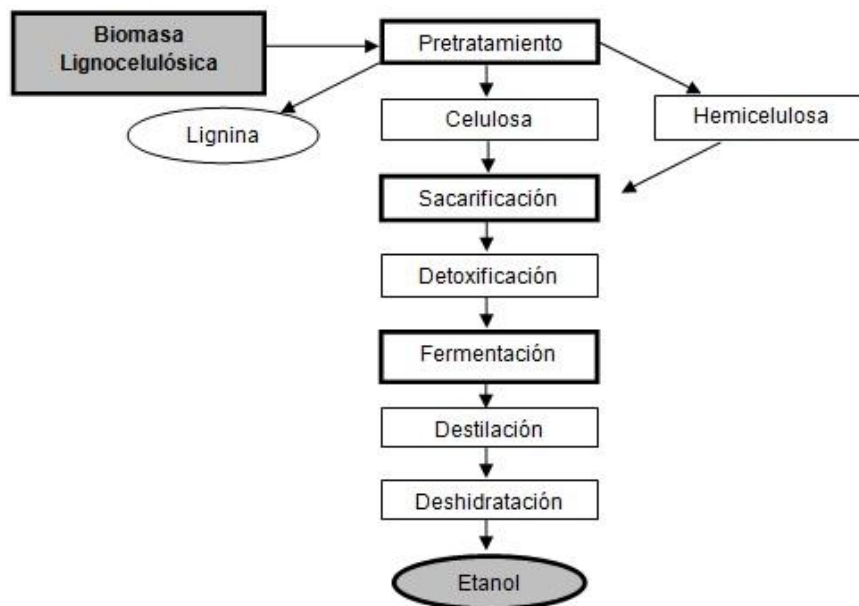


Figura 7. Producción de etanol a partir de material lignocelulósico (Singh and Nigam, 2009).

La utilización de la biomasa para la producción de bioetanol, depende de cinco factores importantes: las propiedades físicas y químicas de la biomasa, el método de pretratamiento, la eficiencia de los microorganismos utilizados en la fermentación, la integración del proceso y optimización de las condiciones de procesamiento (Corredor, 2009).

1.5.2. El sorgo dulce como fuente de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol.

El sorgo dulce es un cultivo energético muy promisorio ya que como se ha mencionado, a partir del jugo procesado de la planta fresca, se pueden obtener azúcares fermentables directamente (Sipos, 2010).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

La producción de bioetanol a partir de sorgo dulce, es atractiva para el inversionista que desea entrar exclusivamente en la producción de bioetanol y aunque se cuenta con poca experiencia en México tanto sobre el cultivo como en su procesamiento, ofrece ventajas como:

- Una productividad con rendimiento relativamente alto de etanol por hectárea, superior al obtenido a través de otros cereales y cultivos alternativos como la mandioca y puede llegar a ser superior a la de la caña.
- Capacidad para crecer en tierras más secas y en climas más calientes, lo que lo hace atractivo para el aprovechamiento de tierras ociosas, subutilizadas o empleadas en cultivos menos rentables.
- Alta resistencia a sequías o a excedentes de humedad.
- Puede ser procesado en ingenios azucareros.
- Al igual que la caña, a partir de su bagazo se pueden cubrir los requerimientos de calor y energía eléctrica de su procesamiento.
- Su bagazo también puede ser empleado como alimento para ganado, ya que tiene un valor nutricional más alto que el del bagazo de caña de azúcar, o bien, puede usarse como sustrato lignocelulósico para la producción de bioetanol (SAGARPA, 2011; ARPEL & IICA, 2009).

La producción de etanol con sorgo dulce, posee alto potencial de generación de co-productos como el bagazo, que además de ser utilizado para proveer energía para las destilerías, el mismo podría utilizarse para producir etanol celulósico cuando sea viable a escala comercial (ARPEL & IICA, 2009). Aunado a esto, como ya se mencionó, algunas características tanto físicas como químicas de la biomasa pueden favorecer el proceso. En este caso, dentro de la composición del bagazo de sorgo dulce (Tabla 3), puede considerarse el bajo contenido de lignina de algunas especies de sorgos, lo cual los hace más aptos para la producción de etanol pues su digestibilidad es más sencilla (Corredor, 2009). Por otro lado, el

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

sorgo dulce es el único cultivo que puede producir conjuntamente tallos utilizables para producir etanol y granos para alimentación humana y/o animal que no están implicados en el proceso de producción del biocombustible (ARPEL & IICA, 2009).

De acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en México se tienen hasta 18 mil hectáreas con condiciones para cultivos agrícolas que, en su caso, podrían aprovecharse para convertirse en biocombustibles. Para el caso del sorgo dulce, no se tienen registros de superficies sembradas de manera comercial, sin embargo, el potencial productivo es de hasta 2.2 millones de hectáreas. Se cultiva principalmente en el centro y sur de Sinaloa y Coahuila con buenos rendimientos bajo riego, al igual que en las regiones del Bajío. De temporal se cultiva también en Sinaloa, Chihuahua, Guerrero, Michoacán y Jalisco, y considerando hasta cinco cortes en un año, puede tener un rendimiento de 60 ton/ha en el temporal y 100 ton/ha en el riego (SENER, 2006; SENER, 2011b; SAGARPA, 2009).

Aproximadamente se obtienen 80 Kg de bagazo (materia seca) por tonelada de cultivo de sorgo dulce (Ver tabla 2; SENER, 2006) y la utilización de estos residuos en el proceso, aún es un reto. Según Sipos (2010), la utilización del bagazo para la producción de etanol incrementaría el rendimiento de etanol de una plantación de sorgo dulce hasta en un 30-40 %, lo cual resultaría en cerca de 3.5-4 toneladas de etanol por hectárea o 4400-5000 L/ha, con la conversión del jugo y el bagazo a etanol.

Tabla 3. Composición del bagazo de sorgo dulce (Sipos, 2009).

Componente	Composición del bagazo (%)
Celulosa	30-35
Hemicelulosa	25-30
Lignina	15-20
Cenizas (otros)	3-5

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

En la figura 8, se muestra una representación esquemática del proceso de obtención de etanol a partir de la caña de sorgo dulce, considerando tanto el jugo como el bagazo de ésta, además se utiliza la fracción líquida del pretratamiento para la fermentación de pentosas, la cual es ventajosa para la producción de etanol (Sipos, 2009).

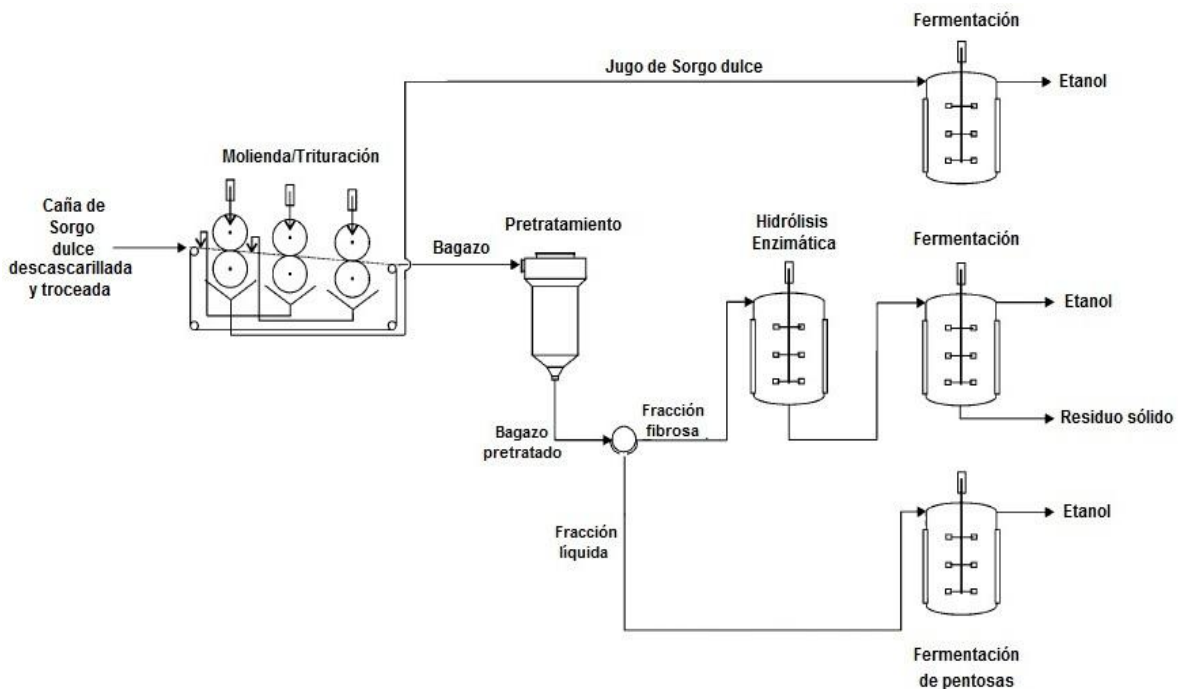


Figura 8. Diagrama esquemático de la utilización de sorgo dulce para la producción de etanol (Sipos, 2009).

Por tratarse de un producto de muy baja demanda en el mercado alimenticio, su utilización para la producción de etanol no tendría impacto significativo en los precios de los alimentos y en la seguridad alimenticia (ARPEL & IICA, 2009).

1.6. PRETRATAMIENTO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

La composición y la estructura de la biomasa tienen fuerte influencia en la naturaleza y en los rendimientos de los procesos de hidrólisis y fermentación. Gran parte de la investigación deberá estar concentrada con exclusividad en la modificación de la estructura vegetal para aumentar los rendimientos del proceso de hidrólisis, ya que la hidrólisis sólo es eficiente, de hecho, tras alguna separación de las fracciones de la biomasa (BNDES y CGEE, 2008).

Las características naturales de la biomasa lignocelulósica pueden modificarse atacando la matriz de celulosa-hemicelulosa-lignina mediante la aplicación de un pretratamiento (Tabil, 2011). Un pretratamiento ideal debería ser efectivo, es decir, permitir la obtención de altos rendimientos de azúcares fermentables en corto tiempo y con baja concentración del agente de sacarificación; sencillo, evitando una gran cantidad de etapas del proceso; barato, requiriendo bajo capital en equipo, energía y reactivos químicos y también debería poder aplicarse sin problemas en altas cantidades de biomasa. Además, es deseable que requiera un consumo mínimo de agua y que no genere inhibidores para las siguientes etapas del proceso (hidrólisis y fermentación). La mayoría de los pretratamientos actuales no cumplen con una o más de las características anteriores (Banerjee, 2011).

El objetivo fundamental de un pretratamiento está encaminado a reducir el estado cristalino de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina, remover lignina y hemicelulosa (Figura 9), aumentar el área superficial del material, incrementar la porosidad del material y disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrólisis (Sun y Cheng, 2002; Lozanoff, 2007).

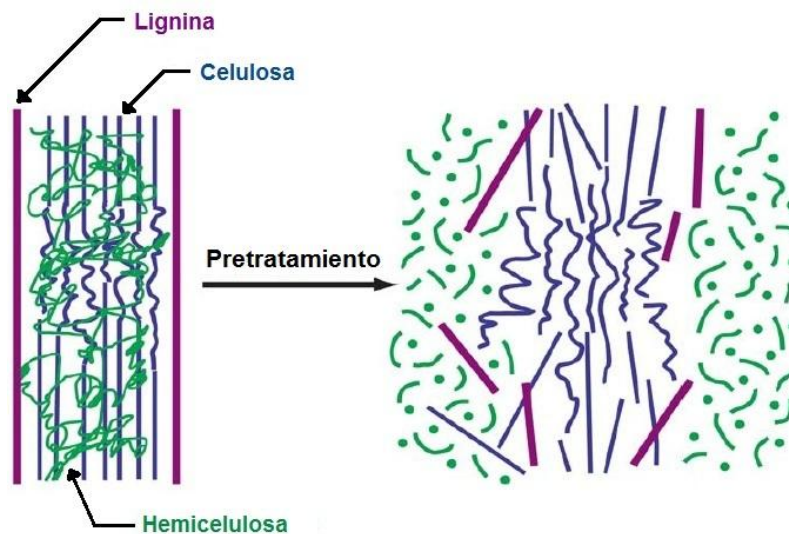


Figura 9. Cambio estructural de la biomasa lignocelulósica después del pretratamiento (McCutchen, 2006).

Para ésta etapa hay diversos tipos de procesos, con diferentes rendimientos y efectos distintos sobre la biomasa y consecuente impacto en la hidrólisis y fermentación. Por su naturaleza, pueden dividirse en físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos (Sun y Cheng, 2002; Lozanoff, 2007).

1.6.1. Pretratamientos Físicos (Mecánico)

En general, la primera etapa del proceso de transformación de la biomasa lignocelulósica en bioetanol consiste en el pretratamiento mecánico de la materia prima mediante una combinación de astillado y molienda (molino de bolas, martillos, cuchillas, rodillos). Éste proceso busca la limpieza y la “ruptura” del material, con el objetivo de causar la destrucción de su estructura celular y hacerlo más accesible a los tratamientos químicos o biológicos posteriores (BNDES y CGEE, 2008). Éste pretratamiento reduce el estado cristalino de la celulosa, el

tamaño de partícula y aumenta la superficie de contacto (Tabil, 2011), facilitando la hidrólisis posterior (Lozanoff, 2007).

El pretratamiento mecánico puede tener un alto consumo energético dependiendo tanto del tamaño final de partícula, como del tipo de material a pretratar (Lozanoff, 2007). La etapa siguiente, consiste en la remoción de lignina y en la hidrólisis de la hemicelulosa.

1.6.2. Pretratamientos Físicoquímicos

- *Explosión de vapor*: Es uno de los pretratamientos más aplicados debido a su bajo consumo de productos químicos. La biomasa triturada se trata con vapor saturado de 160-260°C por 1-10 min, seguido de una rápida descompresión. Debido a esto, el agua dentro del sustrato se vaporiza y se expande rápidamente, desintegrando la biomasa, principalmente en las regiones más débiles (celulosa amorfa) y reduciendo el tamaño de partícula. Durante este pretratamiento también se destruyen parcialmente los enlaces lignina-carbohidratos, la hemicelulosa se hidroliza y se solubiliza en la fase acuosa, la celulosa es ligeramente despolimerizada y la lignina se funde y despolimeriza (Tabil, 2011; Lozanoff, 2007; BNDES y CGEE, 2008).

La adición de H_2SO_4 o CO_2 en la explosión de vapor, puede aumentar la eficiencia de la hidrólisis enzimática, disminuir la producción de compuestos inhibidores y promover una remoción más completa de la hemicelulosa (BNDES y CGEE, 2008).

- *Explosión de fibra de Amonio (AFEX)*: Es un proceso similar a la explosión por vapor en el que el material es impregnado con amoníaco líquido a alta temperatura (~90°C) y presión por un cierto período de tiempo (~30 min), seguido de una rápida descompresión. La cantidad de amoníaco líquido es una variable significativa, comúnmente se utiliza 1 kg de amoníaco por kg

de biomasa pretratada. Éste pretratamiento puede mejorar significativamente la sacarificación del material. La rápida expansión de los gases de amoníaco dentro del reactor presurizado, causa la hinchazón de la biomasa, rompiendo los enlaces lignina-carbohidrato, hidrolizando la hemicelulosa, los enlaces glucurónicos y provocando una parcial decristalización de la estructura de celulosa, dejándola muy accesible para el ataque enzimático.

La diferencia con respecto a otros pretratamientos como el ácido, es que el AFEX no remueve la hemicelulosa, la lignina y otras sustancias. De hecho, la composición del material sometido a pretratamiento AFEX es esencialmente la misma que la del material original y no es muy efectivo en biomazas con un alto contenido de lignina. Sin embargo, el complejo lignina-carbohidrato es destruido con efectividad, además de que durante este pretratamiento no se forman inhibidores de la fermentación y no es necesario un tamaño de partícula pequeño para aumentar su eficiencia (BNDES y CGEE, 2008; Lozanoff, 2007; Sun y Cheng, 2002; Brodeur, 2011).

- *Explosión de CO₂*: Similar a la explosión de vapor o al proceso AFEX, es muy utilizado para pretratar el material lignocelulósico. Éste pretratamiento se lleva a cabo con altas presiones y temperaturas de hasta 200°C con una duración de varios minutos. Se ha planteado la hipótesis de que durante el proceso se forma ácido carbónico el cual incrementa la tasa de hidrólisis, especialmente de la hemicelulosa (BNDES y CGEE, 2008; Sun y Cheng, 2002; Hendriks y Zeeman, 2009). Aunque los rendimientos obtenidos son relativamente bajos comparados con la explosión de vapor y el AFEX, estudios realizados con bagazo de caña (Zheng, 1998), demostraron que éste proceso es más barato que el AFEX y no origina los compuestos inhibitorios que se originan durante la explosión de vapor (Lozanoff, 2007; Oliva, 2003).

El CO₂ también puede ser aplicado como dióxido de carbono supercrítico con temperaturas críticas de 31-35°C y presiones críticas de 73-74 Bar y es considerado con excelente potencial para el pretratamiento de la biomasa (Hendriks y Zeeman, 2009; Brodeur, 2011).

1.6.3. Pretratamientos Químicos

- *Ácido diluido*: Éste método se utiliza generalmente como un pretratamiento que precede a la hidrólisis enzimática más que como un método para la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica a azúcares (Tahezadeh, 2007).

La estructura rígida del material lignocelulósico, es destruida mediante el uso de ácidos sulfúrico, clorhídrico o nítrico, diluidos (BNDES y CGEE, 2008; Brodeur, 2011), usualmente por debajo del 4 % v/v (0.1-4 % v/v), por 0-60 min. El uso de altas temperaturas (~120-160°C) es favorable para alcanzar tasas aceptables de conversión de celulosa, ya que se pueden alcanzar velocidades de reacción altas que mejoran significativamente la hidrólisis del polisacárido (Tabil, 2011; Sun y Cheng, 2002; Duarte, 2009).

Durante este pretratamiento, la lignina solubilizada podría condensarse y precipitar rápidamente debido a la acidez del medio, esto podría disminuir la digestibilidad de los hidrolizados. La solubilización de la hemicelulosa y la precipitación de la lignina solubilizada, es más pronunciada durante pretratamientos con ácidos más concentrados a comparación con los ácidos diluidos, por ello, el uso de ácidos diluidos es considerado un método más promisorio para el pretratamiento.

El pretratamiento con ácido diluido logra altos rendimientos de conversión del xilano a xilosa, lo cual favorece la economía del proceso global ya que los componentes de la hemicelulosa representan hasta un tercio del total de los carbohidratos del material lignocelulósico. Los glucomananos por el contrario, son relativamente estables al medio ácido (Sun y Cheng, 2002; Hendriks y Zeeman, 2009). Uno de los inconvenientes de éste

pretratamiento es la producción de inhibidores de la fermentación, originados por reacciones de oxidación que se llevan a cabo en medio ácido, formándose productos como el furfural, el HMF y otros productos volátiles que reducen la eficacia del pretratamiento y los procesos posteriores (Brodeur, 2011; Hendriks y Zeeman, 2009).

- *Alcalino*: Bases como hidróxidos de sodio, potasio o calcio, se han utilizado para el tratamiento previo de materiales lignocelulósicos (BNDES y CGEE, 2008; Tabil, 2011). La eficacia de estos agentes depende del contenido de lignina del material. El hidróxido de sodio ha sido más estudiado que otros agentes alcalinos. Las condiciones del pretratamiento alcalino son usualmente menos severas que las de otros pretratamientos, se puede llevar a cabo en condiciones ambientales pero se necesitarían tiempos de tratamiento mucho más largos que si se lleva a cabo a temperaturas altas. El proceso consiste en el remojo de la biomasa en soluciones alcalinas (1-1.5 % p/v) para después someterla a temperaturas de 20°C, por un período de ca. 140 h. El proceso puede variar en sus condiciones ya que el uso de una temperatura más alta (~170°C) requeriría de un tiempo más corto de pretratamiento (1 h). Es necesario un paso neutralizante para remover la lignina y los inhibidores formados (sales, ácidos fenólicos, y aldehídos) antes de la hidrólisis enzimática (Brodeur, 2011; Sun y Cheng, 2002).

Cuando la biomasa es tratada con una solución alcalina diluida, el área superficial interna del material se incrementa por hinchazón, lo cual provoca la separación de los vínculos estructurales entre lignina y carbohidratos, la alteración de la estructura de lignina y la disminución de la cristalinidad y del grado de polimerización de la celulosa. Se cree que el mecanismo de la hidrólisis alcalina está basado en la saponificación de los enlaces éster intermoleculares que unen los xilanos de la hemicelulosa y otros componentes, como la lignina.

El pretratamiento con óxido de calcio (cal) es menos costoso y ha demostrado ser eficaz. Además, la cantidad que se necesita para pretratar cierta cantidad de biomasa es menor que la que se necesita de hidróxido de sodio, lo cual reduce el costo del proceso (Tabil, 2011; Sun y Cheng, 2002; Brodeur, 2011). Varios estudios han combinado el pretratamiento alcalino con otros pretratamientos como oxidación húmeda, explosión de vapor o AFEX (Brodeur, 2011).

- *Organosolv*: Para éste pretratamiento, se usa una mezcla de disolventes orgánicos o acuosos (metanol, etanol, acetona y etilenglicol, por ejemplo) con un catalizador ácido (H_2SO_4 , HCl), por un periodo de 40-60 min, para romper los enlaces internos de la lignina y de la hemicelulosa (BNDES y CGEE, 2008). También pueden emplearse ácidos orgánicos como el ácido oxálico, acetilsalicílico y salicílico como catalizadores (Oliva, 2003). Usualmente se obtienen altos rendimientos de xilosa cuando se añaden catalizadores ácidos pero, a altas temperaturas ($\sim 185^\circ C$), la adición del catalizador es innecesaria. La reacción se lleva a cabo en un reactor a una temperatura de $150-210^\circ C$ por 40 min aprox. La remoción de los disolventes después del pretratamiento, es de suma importancia, ya que pueden actuar como inhibidores tanto de la hidrólisis enzimática como de la fermentación (Sun y Cheng, 2002; Park, 2010).
- *Básico/Oxidante*: Éste pretratamiento es reconocido por ser un poderoso agente oxidante bastante selectivo hacia la estructura de lignina (Cheng, 2008). Se realiza con un compuesto oxidante como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o ácido peracético (CH_3CO_3H), se aplica en combinación de una solución alcalina (NaOH) utilizando un pH 11.5-12.5 para mejorar la eficacia y promover la descomposición del H_2O_2 . Como consecuencia de ello, se forman radicales más reactivos como (OH^\cdot) y aniones superóxido ($O_2^\cdot^-$), los cuales son responsables de la degradación de lignina, además el medio

alcalino facilita la solubilización de la hemicelulosa. Normalmente, se realiza a temperaturas suaves, de 21-50°C y presión atmosférica (Tabil, 2011; Banerjee, 2011; Kerley, 1988; Mussatto, 2010). Puede ser aplicado a altas cantidades de biomasa, aproximadamente 40 % de sólidos y bajas concentraciones de H₂O₂ (menos de 1 % v/v; Banerjee, 2011; Hendriks y Zeeman, 2009).

Durante este pretratamiento aumenta la capacidad de absorción de agua del material y disminuye hasta un 50 % la concentración de lignina de la pared celular, como resultado, se reduce la cristalinidad de la celulosa aumentando así la susceptibilidad al ataque químico y enzimático (Kerley, 1988; Sun y Cheng, 2002).

- *Ozonólisis*: El pretratamiento con ozono se utiliza para degradar la lignina y hemicelulosa de diversos materiales lignocelulósicos ya que su acción está esencialmente limitada a la remoción de estos dos componentes. El ozono es un poderoso agente oxidante, soluble en agua y fácilmente disponible. Entre las ventajas del proceso están que se lleva a cabo a temperatura y presión ambientales y remueve la lignina sin producir ningún tipo de residuos tóxicos que inhiban la fermentación. Con éste pretratamiento, la hemicelulosa es ligeramente afectada pero no se observa prácticamente ningún cambio en la estructura de la celulosa. El ozono tiene alta reactividad con compuestos que contienen dobles enlaces conjugados en su estructura, por ello, el compuesto más factible a ser oxidado durante la ozonólisis es la lignina, debido a su alto contenido de enlaces C=C. El ozono ataca la lignina liberando compuestos de menor peso molecular, principalmente ácidos orgánicos como el fórmico y el acético los cuales pueden traer como resultado una caída del pH desde ~7 hasta 2. Por esta razón, el proceso puede llevarse a cabo en un medio tamponado de pH=7.

La principal limitación de la ozonólisis, es la utilización de grandes cantidades de ozono lo que provoca que sea un proceso caro (Sun y Cheng, 2002; Vidal y Molinier, 1988; Tabil, 2011; García-Cubero, 2009).

- *Agua caliente líquida:* El tratamiento con agua caliente líquida consiste en someter la biomasa a la acción del agua caliente a una temperatura de ~220°C durante un tiempo determinado, aproximadamente de 30 min. El reactor en el que se lleva a cabo dicho pretratamiento debe estar presurizado (presiones superiores al punto de saturación) para mantener el agua en estado líquido. El objetivo del pretratamiento es principalmente solubilizar la hemicelulosa para dejar más accesible la celulosa y evitar la formación de inhibidores de la fermentación. Durante este pretratamiento se recuperan la mayoría de pentosanos y se obtiene un hidrolizado libre de compuestos inhibitorios de la fermentación (Lozanoff, 2007; Oliva, 2003; Hendriks y Zeeman, 2009; BNDES y CGEE, 2008). Éste pretratamiento tiene la gran ventaja de que los productos solubilizados de hemicelulosa y la lignina, están presentes en bajas concentraciones en comparación con otros pretratamientos, esto reduce el riesgo de formación de compuestos inhibitorios (Hendriks y Zeeman, 2009).
- *Oxidación húmeda:* Éste pretratamiento utiliza oxígeno como un oxidante de compuestos disueltos en agua. Ocurren dos reacciones durante el proceso, la primera es una reacción de hidrólisis a baja temperatura y la segunda es una reacción de oxidación a altas temperaturas. El proceso consiste en añadir agua a la biomasa molida en una proporción de 1L/6g de biomasa, usualmente se añade Na_2CO_3 a la mezcla, para evitar la formación de co-productos; después se bombea aire hasta alcanzar una presión de 12 bar. El proceso se realiza a una temperatura de 195°C por 10-20 min.

La oxidación húmeda es un pretratamiento efectivo en la remoción de lignina y la solubilización de hemicelulosa. Incluso, algunos materiales lignocelulósicos difíciles de pretratar han mostrado una conversión de celulosa del 50 %, comparado con el 25 % obtenido con el pretratamiento ácido. Durante la oxidación húmeda la lignina es descompuesta hasta dióxido de carbono, agua y ácidos carboxílicos, lo que permite removerla del 50 % al 70 % dependiendo del tipo de biomasa pretratada y de las condiciones utilizadas. No obstante, una de las desventajas del proceso es que la cantidad de productos indeseados formados, es mayor que en otros pretratamientos por oxidación, como la explosión por vapor. Éste pretratamiento también puede combinarse con otros (alcalino, explosión de vapor, etc.) para incrementar el rendimiento de azúcares después de la hidrólisis enzimática (Brodeur, 2011).

1.6.4. Pretratamientos Biológicos

El pretratamiento biológico utilizando hongos para solubilizar la lignina es un proceso que no requiere de alta energía (BNDES y CGEE, 2008; Tabil, 2011). Son seguros y ambientalmente amigables; sin embargo, la velocidad de reacción de hidrólisis es muy lenta y requiere de mejoras para ser comercialmente aplicable.

Entre los microorganismos utilizados para el pretratamiento biológico pueden emplearse hongos xilófagos que son los que producen la pudrición de la madera, las categorías que se utilizan son hongos de pudrición blanca, café o blanda. Estos hongos degradan la celulosa, hemicelulosa y lignina selectivamente, sustrayendo ésta última de entre las células (Tabil, 2011; Luley, 2006; Gilbertson & Ryvarden, 1986; Popoff, 2008).

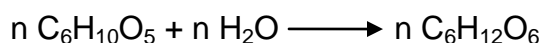
Los hongos de podredumbre blanca parecen ser los más eficaces (Tabil, 2011), tienen un sistema de enzimas celulasa y lignasa (lacasa, peroxidasa) que les permite degradar los componentes de las paredes celulares, remueven la lignina

antes o al mismo tiempo que remueven la celulosa. Los hongos de podredumbre café, marrón o castaña, remueven selectivamente la hemicelulosa y también atacan la estructura de celulosa (Gilbertson & Ryvardeen, 1986; Popoff, 2008; Luley, 2006). Por otro lado, los hongos de podredumbre blanda degradan preferentemente la celulosa de las paredes celulares formando cavidades microscópicas (Luley, 2006). El pretratamiento biológico generalmente se utiliza en combinación con otros procesos (BNDES y CGEE, 2008).

1.7. HIDRÓLISIS DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Los polisacáridos del material lignocelulósico necesitan ser convertidos a azúcares simples antes de la fermentación mediante el proceso llamado hidrólisis o sacarificación (Taherzadeh, 2007). Para la hidrólisis de los polisacáridos en azúcares fermentables, se utilizan tecnologías complejas y multifásicas, en base al uso de vías ácidas y/o enzimáticas para la separación de azúcares y la remoción de la lignina (BNDES y CGEE, 2008).

En la etapa de hidrólisis propiamente dicha, la celulosa se convierte en glucosa, catalizada por ácido o enzimas (celulasa, entre otras), según la siguiente expresión:



La hidrólisis ácida ocurre en dos etapas, para aprovechar las diferencias entre las hemicelulosas y la celulosa. La primera implica esencialmente, la hidrólisis de la hemicelulosa, utilizando altas concentraciones de ácido (30-70 % v/v) a bajas temperaturas (~40°C) y en la segunda etapa, se aplican temperaturas más altas

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

(188-234°C) y ácido diluido (~0.5 % v/v), buscando optimizar la hidrólisis de la fracción celulósica (BNDES y CGEE, 2008; Taherzadeh, 2007).

En el proceso enzimático, la hidrólisis se cataliza por enzimas llamadas de modo genérico celulasas. En realidad, se trata de un complejo enzimático compuesto por tres actividades enzimáticas que actúan sinérgicamente para degradar la celulosa (Figura 10): Endoglucanasas, que atacan al azar las cadenas de celulosa en el interior del polímero, hidrolizando enlaces β -1,4 para producir polisacáridos de menor longitud con nuevos extremos no reductores, actúa sobre celulosa amorfa pero no sobre cristalina ni sobre celobiosa. Las Exoglucanasas por su parte y entre las que se encuentra la celobiohidrolasa, atacan a las terminales no reductoras de estas cadenas más cortas y retiran celobiosa, tiene actividad sobre celulosa cristalina y amorfa pero no actúa sobre celobiosa. La glucohidrolasa es otra exoglucanasa que se encuentra en menor proporción y actúa sobre los extremos no reductores liberando unidades de glucosa, tiene actividad sobre celulosa amorfa. Por último, las β -glucosidasas, que hidrolizan la celobiosa y otros oligosacáridos pequeños a glucosa, es absolutamente necesaria para evitar la inhibición de las endo y exoglucanasas debido a la celobiosa, si ésta se acumulara en el medio de reacción. Las plantas superiores, algunos invertebrados y principalmente microorganismos (hongos y bacterias), son productores de este tipo de enzimas. Las celulasas de origen fúngico, principalmente de los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium* han sido las más estudiadas por la capacidad de estos microorganismos de producirlas en grandes cantidades y de forma extracelular, facilitando su separación en los medios de cultivo (BNDES y CGEE, 2008; Lozanoff, 2007; Thompson, 1989).

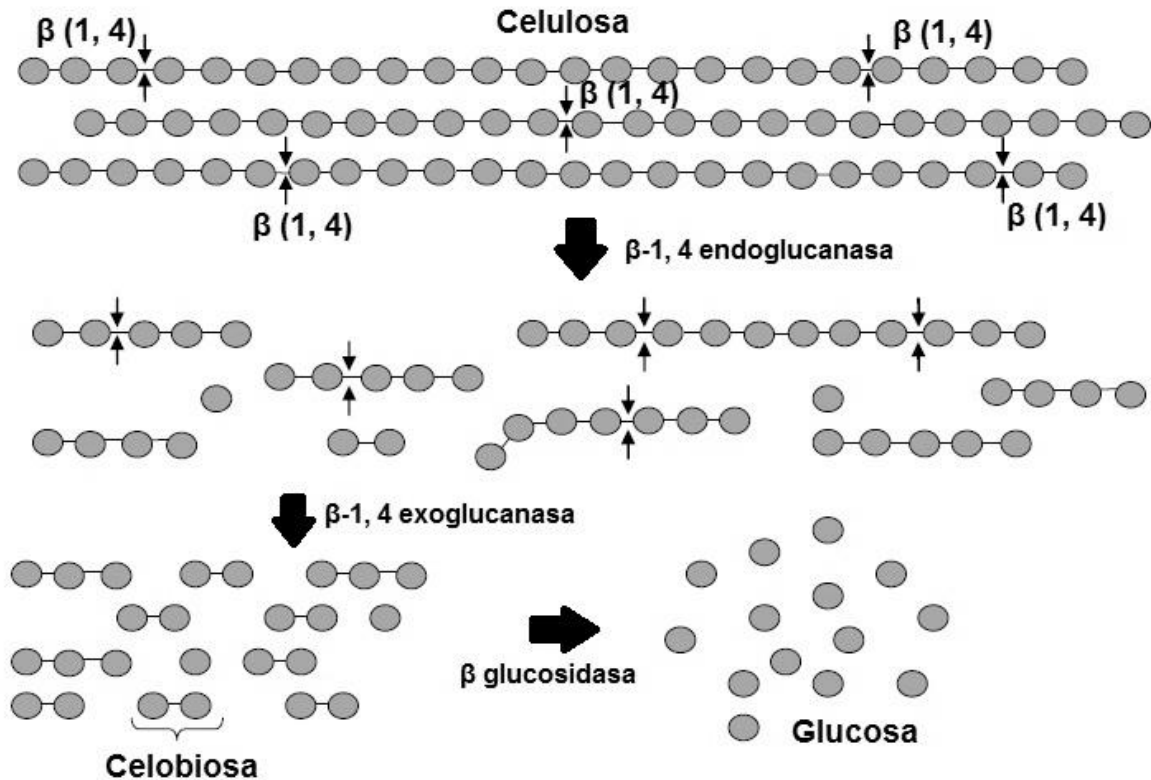


Figura 10. Esquema de la hidrólisis enzimática de la celulosa (Mussatto, 2010).

Una de las primeras etapas de la hidrólisis enzimática de la celulosa, es la adsorción de la celulosa sobre el sustrato, dicha adsorción, depende de diversos factores como la concentración de enzima, la superficie disponible de sustrato así como su naturaleza, las propiedades físicas de las enzimas presentes y las condiciones a las cuales se lleva a cabo el proceso de hidrólisis. Diversas investigaciones (Thompson, 1989; Kim, 1988; Marsden, 1986; Bisaria, 1978) han mostrado que se obtiene la máxima adsorción cuando el medio tiene un pH de 4.80 y una temperatura de 50°C, utilizando sustratos lignocelulósicos.

Al igual que en los procesos ácidos, se necesita un pretratamiento para exponer la celulosa al ataque de las enzimas. Como el proceso enzimático se desarrolla en condiciones de pH 4.80 y temperatura entre 45 y 50°C, el costo de procesamiento

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

de los insumos es relativamente bajo (Sun y Cheng, 2002; BNDES y CGEE, 2008) y además de permitir mayores rendimientos, puede posibilitar la fermentación simultánea a la sacarificación y presentar bajo costo de mantenimiento pues no provoca problemas de corrosión. Debido a su gran potencial de evolución y reducción de costos, muchos especialistas ven en la hidrólisis enzimática la clave para la producción de bioetanol a un costo competitivo a largo plazo (BNDES y CGEE, 2008).

Diversas características de los sustratos lignocelulósicos pueden limitar la velocidad y el grado de hidrólisis de la celulosa. En el caso de la hidrólisis enzimática, la eficacia de las interacciones enzima-sustrato está influenciada por diversas propiedades fisicoquímicas del sustrato como la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, el contenido de lignina y la distribución de ésta, así como el tamaño de poro, la superficie disponible y el grado de hinchazón del material. También influyen factores relacionados con la enzima, como qué tan estrecha es la unión de la enzima con el sustrato y la pérdida gradual de la actividad enzimática durante el curso de la reacción. Todos estos factores influyen en la velocidad y el alcance de la reacción de hidrólisis de la celulosa (Qin, 2010).

Durante la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica se obtiene glucosa proveniente de la celulosa y diversas pentosas y hexosas provenientes de la hemicelulosa. Pero durante el proceso ácido pueden formarse varios subproductos indeseables debido a reacciones de oxidación que sufren los azúcares en medio ácido (Figura 11). Estos subproductos no sólo reducen el rendimiento de azúcares fermentables sino que actúan como inhibidores de la fermentación, afectando también el rendimiento de etanol. Si el hidrolizado formado es altamente tóxico, es necesaria una etapa de detoxificación antes de la fermentación (Tahezadeh, 2007). Dicha etapa de detoxificación puede llevarse a cabo mediante métodos biológicos, que consisten en utilizar microorganismos capaces de metabolizar algunos de los compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados, como es el caso de *Trichoderma reesei*, que no se ve afectado por derivados como el ácido acético o

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

furfural. También se pueden usar métodos químicos y físicos, como tratamientos con hidróxidos, evaporación, carbón activado, carbón vegetal, hasta resinas de intercambio iónico, entre otros; para precipitar, volatilizar, absorber, y/o separar selectivamente los derivados sin afectar el rendimiento de azúcares (Oliva, 2003).

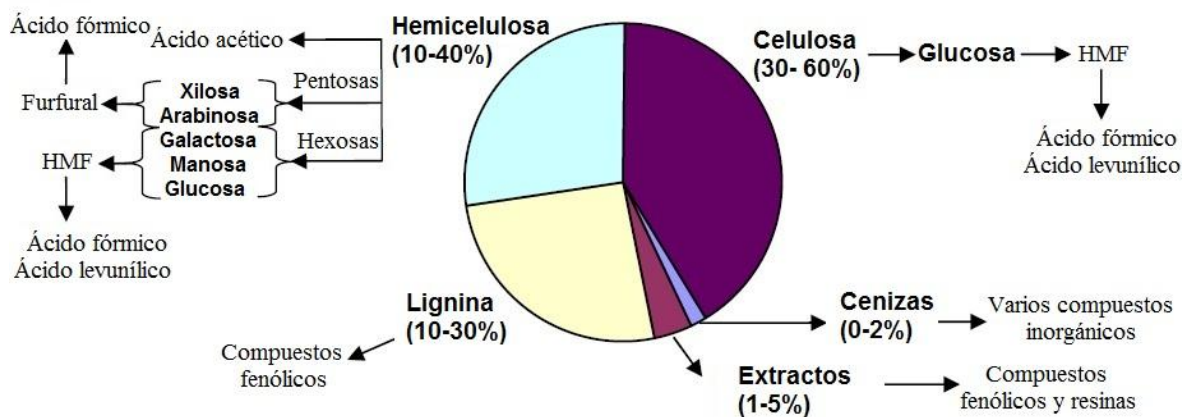


Figura 11. Composición del material lignocelulósico y los productos potenciales de su hidrólisis (Taherzadeh, 2007).

1.8. FERMENTACIÓN

Independientemente del método de hidrólisis, la fermentación de los azúcares del hidrolizado a bioetanol sigue, básicamente, los mismos principios observados para el caso de la producción en base al almidón o a los azúcares (BNDES y CGEE, 2008).

Aunque un gran número de levaduras, bacterias y hongos filamentosos pueden producir etanol como producto principal de la fermentación, ninguno de estos microorganismos cumple todos los requisitos al 100 % para la producción de etanol a partir de hidrolizados de material lignocelulósico (Taherzadeh, 2007).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Saccharomyces cerevisiae es la levadura más usada comercialmente para la producción de etanol. La fermentación de los hidrolizados lignocelulósicos es más difícil que la de los jugos provenientes de caña de azúcar o granos, ya que en el caso de la hidrólisis del material lignocelulósico, gran parte del hidrolizado se compone por azúcares de cinco carbonos (xilosa) los cuales no pueden ser fermentados por clases silvestres de *S. cerevisiae*. Hasta el momento, la mayoría de los procesos descartan esta fracción de los azúcares o realizan la fermentación en dos etapas, comprometiendo bastante su viabilidad económica (BNDES y CGEE, 2008; Taherzadeh, 2007). Para el futuro, la tendencia es que estas dos etapas se puedan llevar a cabo de manera simultánea, lo cual requeriría de microorganismos capaces de fermentar ambos tipos de azúcares con alto rendimiento (BNDES y CGEE, 2008).

Levaduras de las especies *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces* y *Pachysolen*; hongos de las especies *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Monilia*, y *Paecilomyces*; y bacterias de las especies *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Thermoanaerobacter* y *Erwinia* han sido identificados como microorganismos que producen etanol a partir de xilosa. Otra opción ha sido los intentos de modificar genéticamente a *S. cerevisiae* y otros microorganismos para que produzcan etanol a partir tanto de glucosa como de xilosa (Taherzadeh, 2007; Karimi, 2005; Millati, 2005).

Otro de los factores que hay que considerar en el proceso de fermentación son los inhibidores presentes en el hidrolizado (ácidos, furanos, compuestos fenólicos, etc.), los cuales deben ser removidos en caso de alta concentración, o requieren la utilización de estirpes robustas de microorganismos resistentes (BNDES y CGEE, 2008).

En general, los ácidos carboxílicos no disociados pueden difundirse a través de la membrana celular en donde se disocian y disminuyen el pH interno de la célula. El furfural, por su parte, se ha identificado como un inhibidor de la actividad *in vitro* de varias enzimas importantes en el catabolismo de carbono primario, tales como

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

hexoquinasa, aldolasa, fosfofructoquinasa, trifosfato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa. De estas enzimas, las dos últimas parecen ser las más sensibles, sin embargo, la inhibición de ciertas enzimas no glucolíticas, como la piruvato deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, es más grave. No obstante, las levaduras transforman el furfural en compuestos menos inhibidores como alcohol furfurílico y ácido furóico.

El HMF no es tan tóxico para *S. cerevisiae* como el furfural, pero su efecto inhibitorio es mucho más duradero debido a que las levaduras no lo convierten en compuestos menos inhibitorios tan rápido como convierten el furfural. Algunos compuestos fenólicos y aromáticos también presentan efectos inhibitorios, por ejemplo el hidroximetoxibenzaldehído, el cual es altamente inhibitorio dependiendo de la posición de sus sustituyentes. De los compuestos fenólicos, aquellos que están menos sustituidos, son probablemente las sustancias más inhibitorias en los hidrolizados (Larsson, 2000; Taherzadeh, 2007). Lo que podría reducir substancialmente los problemas de inhibición, sería que el proceso de sacarificación y fermentación fueran simultáneos (BNDES y CGEE, 2008).

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los factores temperatura, tiempo de reacción y relación enzima/biomasa en la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo dulce, evaluando dicho proceso mediante un diseño factorial completo 2^k . Evaluar el efecto de diferentes pretratamientos del bagazo de sorgo dulce en su subsecuente sacarificación enzimática.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la cantidad de azúcares obtenidos a partir del bagazo de sorgo dulce sin pretratamiento. Identificarlos y determinar su concentración en los hidrolizados mediante HPLC.

Establecer las condiciones de 5 diferentes pretratamientos (Básico-Oxidante, Ácido diluido, Básico con NaOH, Básico con CaO y Ozonólisis) y evaluar su eficacia, mediante la determinación de lignina soluble, en base a su repercusión en la obtención de azúcares fermentables.

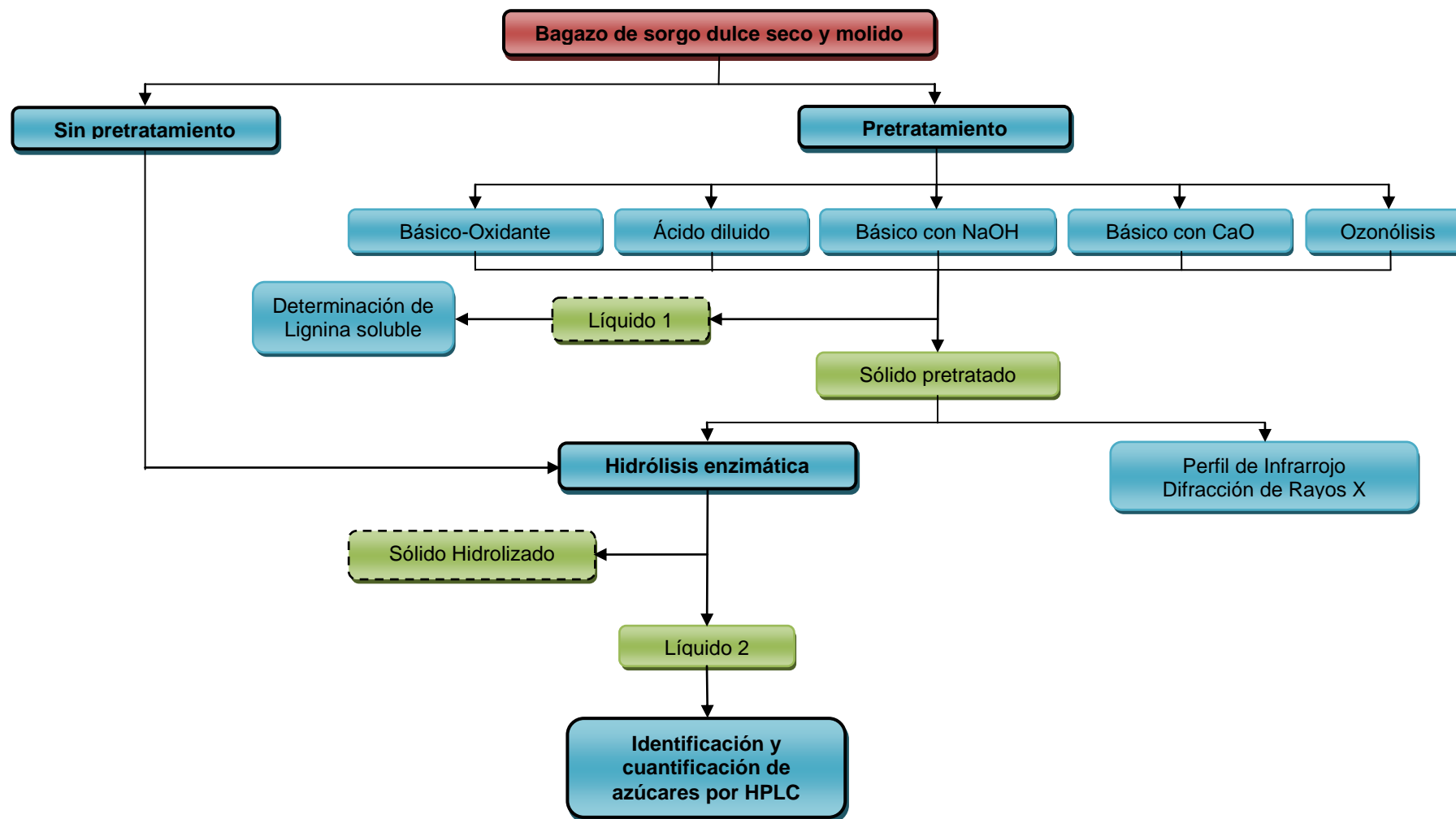
Analizar el efecto de los pretratamientos utilizados sobre la estructura lignocelulósica del bagazo de sorgo dulce mediante Espectrofotometría de Infrarrojo y Difracción de rayos X.

Establecer el pretratamiento más adecuado para la materia prima utilizada y que junto con las mejores condiciones de hidrólisis enzimática, resulten en la mayor cantidad de azúcares fermentables.

2.3. HIPÓTESIS

El pretratamiento fisicoquímico del material lignocelulósico permitirá aumentar la accesibilidad a las fibras de celulosa y hemicelulosa mediante la solubilización de lignina, facilitando así la hidrólisis y permitiendo un aumento de la sacarificación con respecto al bagazo de sorgo sin pretratamiento.

3.1. DIAGRAMA GENERAL



3.2. REACTIVOS Y EQUIPO

Equipo y materiales

- Papel Filtro WHATMAN No.1
- Mortero de porcelana
- Termobalanza marca OHAUS modelo MB45
- Horno de Convección marca FELISA modelo FE02292A
- Balanza Analítica marca DENVER INSTRUMENTS modelo P1-114
- Balanza Granataria marca SCIENTECH modelo SG 5000
- Evaporador (baño de temperatura con agitación) marca BÜCHI modelo Syncore P-101
- Parrilla de Calentamiento marca CORNING modelo PC-620
- Jeringas de Vidrio para Filtración marca MICRO-MATE
- Filtros de nylon para Jeringas marcas TECROM y OSMONICS modelos PTFE 25MM y Cameo 17F, de 0.22 y 0.45 μ
- Autoclave marca YAMATO modelo SE510
- Microcentrífuga marca LAB-NET modelo 2233-M2 Hermle
- Centrifugadora marca EPPENDORF modelo 5810-R
- Ultracongelador marca REVCO TECHNOLOGIES modelo ULT1340-5-A35
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC) marca HEWLETT-PACKARD modelo 1100 con Detector Evaporativo de Dispersión de Luz marca AGILENT TECHNOLOGIES modelo 1260 ELDS
- Columna de HPLC PinnacleTM II Amino Columns marca RESTEK. Tamaño de partícula 5 μ m, esférica. Tamaño del poro 110Å. Rango de pH: 2.5 a 7.5. Límite de Temperatura: 80°C.
- Espectrofotómetro Uv-Vis marca THERMO SPECTRONIC modelo HELIOS

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS

- Espectrofotómetro Infrarrojo marca NICOLET modelo NEXUS 40 FT-IR
- Agitador marca FISHER VORTEX modelo G560
- Micropipetas Automáticas marca EPPENDORF de 10, 100 y 1000 μ L
- Potenciómetro marca OAKTON modelo SR-232
- Ozonificador marca PEAK modelo CM-1 O₃ SYSTEM
- Fluviómetro de Gas Universal marca AGILENT TECHNOLOGIES modelo ADM 1000 (máx. 1000mL/min)
- Difractómetro de Rayos X marca BRUKER AXS modelo D8 Discover
- Termómetro de mercurio marca TAYLOR
- Columna de vidrio marca Spectra/Chrom®
- Burbujeadores de vidrio marca KIMAX

Reactivos

- Coctel Enzimático E7
- Buffer de Citratos pH 4.80
- Glucosa, Manosa, Xilosa, Celobiosa, Maltosa, Fructosa, Sacarosa, SIGMA-ALDRICH
- Ácido sulfúrico al 96%, reactivo ACS
- Oxalato de sodio, reactivo analítico, TECSIQUIM
- Tiosulfato de sodio pentahidratado, reactivo ACS, ALDRICH
- Almidón soluble, RIEDEL
- Permanganato de potasio cristal, J.T Baker
- Hidróxido de sodio perlas, J.T. Baker
- Yoduro de potasio, Ferm-nt
- Alanina, ALDRICH
- Reactivo DNS
- Peróxido de hidrógeno, Ferm-nt
- Cal (CaO)
- Buffer de Fosfatos pH 7.10

- Carbonato de sodio, ALDRICH
- Bromuro de potasio, ALDRICH
- Acetonitrilo de alta pureza para HPLC, Ferm-nt

3.3. METODOLOGÍA DESCRIPTIVA

3.3.1. OBTENCIÓN DEL BAGAZO DE SORGO DULCE

Se utilizó Sorgo dulce proporcionado por el INIFAP, del campo experimental ubicado en la carretera Celaya-San Miguel de Allende, Km. 6.5, Celaya, Guanajuato, México.

En un tratamiento previo a la realización del presente trabajo experimental, se separó el bagazo de la cáscara (Figura 12) y se cortó en pedazos pequeños. Posteriormente, se determinó el contenido de humedad con ayuda de una termobalanza. Se obtuvo un promedio de 78.03 % de humedad. El bagazo de sorgo se secó en un horno de secado a 40°C durante 48 horas y se sometió a una molienda.



Figura 12. Caña de sorgo dulce.

Se pesó 100 g de este material y se lavaron con 250 mL de agua destilada con la finalidad de extraer los carbohidratos solubles presentes. La dispersión se centrifugó por 10 min a 12000 rpm y 20°C, finalmente se filtró al vacío para separar totalmente el sólido del jugo.

El sólido (bagazo) obtenido se secó nuevamente en el horno de secado a 40°C durante 48 horas. Pasado este período, se sometió a una nueva molienda y se le determinó la humedad, que en promedio fue de 0.264 %. Posteriormente se realizó la caracterización del material lignocelulósico (Guzmán, 2012). Esta harina de bagazo de sorgo dulce fue la que se utilizó en ensayos subsecuentes para el desarrollo del trabajo experimental.

3.3.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando una preparación enzimática comercial a la cual denominaremos coctel enzimático E7, con una actividad de 185 FPU/mL (4.33 FPU/mg proteína). El coctel enzimático utilizado presenta varias actividades enzimáticas, como exoglucanasa, endoglucanasa, hemicelulasa y beta- glucosidasa, de acuerdo al fabricante.

El proceso de sacarificación de la biomasa lignocelulósica se evaluó en la harina del bagazo de sorgo dulce obtenida.

3.3.3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Con ayuda del software STATISTICA v.10, se elaboró un diseño factorial completo 2^k para realizar la optimización de la hidrólisis enzimática de la harina del bagazo de sorgo. En este diseño, cada factor se estudia a dos niveles y los tratamientos contemplan las combinaciones de cada nivel de un factor con los niveles de los

otros factores (Ferré, 2004). El diseño de experimentos de este trabajo, consta de un solo bloque con 2 niveles y 3 factores ($2^3 = 8$ tratamientos), más 3 puntos centrales que sirven para evaluar el error experimental. Así, se tienen 11 tratamientos experimentales que permitieron establecer la proporción de enzima ($\text{mL}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{bagazo}}$; X1), el tiempo de reacción (min; X2), y el contenido de sólidos (% p/v; X3) adecuado para la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo a 50°C. Las variables respuesta del diseño son la generación de celobiosa, glucosa y xilosa (% p/p). Así, se determinaron las condiciones más favorables en las cuales el coctel enzimático E7 produce la mayor cantidad de azúcares fermentables a partir del bagazo de sorgo dulce sin pretratamiento.

3.3.3.1. Dominio experimental de la hidrólisis enzimática de bagazo de sorgo dulce sin pretratamiento.

Entre las variables independientes que se consideraron para el diseño de experimentos están la temperatura y tiempo de reacción, la proporción de enzima y el porcentaje de sólidos (harina de bagazo) en el sistema de reacción. Debido a que se decidió utilizar un diseño factorial completo 2^3 para simplificar la determinación experimental, se eligieron como variables independientes las siguientes:

Proporción de enzima/bagazo ($\text{mL}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{bagazo}}$), X1

Tiempo de reacción (min), X2

Porcentaje de harina de bagazo (% p/v), X3

En cuanto a la temperatura de reacción, trabajos anteriores nos mostraron que el coctel enzimático E7 presenta una mayor actividad enzimática hasta 50°C

(Hernández, 2010; Tapia, 2010), pero se desconocía el comportamiento por arriba de dicha temperatura. Por lo tanto, se realizó una evaluación de la actividad de E7 en base al rendimiento de azúcares fermentables en un intervalo de temperatura fijado entre 40 y 60°C, para determinar si el aumento o disminución de esta variable afectaba de una manera importante el desarrollo de la hidrólisis.

Para la evaluación de la actividad del coctel enzimático E7, se llevó a cabo la hidrólisis enzimática con base en el método de *Measurement of Cellulase Activities*, el cual describe el procedimiento reconocido por la IUPAC para medir la actividad de celulasa en términos de “unidades de papel filtro” (FPU) por mililitro de enzima (Adney y Baker, 1996). Dicho procedimiento se modificó de manera conveniente para esta determinación a las diferentes temperaturas de evaluación. Se cortó y pesó una tira de papel filtro de 5 x 1 cm (ca. 44 mg), se colocó en un vial de vidrio y se agregaron 1.4 mL de buffer de citratos de pH 4.80 más 0.1 mL de E7. Se incubó en un baño a la temperatura de evaluación (40, 50 o 60°C), a 180 rpm por 1 hora. Pasado este tiempo, se inactivó la enzima colocando el vial en un baño de agua a ebullición por 5 min. Se enfrió y se filtró con ayuda de filtros para jeringas de 0.45 μ de tamaño de poro. Posteriormente se cuantificaron los azúcares reductores en la muestra por el método de DNS (pág. 55). El procedimiento anterior se realizó por duplicado para cada temperatura evaluada, se elaboraron blancos de papel filtro y del coctel enzimático que fueron sometidos al mismo tratamiento que la muestra.

La temperatura de hidrólisis en el diseño experimental se fijó en 50°C para el resto del trabajo experimental. Las variables de respuesta o dependientes, se establecieron como las concentraciones de glucosa, xilosa y celobiosa, obtenidas después de la hidrólisis y se cuantificaron mediante HPLC (pág. 56).

Los intervalos de valores para las variables independientes se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Valores reales para las variables codificadas.

<i>Variable independiente</i>	<i>Variable Codificada</i>	<i>Variable Natural o Real</i>
Proporción de Enzima (X1; mL E7/g bagazo)	-1	0.3
	0	0.6
	1	0.9
Tiempo (X2; min)	-1	40
	0	80
	1	120
Harina de bagazo de sorgo (X3; %p/v)	-1	5
	0	10
	1	15

El dominio experimental combinado para los tres factores elegidos se muestra en la figura 13. Cada círculo indica un posible experimento con los valores concretos de cada factor, sin embargo, para conocer el efecto de un factor es suficiente con hacerlo variar entre dos valores, los más adecuados son los extremos del dominio experimental (Ferré, 2004).

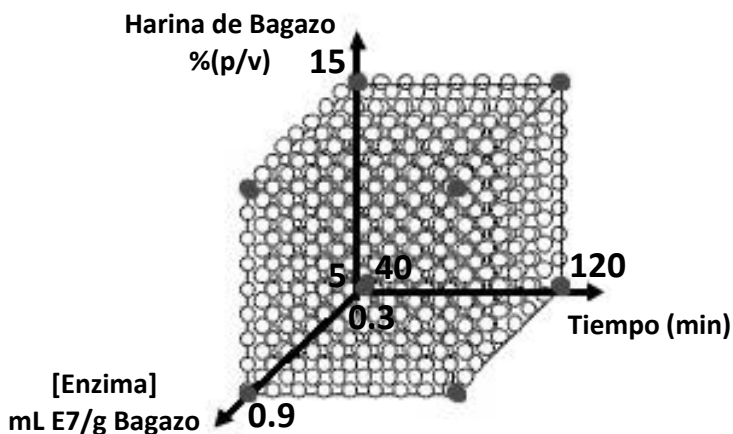


Figura 13. Dominio experimental para tres factores continuos en variables naturales. Los experimentos de los vértices son los utilizados en el diseño factorial completo 2³.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El plan de experimentación se realizó de manera aleatoria y en la siguiente tabla se muestran las condiciones de cada tratamiento de acuerdo a la combinación de la matriz experimental.

Tabla 5. Tratamientos del Diseño de Experimentos realizados a una temperatura constante de 50°C y un volumen final fijo de 2 mL.

<i>Tratamiento</i>	<i>[Enzima] (X1; mLE7/gBagazo)</i>	<i>Tiempo (X2; min)</i>	<i>Harina de bagazo (X3; %p/v)</i>
9 (C)	0.6	80	10
10 (C)	0.6	80	10
7	0.9	120	5
3	0.3	120	5
11 (C)	0.6	80	10
1	0.3	40	5
2	0.3	40	15
5	0.9	40	5
4	0.3	120	15
8	0.9	120	15
6	0.9	40	15

Cada hidrólisis se realizó pesando y colocando en un vial la cantidad necesaria de harina de bagazo para cumplir con el % de sólidos requerido en la muestra. Se agregó el volumen necesario de E7 para la reacción y buffer de citratos de pH 4.80 hasta completar un volumen final de 2 mL. La mezcla se incubó en un baño con agitación a 50°C y 180 rpm por 40, 80 o 120 min según el tratamiento realizado. Al término de la incubación, el vial se colocó en un baño de agua a ebullición por 5 min para inactivar la enzima. La mezcla se lavó con 6 mL de agua destilada, se centrifugó a 20°C y 12000 rpm por 10 min y se separó el sólido para colocarlo en horno de secado, el líquido se filtró con jeringa y filtros de nylon de 0.45 μ de poro. El análisis se realizó mediante HPLC para identificación y cuantificación de azúcares.

3.3.3.2. Método 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).

El método del DNS, se basa en la reducción del ácido 3, 5-dinitrosalicílico (de color amarillo) por el grupo aldehído que está presente en la glucosa, fructosa, maltosa u otros azúcares reductores. Ésta reacción da un producto colorido en solución alcalina, el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), cuya presencia puede detectarse colorimétricamente a una longitud de onda de 540nm (Chaplin, 1986; Iturbe, 2007).

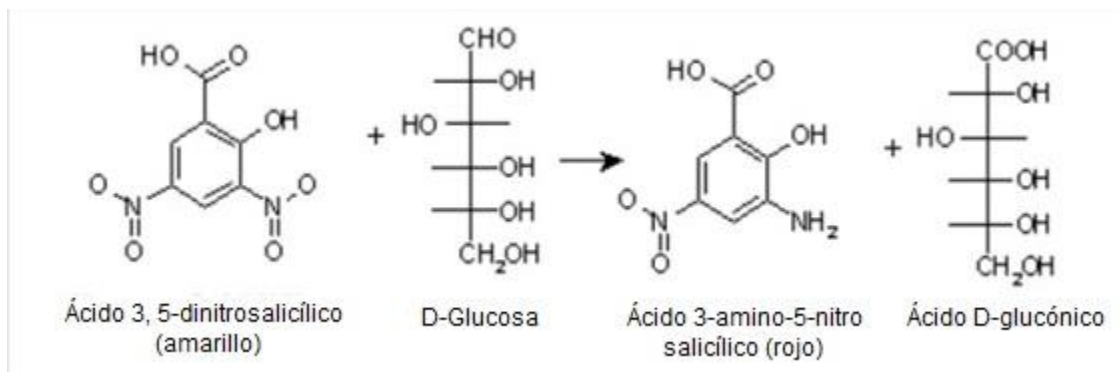


Figura 14. Reacción del Método de DNS.

La muestra obtenida de la hidrólisis enzimática se debe diluir adecuadamente para que la lectura de absorbancia esté dentro de la curva de calibración que se utilice. Una vez hecha la dilución, se tomó 1 mL para llevar a cabo la reacción y se colocó en un tubo de ensayo, se le agregó 1 mL de reactivo DNS. El tubo de ensayo se colocó en un baño de agua a ebullición por 5 min, se enfrió y diluyó con 8 mL de agua destilada, se mezcló en un agitador (vortex) y finalmente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Uv-Vis a 540 nm, frente a un blanco de reactivos.

La concentración de azúcares reductores en la muestra, se calculó por medio de la curva de calibración de glucosa utilizada (Figura 45, Anexo A). Posteriormente,

se realizó una corrección anhidra de las concentraciones ya que durante la hidrólisis, la conversión de los polisacáridos a monómeros, resulta en la adición de una molécula de agua a cada monómero. La corrección anhidra es utilizada para convertir matemáticamente, los monómeros de vuelta a polisacáridos estructurales.

Para calcular la concentración de los polímeros de azúcares a partir de la concentración de los correspondientes azúcares monoméricos, se usa la corrección anhidra de 0.88 para las pentosas (C-5) como xilosa y arabinosa, y 0.90 para las hexosas (C-6) como glucosa, galactosa y manosa (Sluiter, 2011; Sluiter, 2008).

3.3.3.3. Identificación y cuantificación de azúcares mediante HPLC.

El HPLC es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones son la sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, es ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles y por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria. Algunos ejemplos son: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y gran variedad de sustancias inorgánicas (Gomis, 2008).

La cromatografía de líquidos es importante porque la mayoría de los compuestos no son suficientemente volátiles para que se les pueda aplicar la cromatografía de gases. La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) utiliza una presión elevada para forzar al disolvente (fase móvil) a que pase por una columna que contiene partículas muy finas (fase estacionaria), consiguiendo así separaciones de gran resolución. El equipo de HPLC (Figura 59, Anexo B) consta básicamente de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra,

una columna de alta presión, un detector y un ordenador para controlar el equipo y visualizar los resultados (Harris, 2007).

Se realizó una cromatografía en fase normal, utilizando una columna con una fase estacionaria polar aminada. La fase móvil empleada fue una mezcla de acetonitrilo y agua. Se llevó a cabo una elución en gradiente (Tabla 6), con el fin de tener una elución lo suficientemente rápida de todos los componentes y una correcta separación de los compuestos. Este tipo de elución consiste en el cambio continuo de la composición del eluyente en sentido de aumento de fuerza eluyente. En una separación de fase normal, los componentes menos polares aparecen primero, debido a que relativamente son los más afines a la fase móvil. La fuerza eluyente aumenta a medida que el disolvente se hace más polar, es decir, disminuye el tiempo de retención de los compuestos (Harris, 2007; Gomis, 2008).

Durante la prueba, el analito se pasa a través de la columna con la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. Este retardo se conoce como tiempo de retención, único para cada analito y el cual depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil (Gómez y Serrano, 2006). La identificación y determinación de los analitos se realizó mediante un detector de dispersión de luz (ELSD). El efluente de la columna se pasa a un nebulizador donde se convierte en una fina niebla mediante un flujo de nitrógeno. Las finas gotitas se llevan a través de un tubo de conducción a temperatura controlada donde tiene lugar la evaporación de la fase móvil, lo que origina unas finas partículas de analito. La nube de partículas de analito pasa a través de un haz de láser. Mediante un fotodiodo de silicio se detecta la radiación dispersada perpendicularmente al flujo (Gomis, 2008). Usar HPLC con ELSD elimina la necesidad de usar bases fuertes o alto pH, convirtiéndose en un método no destructivo (Gómez y Serrano, 2006).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS

En este caso, se utilizó el método del estándar interno (EI), el cual también es conocido como calibración relativa o indirecta. Para ello, se adiciona una concentración conocida del EI a una concentración conocida de muestra y esta mezcla se inyecta al cromatógrafo. Del cromatograma se obtienen las áreas del analito y del estándar y luego con la ecuación de la curva de calibración se puede obtener la concentración del analito en la muestra (Álvarez, 2008). Se realizaron curvas de calibración de los azúcares de interés para su cuantificación y se inyectó una mezcla de diferentes azúcares (xilosa, fructosa, manosa, glucosa, sacarosa, celobiosa y maltosa) para la identificación de los tiempos de retención (Figura 43, Anexo A). Una vez determinados los tiempos de retención, se inyectaron las muestras para identificar el área de cada azúcar y cuantificar los mismos. Se realizó el análisis por HPLC utilizando alanina como estándar interno en una concentración de 300 µg/mL y con un tiempo de retención entre 14 y 16 min (Figura 44, Anexo A). Las muestras se sometieron a análisis por HPLC bajo las siguientes condiciones mostradas en la tabla 6. Se obtuvo el cromatograma correspondiente para cada muestra. Se calcularon las concentraciones de cada azúcar en las muestras con ayuda de las curvas de calibración con estándar interno para glucosa, xilosa y celobiosa (Figuras 47-49, Anexo A), y se realizó la correspondiente corrección anhidra.

Tabla 6. Condiciones del Método de HPLC utilizado en el experimento.

Parámetro	Condición
Temperatura del detector	80°C
Ganancia	7
Filtro	4
Presión	3.5 Bar
Temperatura de la columna	30°C
Flujo	1 mL/min
Tiempo de corrida	20 min
Volumen de inyección	10 µL
Fase móvil	Agua 18%, Acetonitrilo 82%
Rampa	60 min, relación de acetonitrilo final 65%

3.3.4. PRETRATAMIENTO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO Y SU HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Se eligieron cinco diferentes pretratamientos de la biomasa lignocelulósica: Básico-Oxidante, Ácido diluido, Básico con NaOH, Básico con CaO y Ozonólisis. Cada pretratamiento se llevó a cabo por duplicado y se evaluó su eficiencia mediante la cuantificación de lignina soluble y la cantidad de azúcares fermentables obtenidos después de la hidrólisis enzimática. Las condiciones de tiempo y porcentaje de sólidos encontradas en la literatura para algunos pretratamientos, se modificaron con el fin de estandarizarlos entre sí y poder comparar los resultados de una manera más práctica.

3.3.4.1. Básico-Oxidante.

El pretratamiento alcalino con peróxido de hidrógeno (alcalino-oxidativo) ha sido reconocido como un poderoso agente oxidante y es bastante selectivo hacia la estructura de la lignina (Cheng, 2008), aumenta la capacidad de retención de agua y disminuye la concentración de lignina de la pared celular. Estos cambios estructurales y de composición dan como resultado la disminución de cristalinidad de la celulosa y la eliminación de monómeros fenólicos de la matriz de la pared celular, incrementando la accesibilidad a las fibras de celulosa y haciéndolas más susceptibles a la degradación enzimática (Kerley, 1988).

Para este pretratamiento se consideraron las condiciones determinadas en un trabajo anterior por Guzmán, 2012 (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones del pretratamiento Básico-Oxidante (Guzmán, 2012).

<i>Parámetro</i>	<i>Condición</i>
Temperatura	35°C
Tiempo	26 horas
% Sólidos (%p/v)	15 %
Concentración de H ₂ O ₂ (%v/v)	9 %
pH (ajustado con NaOH 2.5M)	11.5

En un tubo de vidrio con taparosca, se colocaron 0.05 g de bagazo de sorgo dulce y se agregó 0.333 mL de la solución de H₂O₂ al 9 %, esto para tener un 15 % de sólidos en el medio de reacción. Posteriormente se ajustó el pH a 11.5 con NaOH 2.5 M. La reacción se realizó a 35°C y 180 rpm durante 26 horas, pasado este tiempo, la materia se transvasó a tubos Eppendorff lavando con 2 mL de buffer de citratos de pH 4.80. La muestra se centrifugó en una microcentrífuga a 20°C y 12000 rpm por 10 min, el líquido obtenido se filtró con jeringa y un filtro de nylon de 0.45 µ. Posteriormente se realizó la lectura de lignina soluble en la fase líquida obtenida (pag. 72). El sólido se lavó 4 veces más con buffer de citratos pH 4.80. Las muestras se almacenaron en congelación para su posterior uso.

El sólido pretratado, se descongeló para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de acuerdo a las condiciones determinadas en el diseño de experimentos. Se añadieron 0.955 mL de buffer de citratos pH 4.80 y 0.045 mL de coctel enzimático E7. La mezcla se incubó en un baño con agitación a 50°C y 180 rpm por 2 horas. Pasado este tiempo, el tubo se colocó en un baño de agua a ebullición por 5 min para inactivar la enzima y el sólido se lavó con 3 mL de agua destilada. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm y 20°C por 10 min para separar el sólido y llevarlo a horno de secado, el líquido se filtró y sometió a análisis por HPLC para identificación y cuantificación de azúcares.

3.3.4.2. Pretratamiento ácido diluido.

Este pretratamiento implica el uso de ácidos diluidos para romper la estructura rígida del material lignocelulósico. El ácido más utilizado es ácido sulfúrico diluido, el cual ha sido empleado comercialmente para pretratar una amplia variedad de tipos de biomasa: mijo, rastrojo de maíz, abeto (madera blanda), entre otros (Brodeur, 2011). El pretratamiento ácido diluido se llevó a cabo bajo las condiciones mostradas en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones del pretratamiento Ácido diluido.

<i>Parámetro</i>	<i>Condición</i>
Temperatura	121°C
Tiempo	1 hora
% Sólidos (%p/v)	10 %
Concentración de H₂SO₄ (%v/v)	4.2 %

En un matraz Erlenmeyer de 50 mL con taparosca, se colocaron 2.0 g de bagazo de sorgo dulce y se agregaron 20 mL de una solución de H₂SO₄ al 4.2 % para tener un 10 % de sólidos. Esta muestra se incubó en autoclave a 121°C por 1 hora. Posteriormente, la materia se transvasó a tubos para centrifuga lavando con 10 mL de buffer de citratos pH 4.80. La muestra se centrifugó a 12000 rpm y 20°C por 10 min, el líquido se separó y filtró con jeringa para realizar la lectura de lignina soluble en ácido. El sólido se lavó 4 veces con el mismo buffer. Las muestras se almacenaron en congelación para su siguiente uso.

Para la realización de la hidrólisis enzimática, se determinó el contenido de humedad (% H) del sólido en una termobalanza (% H = 90.76 ± 0.12). Con éste valor se calculó la cantidad de sólidos húmedos sometidos a hidrólisis para que constituyeran en total 0.05 g de harina de bagazo de sorgo en peso seco. Las condiciones de hidrólisis a las que se sometió, fueron las determinadas en el diseño de experimentos. El sólido húmedo se pesó y colocó en un vial con

taparosca, se agregó 0.045 mL de coctel enzimático E7 y la cantidad necesaria de buffer de acuerdo a la humedad del sólido para tener 5 % de sólidos en la reacción (ca. 0.458-0.467 mL). La muestra se incubó en baño con agitación a 50°C y 180 rpm por 2 horas. Pasado este tiempo, el vial se colocó en un baño con agua a ebullición por 5 min para inactivar la enzima y posteriormente el sólido se lavó con 3 mL de agua destilada. La mezcla se centrifugó a 20°C y 12000 rpm por 10 min, el sólido se separó y se llevó a horno de secado mientras que el líquido se filtró con jeringa y filtros de nylon de 0.45 μ para someter a análisis por HPLC.

3.3.4.3. Básico con Hidróxido de Sodio.

El uso de álcali en el pretratamiento provoca la degradación de enlaces éster y glicosídicos, resultando en una alteración estructural de la lignina, hinchazón y decristalización parcial de la celulosa y solvatación parcial de la hemicelulosa. El hidróxido de sodio ha sido ampliamente estudiado y se ha demostrado que altera la estructura de la lignina de la biomasa, aumentando la accesibilidad de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa (Brodeur, 2011). Las condiciones de éste pretratamiento se encuentran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones del pretratamiento Básico con NaOH.

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

En un matraz Erlenmeyer de 50 mL con taparosca, se colocaron 2.0 g de bagazo de sorgo dulce y se agregaron 20 mL de una solución de NaOH al 1 % para tener un 10 % de sólidos. Esta muestra se incubó en autoclave a 121°C por 1 hora. Posteriormente la materia se transvasó a tubos para centrifuga lavando con 10 mL

de buffer de citratos pH 4.80. La muestra se centrifugó a 20°C y 12000 rpm por 10 min y se separó el líquido para filtrarlo y realizar la lectura de lignina soluble. El sólido se lavó 4 veces más con buffer. Las muestras se almacenaron en congelación para su siguiente uso.

Al sólido descongelado, se le determinó el contenido de humedad en termobalanza, para realizar la hidrólisis (% H = 90.30 ± 0.83). Con la humedad obtenida, se calculó la cantidad de sólidos húmedos sometidos a hidrólisis para que constituyeran en total 0.05 g de harina de bagazo de sorgo en peso seco. Las condiciones de hidrólisis a las que se sometió, fueron las determinadas en el diseño de experimentos. El sólido húmedo se pesó y colocó en un vial con taparosca, se agregó 0.045 mL de coctel enzimático E7 y la cantidad necesaria de buffer de acuerdo a la humedad del sólido para tener 5 % de sólidos en la reacción (ca. 0.457-0.518 mL). La muestra se incubó en un baño con agitación a 50°C y 180 rpm por 2 horas. Posteriormente, el vial se colocó en un baño con agua a ebullición por 5 min para inactivar la enzima y el sólido se lavó con 3 mL de agua destilada. La mezcla se centrifugó a 20°C y 12000 rpm por 10 min, el sólido se separó y se llevó a horno de secado, el líquido se filtró con jeringa para después someter a análisis por HPLC.

3.3.4.4. Básico con Óxido de Calcio (Cal).

El pretratamiento básico con óxido de calcio comúnmente conocido como cal, se basó en el proceso de nixtamalización del maíz. La nixtamalización es el proceso más antiguo de la industria alimentaria en México, el término nixtamal viene del náhuatl “*nextil*” cenizas de cal y “*tamalli*” masa de maíz. Es un proceso prehispánico, extraordinario desde el punto de vista tecnológico, que consiste en la lixiviación del grano de maíz mediante un tratamiento térmico alcalino. Éste tratamiento consiste en la cocción del grano de maíz en agua con 1 a 3 % de CaO, a 95-100°C durante 60-180 min, seguido de un reposo de 12 horas. En la industria se utilizan estas condiciones en procesos continuos que optimizan el uso de

energía y reducen la variabilidad de los parámetros del proceso. Es común que se modifiquen estas condiciones con el fin de obtener productos específicos. En la nixtamalización, el pH alcalino y el calor, así como el prolongado tiempo de reposo en la solución, logran la remoción del pericarpio porque debilitan las paredes celulares por la solubilización parcial de hemicelulosas, hinchan la estructura, hay destrucción parcial de los gránulos de almidón e incipiente gelatinización, se modifica la estructura de las proteínas y se desarrolla el sabor característico a los productos nixtamalizados (Velázquez y Conca, 2010).

En la realización de este trabajo, se eligió evaluar un pretratamiento alcalino basado en el proceso de nixtamalización mencionado anteriormente. En los pretratamientos básicos de la biomasa lignocelulósica, además de utilizar NaOH como especie alcalina, en algunas ocasiones se emplea $\text{Ca}(\text{OH})_2$. La nixtamalización se lleva a cabo en un ambiente básico por la adición de CaO y ya que en el caso del maíz se utiliza, entre otras cosas, para separar el pericarpio del grano, se espera que en el bagazo de sorgo tenga un efecto de debilitación e hinchazón de las fibras del material lignocelulósico, permitiendo un mejor acceso a las fibras de celulosa. La elección de la especie alcalina en este caso es de suma importancia, ya que el CaO tiene propiedades más deseables para éste propósito puesto que es mucho más barato en el mercado de productos químicos y además es capaz de proporcionar más alcalinidad que el hidróxido ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), por unidad de peso. Por otro lado, la energía calorífica que produce el óxido de calcio cuando forma el hidróxido en solución acuosa, es favorable para la aceleración de la reacción durante el pretratamiento (Ximing, 2011). El pretratamiento se llevó a cabo bajo las condiciones mostradas en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones del pretratamiento Básico con CaO (Cal).

Parámetro	Condición
Temperatura	75-80°C
Tiempo	1 hora
% Sólidos (%p/v)	10 %
Concentración de CaO (%p/v)	1 %

En un tubo de vidrio con taparosca, se colocaron 0.05 g de bagazo de sorgo dulce y se agregó 0.5 mL de una solución de cal al 1 % para tener un 10 % de sólidos. La muestra se incubó en un baño de agua caliente, controlando la temperatura de éste entre 75 y 80°C durante 1 hora. Después del tratamiento, la materia se transvasó a tubos Eppendorff lavando con 2 mL de buffer de citratos pH 4.80. La muestra se centrifugó en una microcentrífuga a 20°C y 12000 rpm por 10 min y se separó el líquido obtenido, se filtró con jeringa y filtros de nylon de 0.45 μ para realizar la lectura de lignina soluble. El sólido se continuó lavando con buffer de citratos pH 4.80, 4 veces más. Las muestras se almacenaron en congelación para su posterior uso.

El sólido pretratado se descongeló para realizar la hidrólisis enzimática de acuerdo a las condiciones determinadas en el diseño de experimentos. Se añadieron 0.955 mL de buffer de citratos pH 4.80 y 0.045 mL de coctel enzimático E7, se incubó en un baño con agitación a 50°C y 180 rpm por 2 horas. Pasado este tiempo, el tubo se colocó en un baño con agua a ebullición por 5 min para inactivar la enzima y el sólido se lavó con 3 mL de agua destilada. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm y 20°C por 10 min para separar el sólido y llevarlo a horno de secado, el líquido se filtró y sometió a análisis por HPLC.

3.3.4.5. Ozonólisis.

El uso de la ozonólisis como pretratamiento del material lignocelulósico permite esencialmente la degradación del polímero de lignina pero también la ligera solubilización de la hemicelulosa de la biomasa. El ozono es altamente reactivo hacia compuestos con dobles enlaces conjugados y grupos funcionales con densidades electrónicas altas. Por lo tanto, la porción del material lignocelulósico con más probabilidad a ser oxidada en la ozonificación, es la lignina, debido a su alto contenido de enlaces C=C (García-Cubero, 2009). La ozonificación del material lignocelulósico se realizó en las condiciones de la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones del pretratamiento de Ozonificación.

Parámetro	Condición
Temperatura	Ambiente (20-25°C)
Tiempo	1 hora
% Sólidos (%p/p)	47 %
Concentración de O₃ (%v/v)	0.051 %
Flujo de aire	180-240 mL/min

Se montó un sistema de ozonólisis para realizar el tratamiento del bagazo de sorgo dulce (Figura 15; Figura 60, Anexo B). Se empacó una columna de vidrio con 1.0 g de bagazo de sorgo al cual se le añadió 1.11 mL de agua destilada para tener 47 % p/p de sólidos y posteriormente se mezcló con perlas de vidrio para evitar que el bagazo se apelmazara dentro de la columna e impidiera el paso del aire (Figura 16). El aire ozonificado fue humectado para evitar que a su paso deshidratara la muestra, además se utilizó una trampa de yoduro de potasio 0.05M en buffer de fosfatos pH 7.10, para determinar y consumir el O₃ remanente durante el pretratamiento. Antes de comenzar con la prueba, se midió el flujo de aire ozonificado con ayuda de un flujómetro (flujo de entrada inicial). Una vez estabilizado el flujo, el aire ozonificado se conectó al sistema y se ozonificó la muestra durante 1 hora. En el transcurso de la prueba, se midió el flujo de aire de salida del sistema, para verificar la constancia del mismo. Al finalizar la prueba, de nuevo se midió el flujo de aire ozonificado (flujo de entrada final).

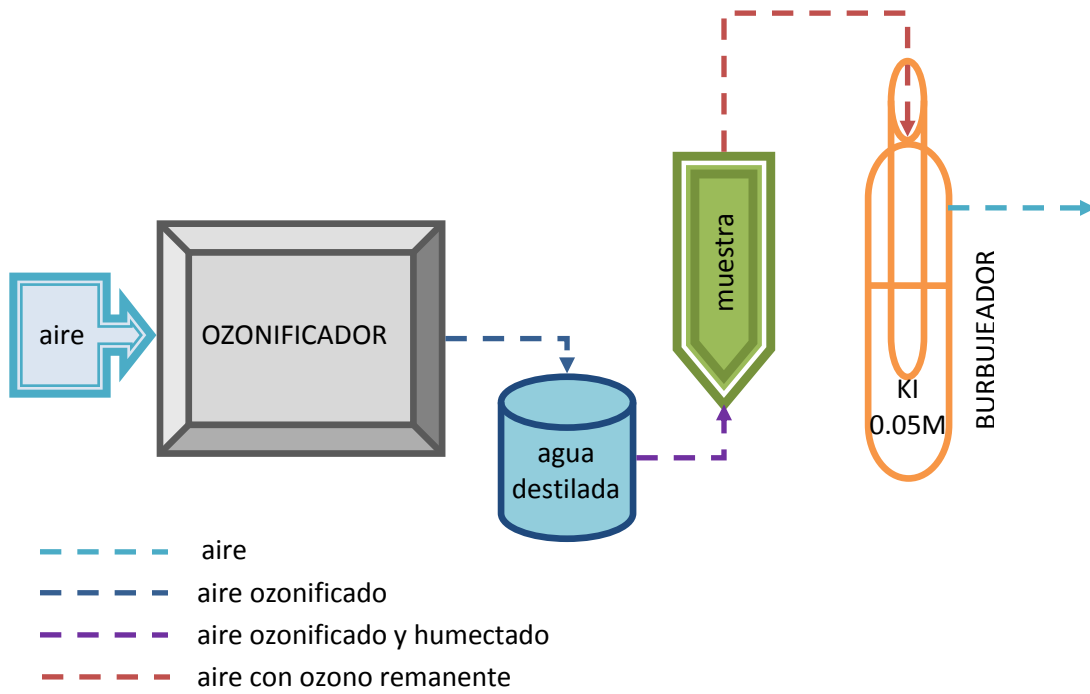


Figura 15. Sistema de Ozonólisis.

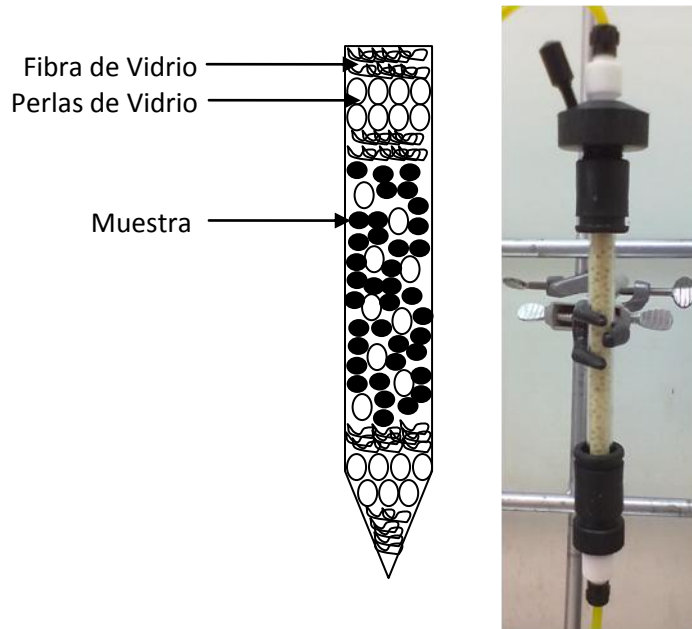


Figura 16. Columna empacada con la muestra en el sistema de Ozonólisis.

Al final del tratamiento, se le agregaron 2 mL de almidón soluble al 1 % (solución indicadora) a la solución de KI utilizada para burbujear el aire con O₃ remanente. Esto se realizó con el fin de valorar el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0.001M (ver siguiente sección). Sin embargo, no fue necesaria la valoración ya que el almidón indicó que no hubo yodo liberado, es decir, todo el ozono reaccionó con el bagazo.

Posteriormente, la muestra se transvasó a tubos para centrífuga lavando con 6 mL de buffer de citratos pH 4.80. La muestra se centrifugó a 12000 rpm y 20°C por 10 min y se separó el líquido para filtrarlo con jeringa y filtros de nylon de 0.45 µ. Se realizó la lectura de lignina soluble en la fase acuosa. El sólido se lavó 4 veces más con buffer. Las muestras se almacenaron en congelación para su siguiente uso.

Para realizar la hidrólisis enzimática, se midió el contenido de humedad del sólido pretratado. La humedad obtenida (% H = 89.34 ± 1.62) se utilizó para calcular la cantidad de sólidos húmedos sometidos a hidrólisis para que constituyeran en total 0.05 g de harina de bagazo de sorgo en peso seco. Las condiciones de hidrólisis a las que se sometió, fueron las determinadas en el diseño de experimentos. El sólido húmedo se pesó y colocó en un vial con taparosca, se agregó 0.045 mL de coctel enzimático E7 y la cantidad necesaria de buffer de acuerdo a la humedad del sólido para tener 5 % de sólidos en la reacción (ca. 0.480-0.579 mL). La muestra se incubó en un baño con agitación a 50°C y 180 rpm por 2 horas. Posteriormente, el vial se colocó en un baño con agua a ebullición por 5 min para inactivar la enzima y el sólido se lavó con 3 mL de agua destilada. La mezcla se centrifugó a 20°C y 12000 rpm por 10 min, el sólido se separó y se llevó a horno de secado, el líquido se filtró con jeringa para después someter a análisis por HPLC.

3.3.4.5.1. Determinación de la concentración de ozono.

Para realizar el pretratamiento de ozonólisis fue necesario determinar la concentración de ozono en el aire empleado. La cuantificación de O_3 en el aire se realizó en base al método C del protocolo *D4575-09 Test Methods for Rubber Deterioration-Reference and Alternative Method(s) for Determining Ozone Level in Laboratory Test Chambers* (ASTM International, 2011), con algunas modificaciones a conveniencia del experimento. Esta determinación se realizó por medio de yodometría, reacción en la cual un analito oxidante, en este caso el O_3 , se añade a un exceso de yoduro (I^{-1}) para producir yodo (I^0), que luego se valora con disolución estándar de tiosulfato (Harris, 2007).

Se montó un sistema similar al del pretratamiento de ozonólisis de la muestra (Figura 17). Se prepararon los reactivos necesarios para la prueba: Una solución buffer de fosfatos de pH 7.10, pesando 0.3402 g de KH_2PO_4 y 0.5324 g de Na_2HPO_4 y disolviéndolos en 250 mL de agua destilada, el pH se midió con un potenciómetro. Posteriormente, se preparó una solución de yoduro de potasio 0.12M disolviendo 1.0 g de KI en 50 mL del buffer de fosfatos pH 7.10. Para valorar el yodo liberado durante la reacción, se utilizó una solución de tiosulfato de sodio 0.01M, la cual se preparó pesando 0.6204 g de tiosulfato de sodio pentahidratado ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) y disolviéndolos en 250 mL de agua destilada recién hervida y libre de CO_2 para evitar que éste provocara la dismutación del tiosulfato a bisulfito y azufre coloidal. Además, la descomposición del tiosulfato también puede ser causada por efecto de bacterias, por lo que se agregó un poco de carbonato de sodio (100 mg/L) para tener un pH ligeramente alcalino y evitar esta descomposición (Dosal, 2007). Posteriormente, esta solución se valoró con permanganato de potasio ($KMnO_4$) 0.02M y después se diluyó hasta una concentración de 0.001M. También se preparó una solución de almidón soluble al 1 % para utilizarla como indicador en la titulación del yodo liberado. En una disolución que no tenga otra especie coloreada, es posible ver el color de una disolución de I_3^{-1} (complejo que se forma en las soluciones de I_2 en presencia de

un exceso de I^{-1}) en una concentración $\sim 5 \mu M$. Con almidón, el límite de detección se puede rebajar en un factor de 10 (Harris, 2007).

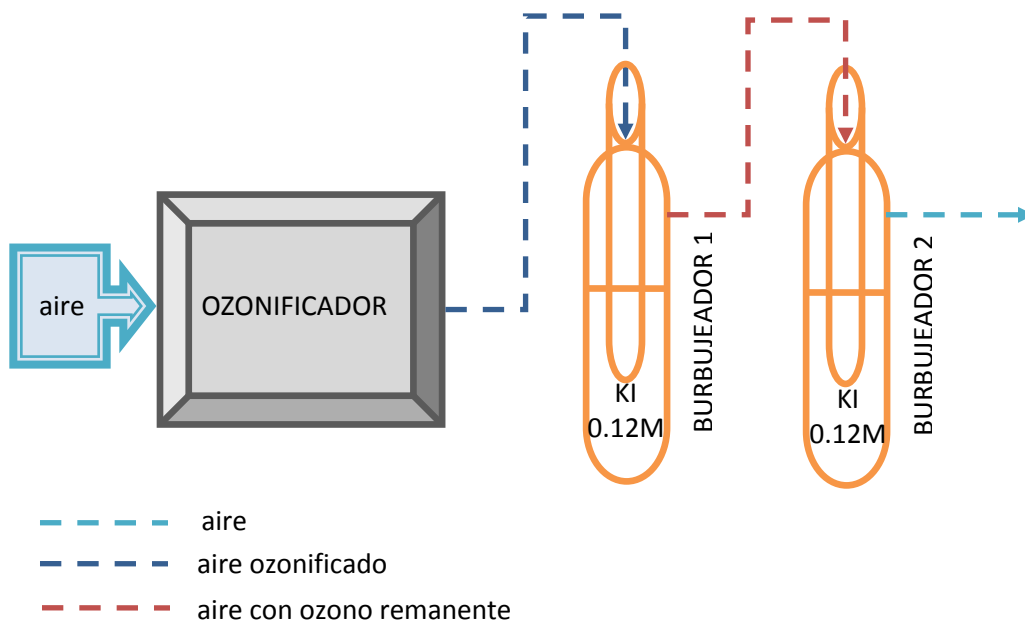


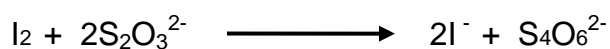
Figura 17. Sistema para cuantificación de O_3 .

El flujo de aire se midió con un flujómetro y una vez estabilizado (240-320 mL/min), se conectó al ozonificador para comenzar con la determinación. El aire ozonificado, se hizo pasar durante 2 min a través de la solución de yoduro de potasio por medio de un burbujeador en donde se llevó a cabo la siguiente reacción redox:



Se colocó un burbujeador extra para consumir el ozono remanente, en caso de que el aire proveniente del primer burbujeador aún no estuviera libre de ozono. Lo

anterior ocurriría en caso de que la concentración de yoduro en la primer solución fuera menor que la concentración de O_3 en el aire burbujeado, por lo que se consumiría todo el I^{-1} y el resto del O_3 pasaría al siguiente burbujeador. Esto no sucedió, el O_3 reaccionó en su totalidad en la primera solución, oxidando el yoduro a yodo, lo cual se hizo evidente con la formación de una coloración amarillo-café en la primera solución mientras que la segunda no presentó ningún cambio (Figura 18). En efecto, el yoduro (I^{-1}) estaba en exceso en la primer solución y el O_3 era el reactivo limitante de la reacción, tal y como se esperaba. Posteriormente, la solución de reacción se tituló con tiosulfato de sodio 0.001M para consumir el yodo liberado por acción del O_3 en el aire, de acuerdo a la siguiente expresión:



La solución de almidón se agregó cuando la solución que se titulaba tomaba un color amarillo paja (Dosal, 2007). En la yodometría hay presente I_3^{-} durante toda la valoración hasta el punto de equivalencia, el almidón no debe añadirse en estas reacciones, sino inmediatamente antes del punto de equivalencia, que se detecta visualmente por decoloración del I_3^{-} . De lo contrario, algo de yodo tiende a seguir unido a las partículas de almidón, después de alcanzarse el punto de equivalencia (Harris, 2007). Se añadieron 2 mL de ésta solución como indicador. Finalmente, se calculó la concentración de O_3 en el aire, empleando el volumen de tiosulfato gastado en la titulación, el flujo de aire burbujeado (240-320 mL/min) y un volumen molar de O_3 de $24 \text{ dm}^3/\text{mol}$ (Mungall, 2008), se obtuvo una concentración promedio de ozono de 0.051% (v/v).

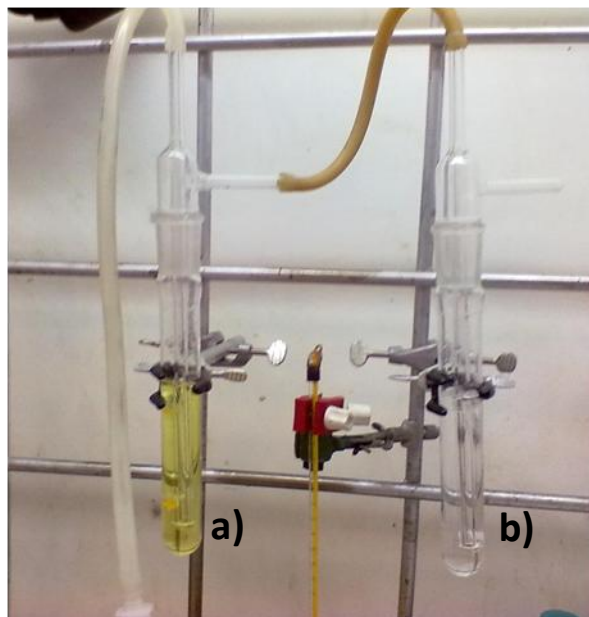


Figura 18. Burbujeadores del sistema de cuantificación de O_3 .
a) Burbujeador 1: Coloración amarilla por el I_2 liberado durante la reacción.
b) Burbujeador 2: Solución incolora por la ausencia de O_3 y por lo tanto de I_2

3.3.4.6. Lignina soluble.

Se han mencionado anteriormente algunos pretratamientos generalmente empleados para la eliminación de la lignina de la biomasa. Estos métodos son eficaces para la solubilización de la lignina y además, en la mayoría de ellos, la hemicelulosa también se hidroliza. La lignina es sumamente resistente a la degradación química y enzimática (Mussatto, 2010). La lignina que se solubiliza durante el pretratamiento del material lignocelulósico (lignina soluble) es lignina de bajo peso molecular (Sluiter, 2011) y su determinación se utiliza para evaluar el efecto de los pretratamientos. La determinación de lignina soluble para los pretratamientos estudiados se realizó en base al método *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass* (Sluiter, 2008).

En un intervalo no mayor a 6 horas después de realizado el pretratamiento, del primer lavado obtenido, se tomó un volumen adecuado y se diluyó lo necesario para que la lectura de absorbancia de lignina soluble estuviera en el rango de 0.7-

1.0 unidades de absorbancia. La lectura de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 240 nm frente a un blanco de buffer de citratos pH 4.80. El porcentaje de lignina soluble se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%LS = \frac{UVabs * Volumen_{filtrado} * Dilución}{\epsilon * ODW_{muestra}} * 100$$

donde:

UVabs: absorbancia de la muestra a 240 nm, longitud de onda recomendada para el bagazo de caña de azúcar,

Volumen_{filtrado}: volumen del licor o primer lavado del pretratamiento en litros,

Dilución: $\frac{Volumen\ muestra\ (mL) + Volumen\ diluyente\ (mL)}{Volumen\ muestra\ (mL)}$,

ϵ : constante de absorptividad de la biomasa a una longitud de onda específica, a 240 nm $\epsilon = 25\ L/g*cm$,

ODW_{muestra}: Peso seco de la muestra pretratada.

3.3.4.7. Caracterización mediante espectrofotometría de Infrarrojo.

La Espectrofotometría de Infrarrojo (IR) es una de las técnicas espectroscópicas más comúnmente utilizadas en la química orgánica e inorgánica. Simplemente, se trata de la medición de diferentes frecuencias de IR absorbidas por una muestra posicionada en el camino de un haz de radiación infrarroja. El objetivo principal de este análisis es determinar los grupos funcionales en la muestra pues los

diferentes grupos funcionales absorben a frecuencias características de radiación IR (Sherman, 1997). Las muestras analizadas pueden ser sólidas, líquidas o gaseosas y la cantidad requerida de ellas es mínima. En el caso de las muestras sólidas se necesitan de 50 a 200 mg aproximadamente, pero si se cuenta con una matriz transparente como el KBr, 10 μg son suficientes para determinaciones cualitativas (Sherman, 1997). La técnica que principalmente se usa para la obtención de espectros de IR de sólidos en polvo o con superficies rugosas como el carbón, papel y tela, es la de reflexión o reflectancia difusa. Esta técnica se utiliza esencialmente con propósitos cualitativos y ha sido empleada en la espectroscopía Uv-Vis desde hace muchos años, no así en la espectroscopía IR. En este caso, no se dispone con facilidad de medios de dispersión eficientes, siendo el KBr pulverizado el material más comúnmente utilizado. La ventaja más significativa de la técnica de reflexión difusa es que permite registrar espectros IR de muestras sólidas prácticamente sin tener que realizar manipulación alguna de la muestra, simplemente se pulverizan y mezclan la muestra y el KBr.

Se realizó un análisis de espectrofotometría de Infrarrojo para las muestras sólidas resultantes de cada pretratamiento utilizando un espectrofotómetro FT-IR y la técnica de reflectancia difusa. Cada muestra se secó en horno a 40-50°C por 1 hora, antes de la determinación. Como elemento dispersivo se utilizó KBr seco y para la preparación de las muestras se utilizó una pequeña cantidad del sólido de cada pretratamiento y se dispersó en KBr, se homogeneizó moliendo finamente el polvo en un mortero, la muestra se colocó en una celda del espectrofotómetro y se realizó la lectura de absorbancia. Todas las muestras se analizaron frente a un blanco de KBr. Finalmente, se obtuvo el espectro de IR y se analizaron los grupos funcionales presentes en el bagazo pretratado.

3.3.4.8. Difracción de Rayos X.

La fibra celulósica es un agregado policristalino, formado por regiones cristalinas y amorfas que podrían estar relacionadas con el comportamiento de las fibras ante diferentes reactivos y por ende con las propiedades finales del material. Se puede determinar la cristalinidad de éstas fibras mediante diferentes técnicas, con el fin de relacionar esta característica con las propiedades de la biomasa (Roncero, 2001).

Existe un gran número de métodos que han sido utilizados para la determinación de la cristalinidad y la accesibilidad de las celulosas, sin embargo son pocos los adecuados para la medida de la cristalinidad debido a la interferencia de las hemicelulosas y de la lignina. Entre los métodos más confiables está la Difracción de Rayos X (XRD), la Espectroscopía Infrarroja y la Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Estos tres métodos son sensibles a diferentes aspectos de orden y desorden, pero no debe sorprender el hecho de que den lugar a valores diferentes de celulosa ordenada y no ordenada para la misma muestra, ya que tienen sensibilidades distintas (Evans, 1995; Roncero, 2001).

Se han propuesto dos conformaciones moleculares ordenadas y estables para las estructuras de la celulosa, lo que justifica la existencia de dos formas cristalinas, celulosa I y celulosa II. La forma predominante en la naturaleza (celulosa de madera) es la celulosa I. En este caso, se ha considerado el método de difracción de rayos X (XRD) para la determinación del grado de cristalinidad de las fibras celulósicas del bagazo de sorgo dulce, antes y después del pretratamiento. En la figura 19, se muestra un difractograma típico de una pasta de madera obtenido con la técnica XRD. Los máximos que se observan son producidos por reflexiones específicas de las regiones cristalinas.

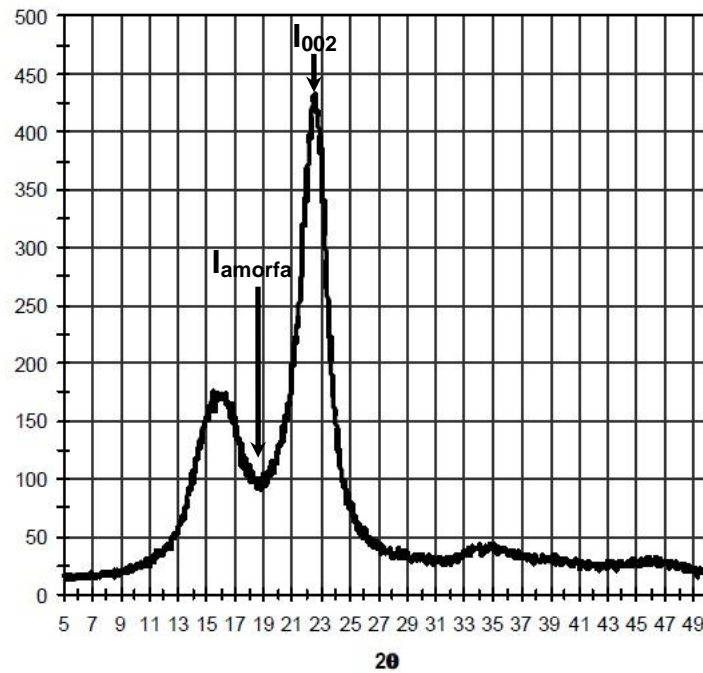


Figura 19. Difractograma XRD de una muestra de pasta de madera.

Para determinar el porcentaje de cristalinidad de la muestra, han sido propuestos diferentes métodos y aproximaciones, una de ellas, consiste en tomar del difractograma la intensidad de un máximo y de un mínimo apropiados para dar un índice de cristalinidad (IC) definido por Segal et. al. (1959) como:

$$IC = \left[\frac{I_{002} - I_{amorfa}}{I_{002}} \right] * 100 = \left[1 - \frac{I_{amorfa}}{I_{002}} \right] * 100$$

donde,

I_{002} : es la intensidad del pico cristalino en el máximo a 2θ entre 22° y 23° para celulosa I,

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS

I_{amorfa} : es la intensidad en el mínimo a 2θ entre 18° y 19° para celulosa I (Roncero, 2001; Barba, 2002; Johnson, 2010; Segal, 1959; Thompson, 1989).

Para determinar el índice de cristalinidad (IC) de las muestras de los pretratamientos, se llevó a cabo la medición de los patrones de difracción de rayos X en un Difractómetro D-8 para la identificación de fases cristalinas y amorfas. Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Catálisis Combinatoria del IMP, se utilizaron las condiciones mostradas en la tabla 12. Previo al análisis de XRD, cada muestra se secó en horno entre $40-50^\circ\text{C}$ por 1 hora, posteriormente se molieron finamente con el fin de homogeneizarlas y cada una se colocó en un portamuestras del difractómetro. Se obtuvieron los difractogramas y se calculó el IC de acuerdo a lo mencionado anteriormente.

Tabla 12. Condiciones del análisis de Difracción de Rayos X.

Parámetro	Condición
Barrido	$2\theta = 5-18$
Tiempo de barrido	300 seg (5 min)
Intervalo de medición	0.05 seg
Potencia	40Kv, 40Ma
Muestra	Sólido en portamuestra

4.1. DISEÑO DE EXPERIMENTOS: HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En estudios realizados anteriormente por el equipo de trabajo, la hidrólisis enzimática se llevó a cabo durante 1 hora e incluso se utilizaron mayores concentraciones de enzima que las consideradas en este estudio (Guzmán, 2012; Hernández, 2010), y aunque en todos los casos se obtuvieron buenos rendimientos de azúcares fermentables, el diseño de experimentos permite determinar las condiciones adecuadas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática con mayor eficiencia, además de que indica qué factores de los estudiados, son los que tienen un impacto significativo en la obtención de azúcares fermentables a partir del bagazo de sorgo dulce.

4.1.1. Dominio experimental e idoneidad del modelo matemático de la hidrólisis enzimática de bagazo de sorgo sin pretratamiento.

Para la evaluación de la actividad del coctel enzimático E7, primero se consideró evaluar tres diferentes temperaturas para realizar la hidrólisis enzimática, 40, 50 y 60°C. Esto debido a que resultados del equipo de trabajo mostraban un incremento de la actividad enzimática de 20 a 50°C (Hernández, 2010; Tapia, 2010), pero se desconocía el efecto por arriba de esa temperatura. Se cuantificaron azúcares reductores por el método de DNS en base a una curva de calibración de glucosa (Figura 45, Anexo A). En la figura 20 se muestran los resultados de esta evaluación a la cual se le aplicó un análisis de varianza (ANOVA $\alpha = 0.05$, Tabla 19, Anexo A) y de la cual se concluye que no existe diferencia significativa en la actividad que presenta el coctel E7 a estas tres temperaturas. Por esta razón, se decidió mantener constante la temperatura de reacción en 50°C.

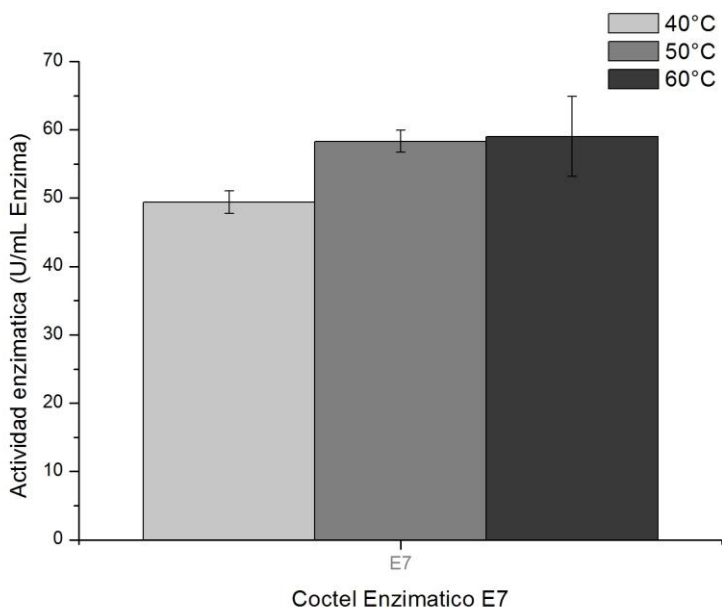


Figura 20. Actividad enzimática del coctel enzimático E7.
Sustrato: Papel filtro WHATMAN No. 1
Tiempo de reacción: 60 min.

Conociendo el efecto de la temperatura sobre la actividad, se procedió a definir el dominio experimental conformado por tres variables independientes o factores: la proporción de enzima ($\text{mL}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{bagazo}}$; X1), el tiempo de reacción (min; X2), y el contenido de sólidos ó harina de bagazo (% p/v; X3), en el sistema de reacción (Figura 21). Ahora, el modelo utilizado es un factorial completo 2^3 en donde tenemos tres factores, 2 niveles para cada factor y tres puntos centrales para estimar el error experimental; lo que resultó en 11 tratamientos experimentales.

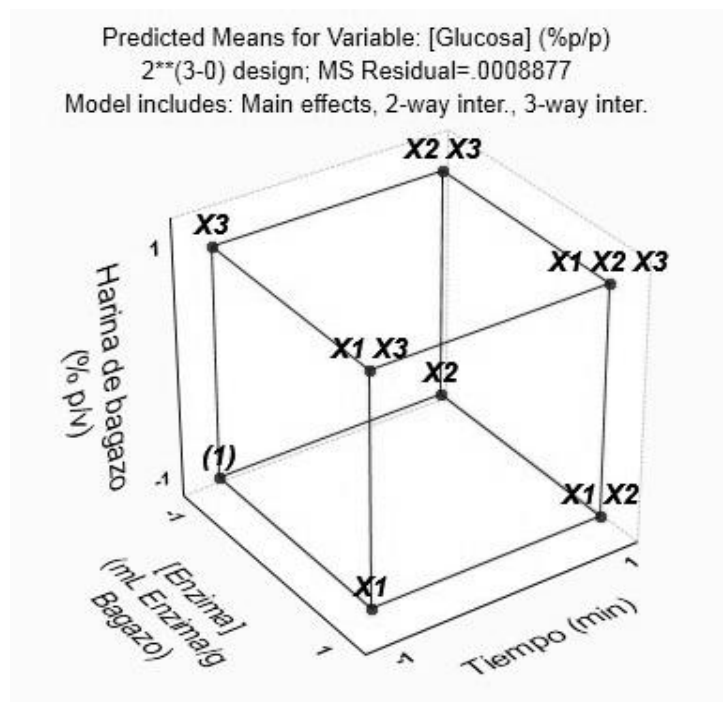


Figura 21. Representación gráfica del dominio experimental de la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo sin pretratamiento.

Para la evaluación de la adecuación del modelo matemático, se generaron los gráficos de probabilidad normal contra residuales, valores predichos contra valores observados y valores predichos contra residuales (Figuras 50-58, Anexo A). Los gráficos de probabilidad normal de residuales, muestran tendencias a una línea recta, lo cual indica que la distribución del error es normal, acumulándose más puntos en el centro que en los extremos (De Dios, 2007). Los valores predichos son muy cercanos a los valores observados, muestran la misma tendencia al formar una línea recta, casi sobrepuestos. En cuanto a los gráficos de residuales contra valores predichos, no existe un patrón definido en los puntos de los valores predichos y se encuentran distribuidos cerca de cero, por lo que se puede concluir que las varianzas son iguales para todos los tratamientos (De Dios, 2007). A partir de ello, podemos afirmar que el modelo experimental es idóneo con una confianza del 95%.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las variables de respuesta (Tabla 13) fueron determinadas mediante HPLC y para cuantificar la glucosa se realizó una corrección restando la cantidad de glucosa que tiene el bagazo de sorgo inicialmente (antes de la hidrólisis) que es de 10.53% (p/p), a la cantidad de glucosa obtenida después de la hidrólisis enzimática. Posteriormente, se realizó la corrección anhidra (Ver sección 3.3.3.2. Método 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), *corrección anhidra*, pág. 55), de acuerdo a la siguiente expresión:

$$([Glucosa \text{ después de la hidrólisis}] - [Glucosa \text{ antes de la hidrólisis}]) * (0.90)$$

Para el resto de los azúcares, la concentración se determinó utilizando el factor de corrección correspondiente, ya que no se detectó su presencia inicial en el bagazo de sorgo.

Tabla 13. Variables de respuesta encontradas para cada tratamiento de la hidrólisis enzimática a 50°C.

Tratamiento	[Enzima] mL E/g bagazo	Tiempo (min)	Harina de Bagazo (%p/v)	Glucosa (%p/p)	Celobiosa (%p/p)	Xilosa (%p/p)
9 (C)	0.6	80	10	2.069	1.106	0.637
10 (C)	0.6	80	10	2.016	1.180	0.679
7	0.9	120	5	2.564	1.086	0.361
3	0.3	120	5	0.891	1.822	0.442
11 (C)	0.6	80	10	2.018	1.127	0.668
1	0.3	40	5	0.038	2.243	0.450
2	0.3	40	15	0.399	2.150	0.441
5	0.9	40	5	0.077	2.179	0.515
4	0.3	120	15	0.795	1.927	0.389
8	0.9	120	15	1.450	1.324	0.520
6	0.9	40	15	0.734	1.933	0.375

4.1.2. Efecto de la proporción de enzima, cantidad de harina de bagazo y tiempo de reacción en la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo dulce.

Los datos obtenidos de las respuestas, se sometieron a análisis mediante el software Statistica v.10, para evaluar el efecto de los factores sobre la producción de azúcares fermentables.

Los resultados de los ocho tratamientos más las tres repeticiones del punto central permiten obtener la ecuación del modelo matemático, i.e. el valor medio (β_0), tres efectos principales ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$), tres efectos de interacción de dos factores ($\beta_{12}, \beta_{23}, \beta_{13}$), un efecto de interacción de tres factores (β_{123}) y el error experimental (ε).

La forma general para calcular los efectos de una matriz de experimentos es ajustar un modelo de regresión multivariante por el método de mínimos cuadrados (Ferré, 2004). Para un diseño 2^3 , se puede ajustar, entre otros, el modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \varepsilon$$

donde x_1, x_2, x_3 son los valores codificados que han tomado los factores en los experimentos (-1 y +1) (Ver Figura 21). El utilizar variables reales dificultaría la comparación de los efectos entre sí, porque cada coeficiente tendría una unidad apropiada a la escala física de su variable real. Con variables codificadas, todos los coeficientes tienen las mismas unidades y se pueden comparar entre sí. Los coeficientes del modelo (Tabla 14) indican el cambio de respuesta cuando el factor cambia en una unidad codificada, desde el centro del dominio experimental hasta uno de los extremos (Ferré, 2004).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14. Coeficientes del modelo experimental de la hidrólisis enzimática de bagazo de sorgo sin pretratamiento.

$X_1 = [Enzima] (mL_{enzima}/g_{bagazo})$; $X_2 = Tiempo (min)$; $X_3 = Harina de bagazo (\%p/v)$.

Coeficiente	Glucosa (%p/p)	Celobiosa (%p/p)	Xilosa (%p/p)
β_0	0.87±0.01	1.83±0.01	0.44±0.008
β_1	0.34±0.01	-0.20±0.01	0.0061±0.008
β_2	0.56±0.01	-0.29±0.01	-0.009±0.008
β_3	-0.024±0.01	0.0004±0.01	-0.0054±0.008
β_{12}	0.24±0.01	-0.13±0.01	0.0063±0.008
β_{13}	-0.09±0.01	-0.0025±0.01	0.01±0.008
β_{23}	-0.28±0.01	0.085±0.01	0.032±0.008
β_{123}	-0.16±0.01	0.036±0.01	0.043±0.008
R	0.9998	0.9987	0.9932

Con un análisis de varianza ($\alpha = 0.05$,) podemos determinar qué factores tienen un efecto significativo sobre la producción de azúcares. Para el caso de la glucosa (Tabla 20, Anexo A), todos los efectos son significativos a excepción del efecto principal del contenido de sólidos (β_3). El coeficiente β_0 es el efecto medio general, y los efectos β_1 , β_2 , y β_3 son el efecto de cada factor sobre cada respuesta (Ferré, 2004). El factor que provoca un mayor cambio de rendimiento de glucosa es el tiempo (β_2), ya que es el efecto principal con el coeficiente de mayor valor, $\beta_2=0.56\pm 0.01$, e indica que la concentración de glucosa aumenta en esa cantidad cuando variamos el tiempo de reacción de 40 a 120 min. Variar la proporción de enzima de 0.3 a 0.9 mL_{enzima}/g_{bagazo} también aumenta la cantidad de glucosa obtenida ($\beta_1=0.34\pm 0.01$), pero el efecto es menor que el del aumento en el tiempo de reacción. Por último, el contenido de harina de bagazo en el sistema de reacción es el factor que tiene menor influencia y de hecho, de acuerdo al análisis de varianza, no es significativo para ninguna de las variables de respuesta. El signo negativo del parámetro del efecto ($\beta_3 = -0.024$) indica que la concentración de glucosa disminuye al aumentar el contenido de sólidos de 5 a 15%(p/v).

También pueden interpretarse los efectos a partir de la figura 22, donde se muestran las concentraciones de glucosa obtenidas al realizar los experimentos

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aleatoriamente. Observando sólo los efectos principales, las mejores condiciones que incrementan el contenido de glucosa son: un mayor contenido de harina de bagazo ([Glucosa] = 0.038 a 0.399% p/p); un mayor tiempo de reacción ([Glucosa] = 0.038 a 0.891% p/p) y la mayor cantidad de enzima ([Glucosa] = 0.038 a 0.077% p/p). Sin embargo, ésta interpretación se deberá complementar considerando las interacciones de los factores.

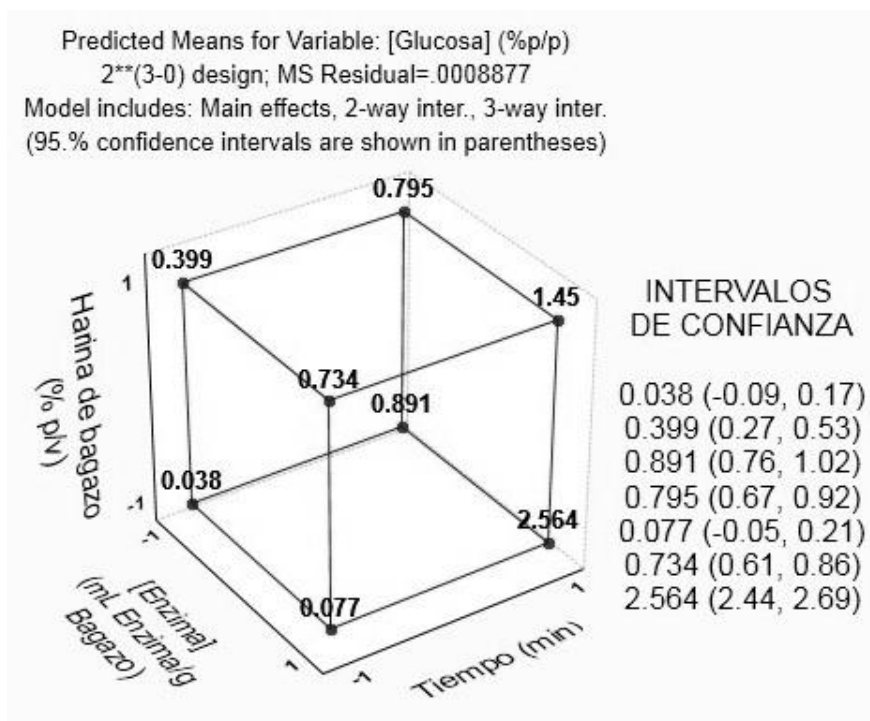


Figura 22. Concentraciones de glucosa obtenidas en los tratamientos del diseño experimental.

Los efectos β_{12} , β_{13} , y β_{23} miden el efecto de la interacción de la combinación de factores en la respuesta (Ferré, 2004). Para el efecto β_{23} , variar el tiempo de reacción de 40 a 120 min (Figuras 23, 24 y 25), siempre aumenta la concentración de glucosa.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

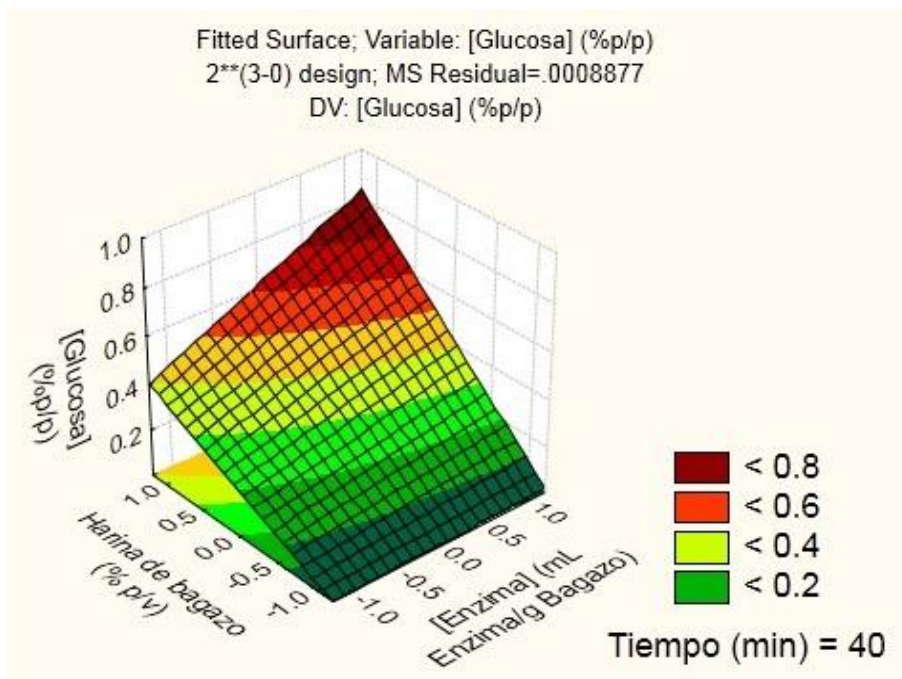


Figura 23. Efecto del contenido de harina de bagazo (% p/v) y de enzima (mL/g_{Bagazo}) sobre la generación de glucosa (Tiempo = 40 min).

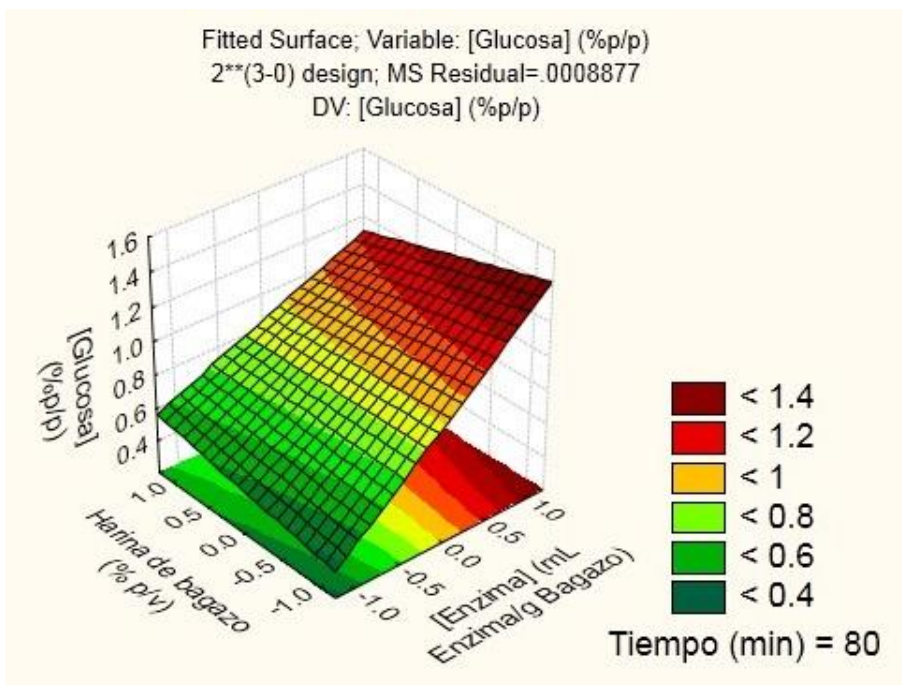


Figura 24. Efecto del contenido de harina de bagazo (% p/v) y de enzima (mL/g_{Bagazo}) sobre la generación de glucosa (Tiempo = 80 min).

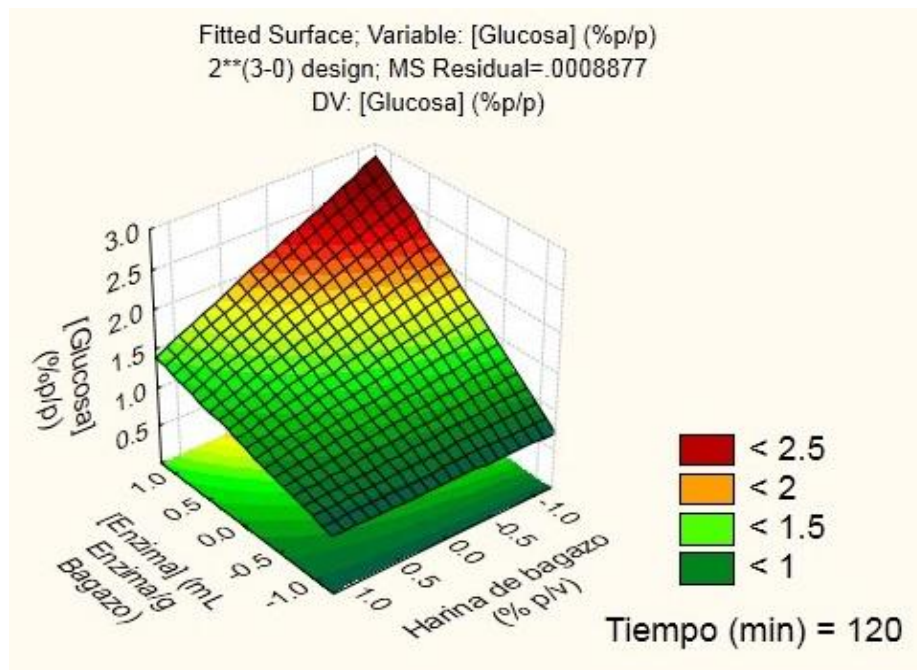


Figura 25. Efecto del contenido de harina de bagazo (% p/v) y de enzima (mL/g_{Bagazo}) sobre la generación de glucosa (Tiempo = 120 min).

Sin embargo, la generación enzimática de glucosa aumenta mucho más con 5 % p/v de harina de bagazo (Figura 26), que con 15 % p/v (Figura 28), para cualquier concentración de enzima utilizada (También ver figura 22). Se observa que la concentración de glucosa aumenta de 0.038 hasta 2.564 % p/p cuando se tienen 5 % de sólidos, mientras que el aumento se da desde 0.399 hasta 1.45 % p/p con el 15 % de sólidos; es decir, hay un menor aumento en la generación de glucosa con el aumento de la carga de sólidos en la hidrólisis enzimática. En efecto, el aumento del contenido de sólidos disminuye el contacto entre la fase líquida en donde se encuentran las enzimas y la fase sólida conformada por el bagazo de sorgo, reduciendo así la hidrólisis del material lignocelulósico, lo cual tiene un efecto negativo sobre la generación de glucosa para cada combinación de factores (β_{13} , β_{23} , β_{123}). El aumento de la agitación o bien de un sistema de agitación que permita un mejor contacto entre fases, permitiría un aumento de la generación de glucosa.

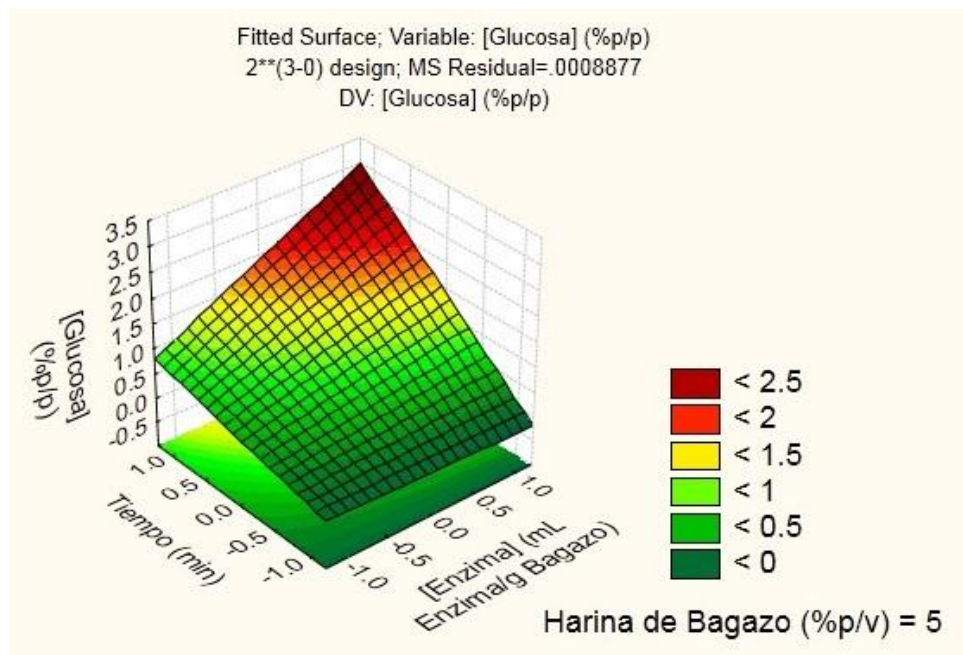


Figura 26. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima (mL/g_{Bagazo}) sobre la generación de glucosa (Harina de bagazo = 5 % p/v).

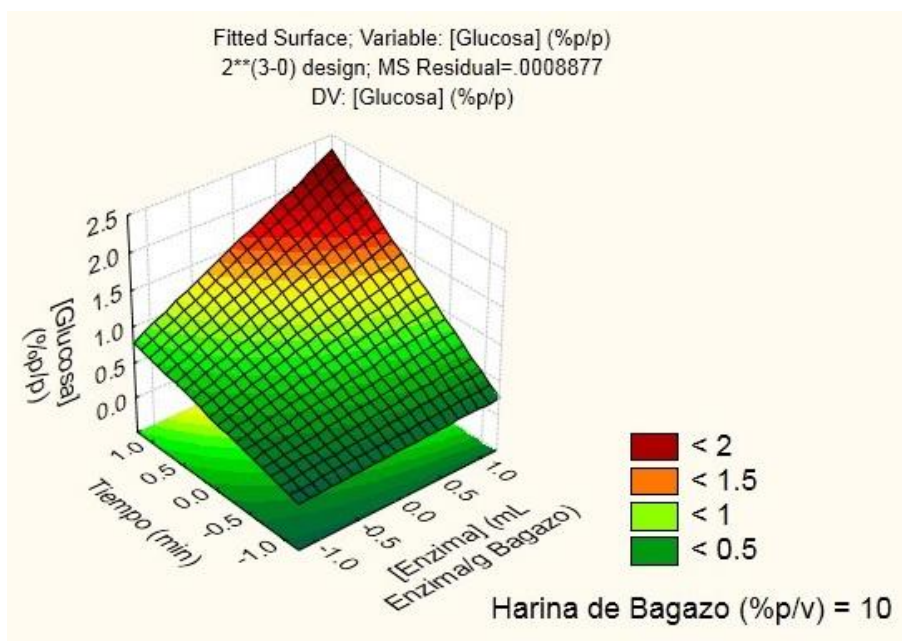


Figura 27. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima (mL/g_{Bagazo}) sobre la generación de glucosa (Harina de bagazo = 10 % p/v).

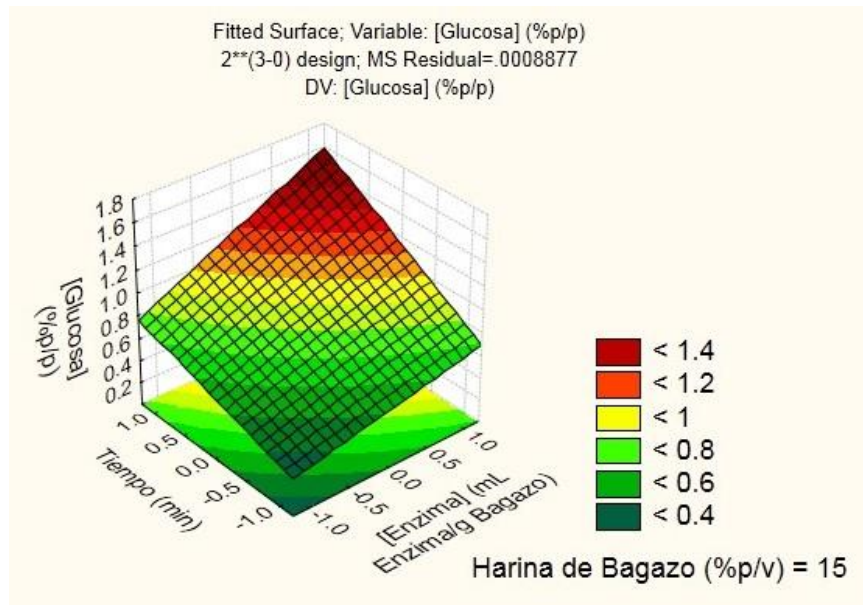


Figura 28. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima (mL/g_{Bagazo}) sobre la generación de glucosa (Harina de bagazo = 15 % p/v).

El análisis de los efectos principales muestra que se obtiene una menor cantidad de glucosa con un contenido de sólidos del 5 que con 15 % p/v a los 40 min de reacción (Figura 23). Pero a los 120 min (Figura 25), las mayores concentraciones de glucosa se producen con un contenido de sólidos de 5 % p/v, incluso el máximo rendimiento se obtiene con esta cantidad de harina de bagazo. De esta manera, podemos ver que el efecto de la interacción X_{23} es significativo.

Para el caso de la variación de la concentración de harina de bagazo y del tiempo a una proporción de enzima constante (Figuras 29, 30 y 31), la concentración de glucosa aumenta con el tiempo de reacción y la cantidad de enzima. Así, la generación de glucosa es más alta con 0.9 (Figura 31) que con 0.3 mL_{enzima}/g_{bagazo} (Figura 29) a los 120 min. En este caso, con la mayor cantidad de enzima la concentración de glucosa aumenta de 0.077 hasta 2.564 % p/p, mientras que con la menor cantidad de enzima aumenta de 0.038 hasta 0.891 % p/p. Por lo tanto, la interacción del tiempo de reacción y la cantidad de enzima ($\beta_{12} = 0.24 \pm 0.01$) es significativa e indica que la concentración de glucosa aumenta conforme aumenta el tiempo y la proporción de enzima.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

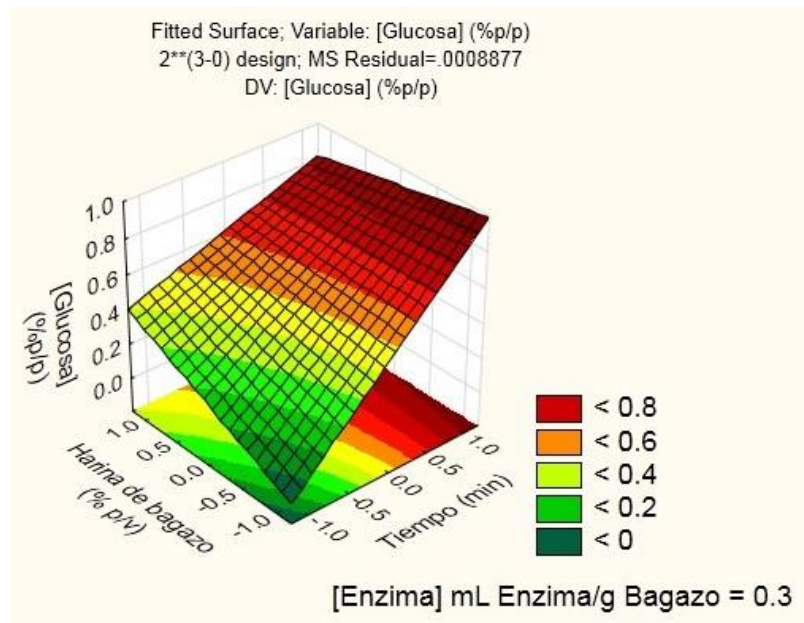


Figura 29. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de glucosa (Proporción de Enzima = 0.3 mL_{Enzima}/g_{Bagazo}).

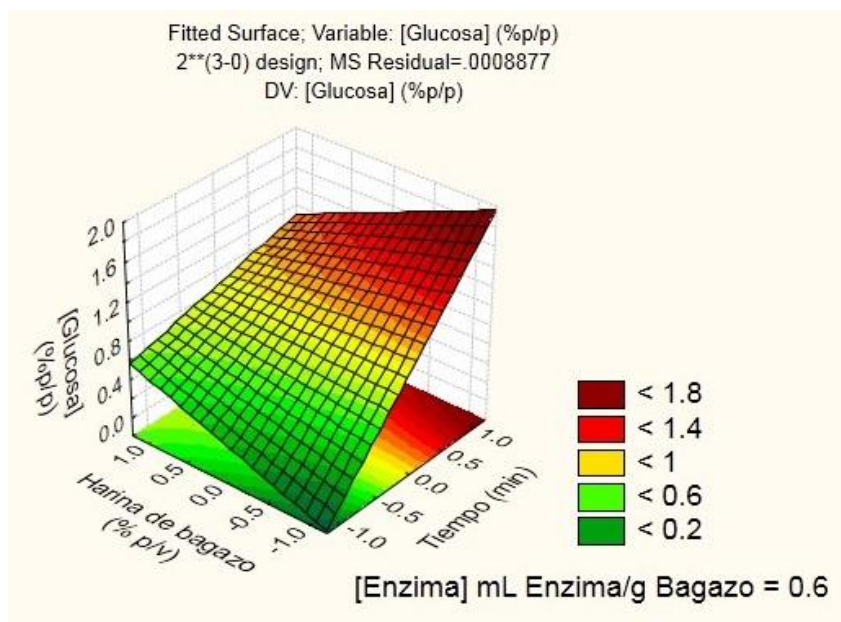


Figura 30. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de glucosa (Proporción de Enzima = 0.6 mL_{Enzima}/g_{Bagazo}).

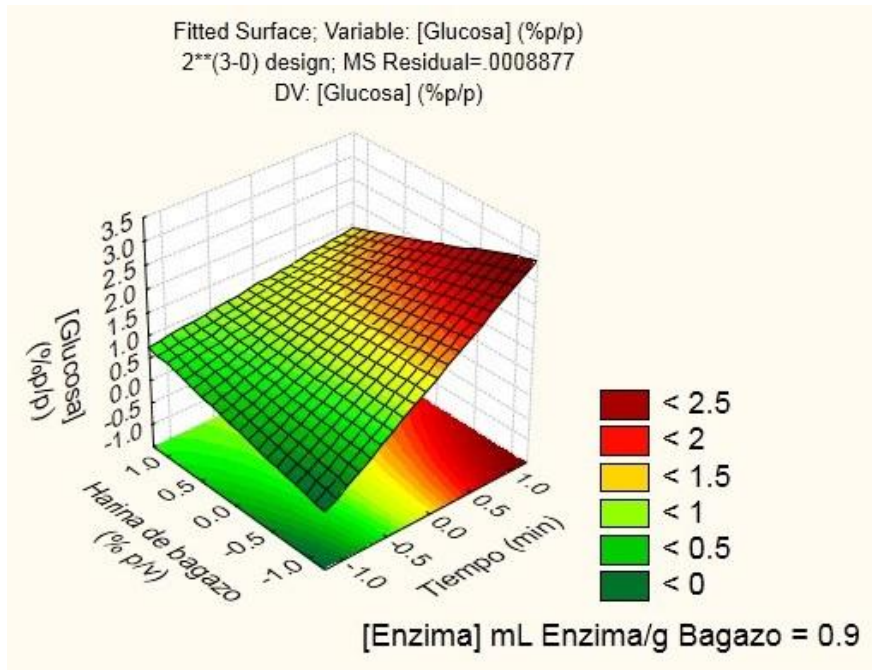


Figura 31. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de glucosa (Proporción de Enzima = 0.9 mL_{Enzima}/g_{Bagazo}).

En cuanto al efecto de la interacción β_{13} , nuevamente la concentración de glucosa va en aumento con el incremento de la cantidad de enzima (Ver figuras 29, 30 y 31), pero el aumento es mayor si el contenido de sólidos se mantiene en 5 % p/v; pues sí el contenido de sólidos aumenta, el efecto es negativo. Esto puede verse claramente en la figura 31, en donde se aprecia que para 5 % p/v de sólidos ($X_3 = -1$), la concentración de glucosa aumenta aproximadamente hasta 2.5 % p/p, y para 15 % p/v hasta alrededor de 1.4 % p/p (También ver figuras 26-28). El coeficiente de esta interacción ($\beta_{13} = -0.09 \pm 0.01$) representa este comportamiento al indicar que el aumento de estas dos variables en conjunto, disminuye la concentración de glucosa pero en forma menos significativa que los efectos de interacción de los otros dos factores.

Finalmente, el valor de β_{123} indica en qué grado el efecto de un factor depende del valor combinado de los otros dos factores (Ferré, 2004). En este caso $\beta_{123} = -0.16 \pm 0.01$ es relativamente pequeño comparado con los efectos principales de los factores y además tiene signo negativo. Al compararlo con los efectos de las interacciones, podemos observar que si consideramos el aumento de la cantidad de enzima (β_1) además del tiempo y el contenido de sólidos (β_{23}), el efecto en la disminución del contenido de glucosa es menor, ya que el efecto pasa de ser $\beta_{23} = -0.28 \pm 0.01$ a ser $\beta_{123} = -0.16 \pm 0.01$, lo cual quiere decir que el aumento de las 3 variables no disminuye la cantidad de glucosa tanto como si aumentamos el tiempo y el contenido de sólidos manteniendo la concentración de enzima constante. De manera similar para los otros efectos, si consideramos la cantidad de harina y enzima solamente (β_{13}), el efecto negativo sobre la respuesta no es tan grande ya que $\beta_{13} = -0.09 \pm 0.01$. Sin embargo, la interacción del tiempo provoca un efecto negativo mayor sobre la respuesta ($\beta_{123} = -0.16 \pm 0.01$). No obstante, el factor que más parece afectar al interaccionar con los otros dos factores es el aumento del contenido de sólidos, pues sin considerarlo el efecto era $\beta_{12} = 0.24 \pm 0.01$ y la triple interacción indica cómo influye en la disminución de la concentración de glucosa.

De esta misma manera, se han analizado los efectos para las demás variables de respuesta (celobiosa y xilosa). En el caso de la concentración de celobiosa, ésta va en disminución conforme aumenta el tiempo y la concentración de enzima y se obtiene una menor cantidad de celobiosa cuando se trabaja con un contenido de sólidos de 5 % p/v (Figuras 32, 33 y 34). Dicho comportamiento es esperado, puesto que durante la hidrólisis se va consumiendo la celobiosa. Para ésta variable, la cantidad de enzima (β_1), el tiempo (β_2), la interacción de estos dos factores (β_{12}) y la interacción del tiempo con la cantidad de harina de bagazo (β_{23}), tienen efectos significativos en la concentración de celobiosa obtenida (Tabla 21, Anexo A), siendo los dos efectos principales (β_1 y β_2) los que más influencia tienen en la disminución de la concentración ($\beta_1 = -0.20 \pm 0.01$ y $\beta_2 = -0.29 \pm 0.01$).

La concentración de celobiosa proporciona una forma de evaluar la hidrólisis enzimática ya que, si hay un remanente de celobiosa entonces hay una hidrólisis incompleta (Sluiter, 2008), lo cual indica que entre menor sea la concentración de celobiosa, mejor fue la hidrólisis enzimática, esto aunado al mejor rendimiento en la obtención de glucosa.

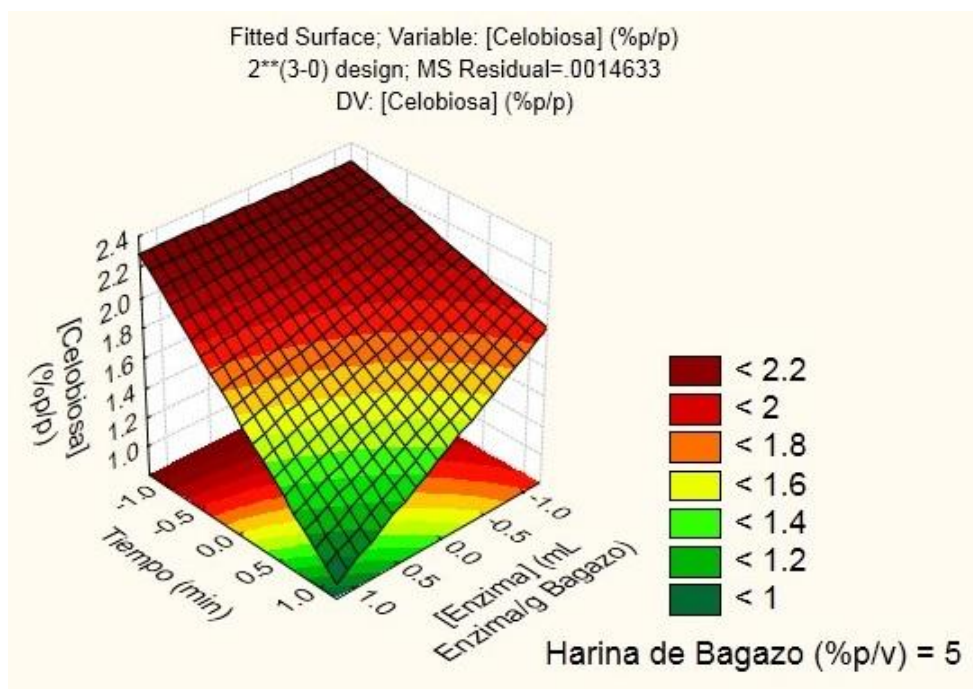


Figura 32. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima (mL/g_{Bagazo}) sobre la generación de celobiosa (Harina de bagazo = 5 % p/v).

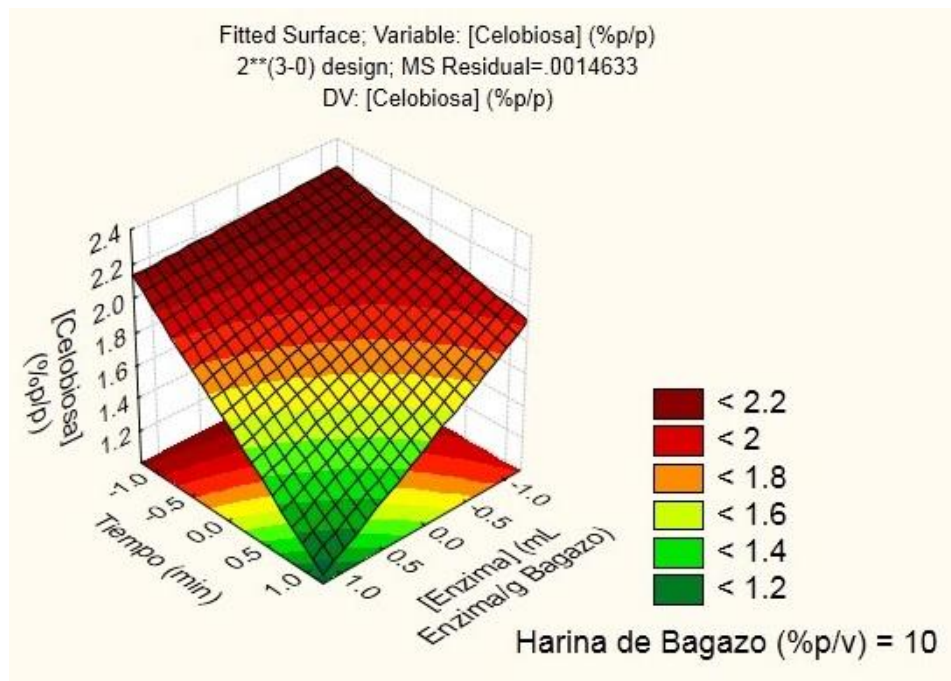


Figura 33. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima (mL/g_{Bagazo}) sobre la generación de celobiosa (Harina de bagazo = 10 % p/v).

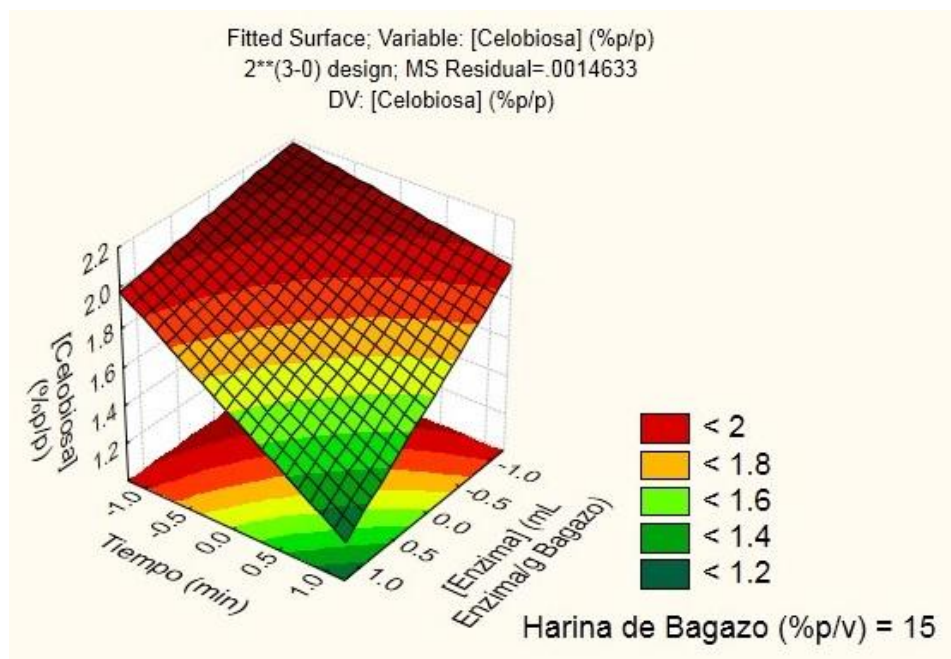


Figura 34. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima (mL/g_{Bagazo}) sobre la generación de celobiosa (Harina de bagazo = 15 % p/v).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el caso de la xilosa (Figuras 35, 36 y 37), la generación no fluctúa de manera importante. Se obtuvo xilosa en un intervalo de concentración de entre 0.361 y 0.520 % p/p lo cual hace difícil visualizar su comportamiento. De acuerdo al análisis de las superficies de respuesta, la concentración de xilosa aumenta conforme aumenta la concentración de enzima. Así, para una concentración de 0.3 mL_{enzima}/g_{bagazo} (Figura 35), la cantidad de xilosa aumenta mientras disminuyen el tiempo y la cantidad de harina de bagazo. Sin embargo, conforme va aumentando la concentración de la enzima (Figuras 36 y 37), la cantidad de xilosa también aumenta cuando el tiempo y la cantidad de harina de bagazo aumentan, creando dos máximos en los extremos de la superficie de respuesta. El único efecto que altera la concentración de xilosa de una forma significativa, es la interacción de los tres factores ($\beta_{123} = 0.043 \pm 0.008$; Tabla 22, Anexo A).

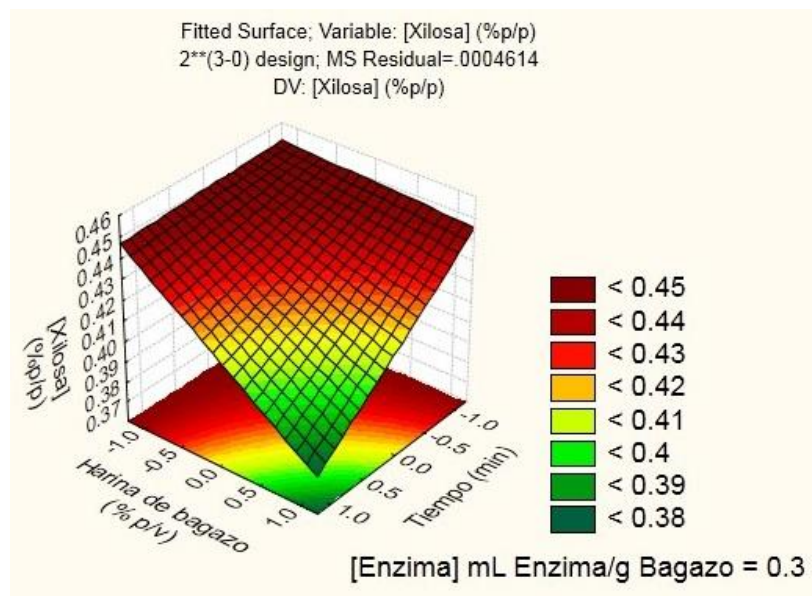


Figura 35. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de xilosa (Proporción de Enzima = 0.3 mL_{Enzima}/g_{Bagazo}).

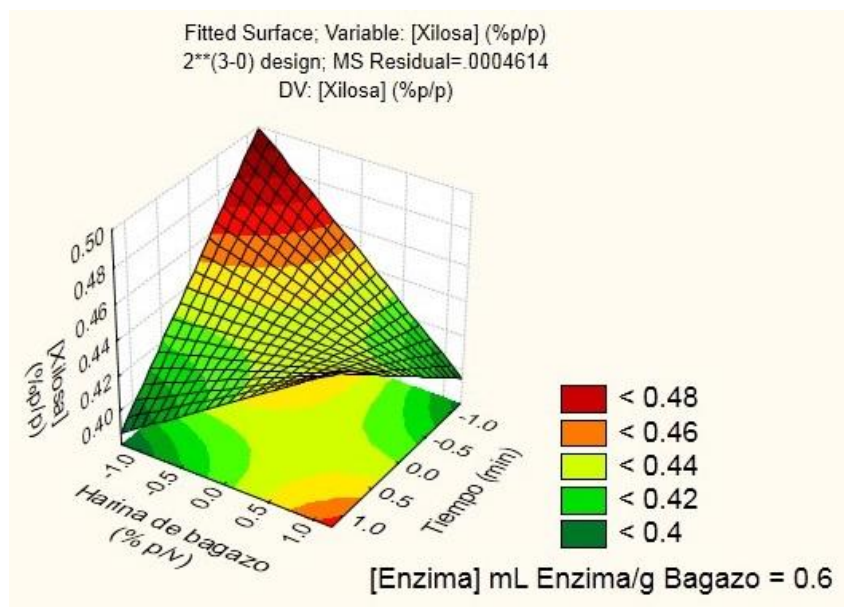


Figura 36. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de xilosa (Proporción de Enzima = 0.6 mL_{Enzima}/g_{Bagazo}).

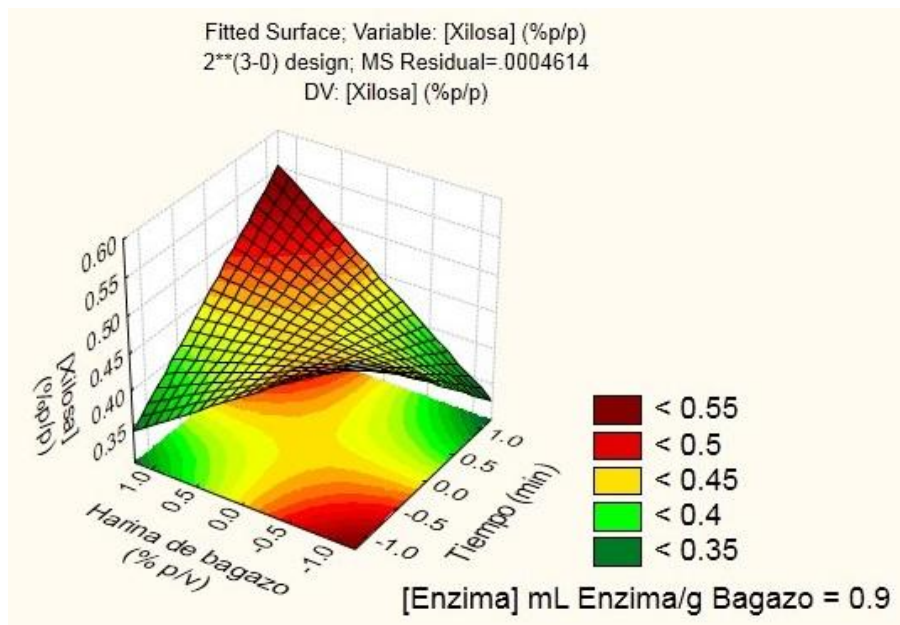


Figura 37. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de xilosa (Proporción de Enzima = 0.9 mL_{Enzima}/g_{Bagazo}).

El hecho de que la concentración de xilosa esté en un intervalo tan pequeño, puede deberse a que el diseño experimental se llevó a cabo con bagazo de sorgo sin pretratamiento, lo cual dificulta el acceso a las fibras tanto de celulosa como de hemicelulosa.

De acuerdo a los resultados del diseño experimental, las condiciones bajo las cuales se obtiene un mayor rendimiento de azúcares fermentables a etanol son: una proporción enzima/bagazo de $0.9 \text{ mL}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{bagazo}}$, un contenido de sólidos de 5 % p/v y un tiempo de hidrólisis de 120 min. Dichas condiciones son las del tratamiento 7 (Tabla 13) y coinciden con la mayor cantidad de glucosa obtenida que fue de 2.564 % p/p y la menor cantidad de celobiosa 1.086 % p/p. Se espera que estas cantidades aumenten y disminuyan respectivamente después de someter el material lignocelulósico a pretratamiento. En el caso de xilosa, ya que las concentraciones no variaron de manera importante, se espera que con el pretratamiento previo a la hidrólisis, la cantidad de xilosa obtenida aumente.

4.2. PRETRATAMIENTOS

Para favorecer un aumento de la producción de azúcares fermentables durante la hidrólisis enzimática, la biomasa lignocelulósica se sometió a pretratamiento con el fin de incrementar el acceso de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa. Se evaluaron 5 pretratamientos para elegir el más adecuado y que permitiera obtener una mayor cantidad de azúcares (Básico-Oxidante, Ácido diluido, Básico con NaOH, Básico con CaO y Ozonólisis).

4.2.1. Lignina soluble.

Para determinar la cantidad de lignina soluble resultante del pretratamiento, se consideró una constante de absorptividad (ϵ) de 25 L/g*cm y una longitud de onda de 240 nm (Sluiter, 2008). Lo anterior debido a que el perfil de absorbancia del bagazo de sorgo es similar al del bagazo de caña (Guzmán, 2012).

Tabla 15. Contenido de lignina soluble determinada para cada pretratamiento.

Pretratamiento	%Lignina Soluble
Ozonólisis	0.5856±0.006
Básico con CaO	1.0489±0.014
Básico-Oxidante	1.9903±0.028
Ácido diluido	2.7017±0.114
Básico con NaOH	4.1406±0.246

El contenido de lignina soluble (Tabla 15) que se determinó después de cada pretratamiento, fue mayor para el básico con NaOH (% LS = 4.1406±0.246) lo cual indica que fue el pretratamiento que mejor disolvió a la lignina. El pretratamiento alcalino en general, provoca la hinchazón de las fibras aumentando la superficie interna de éstas, disminuye su cristalinidad y hace más factible la separación del enlace lignina-carbohidrato (Oliva, 2003). Es importante señalar que éste pretratamiento también disuelve y degrada parte de la hemicelulosa presente, además de que actúa sobre las moléculas de lignina y hemicelulosa saponificando los enlaces éster intermoleculares de sus estructuras (Sun y Cheng, 2002). Como consecuencia de ello, la lignina se disuelve y se separa en el licor obtenido del pretratamiento, el cual es rico en compuestos fenólicos (Mussatto, 2010).

El siguiente pretratamiento con mayor contenido de lignina es el pretratamiento ácido diluido (% LS = 2.7017±0.114). Aunque es un pretratamiento relativamente fuerte, la lignina se disuelve en menor medida que en el pretratamiento básico con NaOH, su estructura es degradada, aumentando la susceptibilidad de la celulosa al ataque de las enzimas. A diferencia de otros pretratamientos, con el ácido

diluido, la mayoría de la hemicelulosa es hidrolizada de forma efectiva a azúcares (xilosa), lo cual ayuda a que los rendimientos de glucosa aumenten después de la hidrólisis enzimática, debido a la eliminación de casi el 100% de la hemicelulosa (Wyman, 2005).

Con el pretratamiento básico-oxidante, se obtuvo un contenido de lignina intermedio (% LS = 1.9903 ± 0.028). Este pretratamiento utiliza una solución alcalina para promover la rápida descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y como consecuencia se producen más radicales (OH^\cdot) y aniones superóxido (O_2^-), los cuales son responsables de la degradación de la lignina. De forma similar al pretratamiento alcalino con NaOH, durante la solubilización de la lignina por el H_2O_2 , parte de la hemicelulosa se elimina de la estructura del material (Musatto, 2010), además un aumento del pH hasta 12.5 resulta en la degradación de más del 50 % de la hemicelulosa (Kerley, 1988).

El pretratamiento básico con CaO, fue el segundo con un menor rendimiento en la solubilización de lignina (% LS = 1.0489 ± 0.014). Al ser un pretratamiento alcalino, se esperaba que solubilizara la lignina en grado similar al pretratamiento básico con NaOH, ya que se utilizó la misma concentración de cal que de hidróxido de sodio (1 %) y el mismo tiempo de tratamiento (1 h), sin embargo, no resultó ser así, se obtuvo una menor cantidad de lignina con este pretratamiento. Esto también se debe a las diferentes propiedades del álcali, por ejemplo, el CaO no sólo incrementa la alcalinidad con respecto al uso de $Ca(OH)_2$, sino que favorece la digestibilidad de la biomasa y contribuye a su conservación durante el pretratamiento. Además, la energía liberada por la formación del $Ca(OH)_2$ proveniente de la solubilización del CaO, es favorable para la aceleración de la reacción (Ximing, 2011). Sin embargo, estos efectos pueden estar ligados a la temperatura y tiempo de reacción, que si bien el tiempo de ambos pretratamientos básicos (NaOH y CaO) fue el mismo, la temperatura fue mucho más alta en el pretratamiento con NaOH (NaOH a $121^\circ C$ y CaO a $75-80^\circ C$), lo cual pudo favorecer aún más la solubilización de la lignina.

Otra diferencia del pretratamiento básico con CaO con respecto al de NaOH, es que el costo para tratar una determinada cantidad de biomasa, es menor si se utiliza cal que si se utiliza hidróxido de sodio (Brodeur, 2011). Los resultados de los pretratamientos alcalinos también dependen del contenido de lignina del material, el cual afecta su porosidad (Abril y Abril, 2009) y por lo tanto la susceptibilidad de éste al pretratamiento.

En cuanto a la ozonólisis, ya se ha mencionado con anterioridad que durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica pueden originarse una serie de compuestos que actúan como inhibidores potenciales de la fermentación (derivados de furfural, ácidos orgánicos, etc.), debido a las altas temperaturas y condiciones ácidas en las que se desarrollan algunos pretratamientos. La naturaleza y concentración de estos compuestos depende del tipo de materia prima, del pretratamiento utilizado y sus condiciones, así como de la utilización o no de catalizadores ácidos (Oliva, 2003). Una de las ventajas más importantes del pretratamiento con ozono es que además de que se realiza a temperatura y presión ambientales, no produce inhibidores de la fermentación (Abril y Abril, 2009). No obstante, este pretratamiento fue el que menos rendimiento tuvo en la obtención de lignina soluble (% LS = 0.5856 ± 0.006).

El ozono es un potente agente oxidante, es eficaz esencialmente en la degradación de lignina (Sun y Cheng, 2002). Se ha reportado que aproximadamente un 60 % de la lignina es removida en paja de trigo (Binder, 1980) con este pretratamiento, por esta razón, la tasa de hidrólisis enzimática se ve aumentada en un factor de 5 (Vidal y Molinier, 1988). La hemicelulosa por su parte, es ligeramente atacada mientras que la celulosa apenas se ve afectada. Por otro lado, una de las desventajas del proceso es que requiere una gran cantidad de ozono, lo cual aumenta mucho los costos (Sun y Cheng, 2002).

A pesar de que la ozonólisis se considera un método eficaz, en este trabajo mostró un menor rendimiento que los demás pretratamientos, lo cual se atribuye principalmente a las condiciones a las que se llevó a cabo, sobre todo a la

concentración de ozono con la que se trató la muestra y el tiempo de tratamiento. García-Cubero et. al. (2009), estudió este pretratamiento y determinó que la cantidad de lignina soluble aumenta notablemente después de las 2.5 h de tratamiento con un flujo de aire de 60 L/h con 2.7 % p/p de ozono. A comparación de las condiciones utilizadas durante este trabajo, tanto la concentración de ozono (0.051 % v/v) como el tiempo de reacción (1 h) son mucho menores, por lo que la cantidad de lignina soluble es muy baja. Probablemente un aumento en el tiempo del pretratamiento favorecería en gran medida los resultados.

De acuerdo a los resultados, el pretratamiento básico con NaOH sería el mejor en cuanto a la solubilización de la lignina. Además, algunas investigaciones (Xu, 2010) han mostrado que este pretratamiento tiene una de las mayores ventajas sobre otras tecnologías incluyendo pretratamientos como el ácido, la explosión de vapor, explosión de fibra de amoníaco (AFEX) y organosolv, ya que el pretratamiento con NaOH puede realizarse con eficacia incluso en temperaturas bajas (Ximing, 2011).

Por otro lado, hay que considerar que la utilización de temperaturas más suaves implicaría el uso de más reactivo y tiempos de reacción, lo cual podría poner en peligro la rentabilidad del proceso (Ximing, 2011). Una alternativa para evitar este efecto es la posibilidad de utilizar en conjunto NaOH y CaO como agentes alcalinos, de tal manera que hubiera un impacto positivo en el costo del pretratamiento; ya que, como se mencionó anteriormente, la cal es mucho más barata que el hidróxido y además contribuye con efectos favorecedores durante el pretratamiento como la aceleración de la reacción y la conservación de la biomasa. Además, la alta pérdida de sólidos que normalmente se produce durante el pretratamiento con NaOH, puede evitarse debido a la presencia de iones de calcio. Estos iones positivos (Ca^{2+}) proporcionan protección a la biomasa contra su solubilización por el ataque con NaOH, formando vínculos entre los componentes de la biomasa cargados negativamente (Ximing, 2011).

4.2.2. Efecto del pretratamiento sobre la estructura química de los polisacáridos. Caracterización mediante espectrofotometría de Infrarrojo.

En la actualidad, existen pocos estudios sobre los cambios en la estructura física, química y morfológica de la biomasa antes y después de su pretratamiento (Corredor, 2009). Los productos de degradación que se generan durante los pretratamientos, pueden dividirse en tres grupos: derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos (Oliva, 2003).

Como consecuencia, por ejemplo, de las altas temperaturas y empleo de catalizadores ácidos, se pueden originar derivados del furano como el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF), pero a su vez, estos compuestos se pueden degradar a otros productos como ácidos fórmico, levunílico y acético, o bien, pueden polimerizarse (Oliva, 2003).

En general, fueron pocos los cambios significativos que se observaron en las muestras con respecto a la muestra original de bagazo de sorgo, la cual no se sometió a ningún pretratamiento (Figura 38). En el espectro, se puede observar que la muestra sin pretratamiento, tiene una fuerte señal asociada con la absorción del estiramiento O-H, alrededor de 3300 cm^{-1} y dos señales prominentes alrededor de 2900 cm^{-1} debido al estiramiento C-H (Faix, 1992). En la región entre 900 y 1800 cm^{-1} hay muchas bandas de absorción asociadas a modos de vibración en hidratos de carbono y lignina (Faix, 1992; Pandey, 1999; Sun, 2005). Una señal entre 1732 - 1735 cm^{-1} es peculiar para la hemicelulosa ya que está relacionada con grupos alquil éster saturados (Faix, 1992; Sene, 1994) y grupos carbonilo de ácidos urónicos de la hemicelulosa (Adel, 2010). Entre menos perceptible se hace esta señal después del pretratamiento, significa que la hemicelulosa se ha removido por el pretratamiento aplicado (Corredor, 2009).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Title	**Bagazo Sorgo Aug 31 2011		Origin	IMP	Owner	Nicolet
File Name	D:\DOCUMENTS\TANIA-2011\TANIA IR\IR BAGAZO DE SORGO 31-08-11.JDX		Technique	Infrared	Date Stamp	11/08/31 13:47:01
Date	31 Aug 2011 13:53:24		Spectrum Range	399.1991 - 3999.7057		
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Arbitrary			
Points Count	1868	Data Spacing	1.9285			

2 Sep 2011

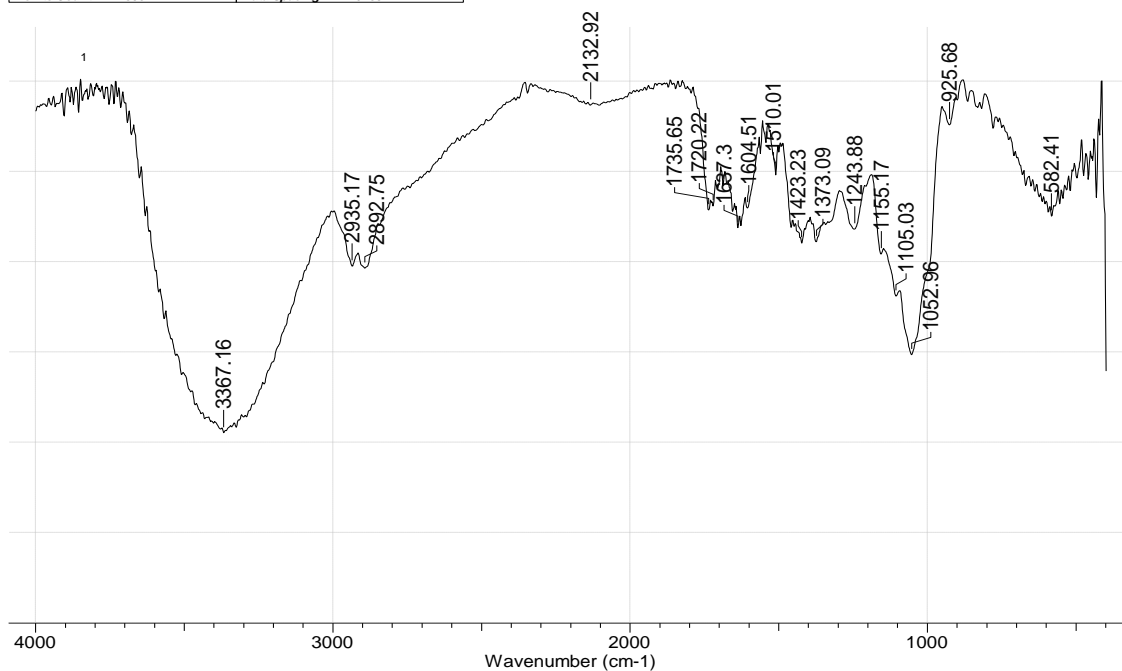


Figura 38. Espectro del bagazo de sorgo dulce sin pretratamiento.

Title	*Ozonólisis1 Aug 31 2011		Origin	IMP	Owner	Nicolet
File Name	D:\DOCUMENTS\TANIA-2011\TANIA IR\OZONÓLISIS1 31-08-11.JDX		Technique	Infrared	Date Stamp	11/08/31 14:04:25
Date	31 Aug 2011 14:07:10		Spectrum Range	399.1991 - 3999.7057		
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Arbitrary			
Points Count	1868	Data Spacing	1.9285			

2 Sep 2011

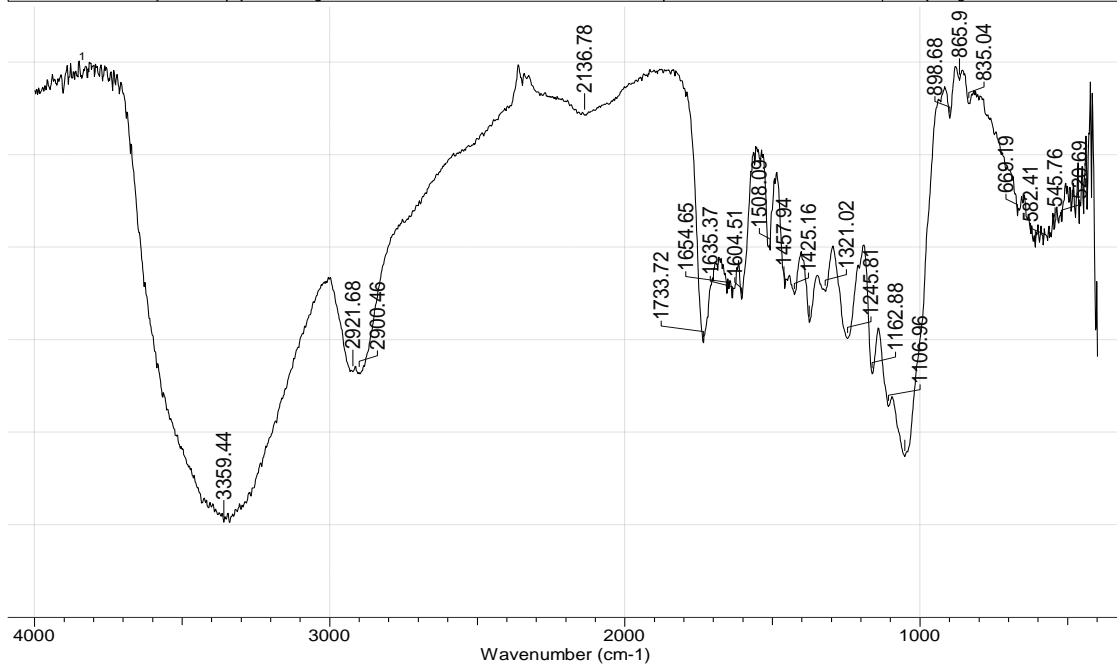


Figura 39. Espectro del bagazo de sorgo sometido a pretratamiento con ozono (Ozonólisis).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

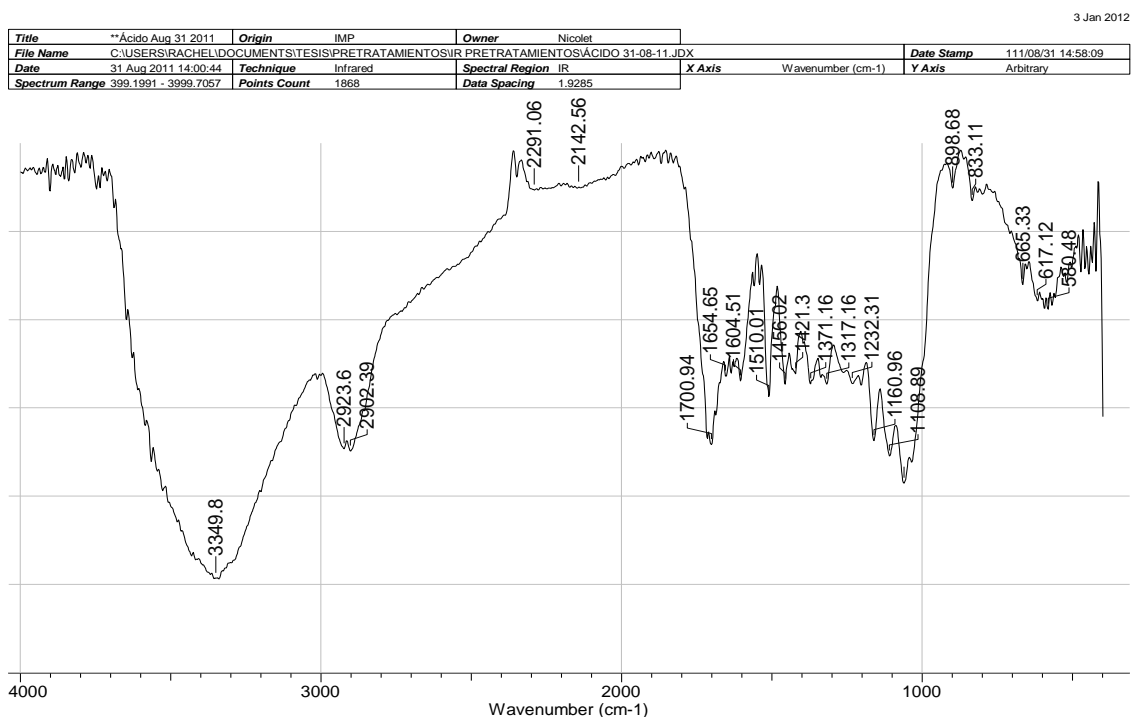


Figura 40. Espectro del bagazo de sorgo sometido a pretratamiento ácido diluido.

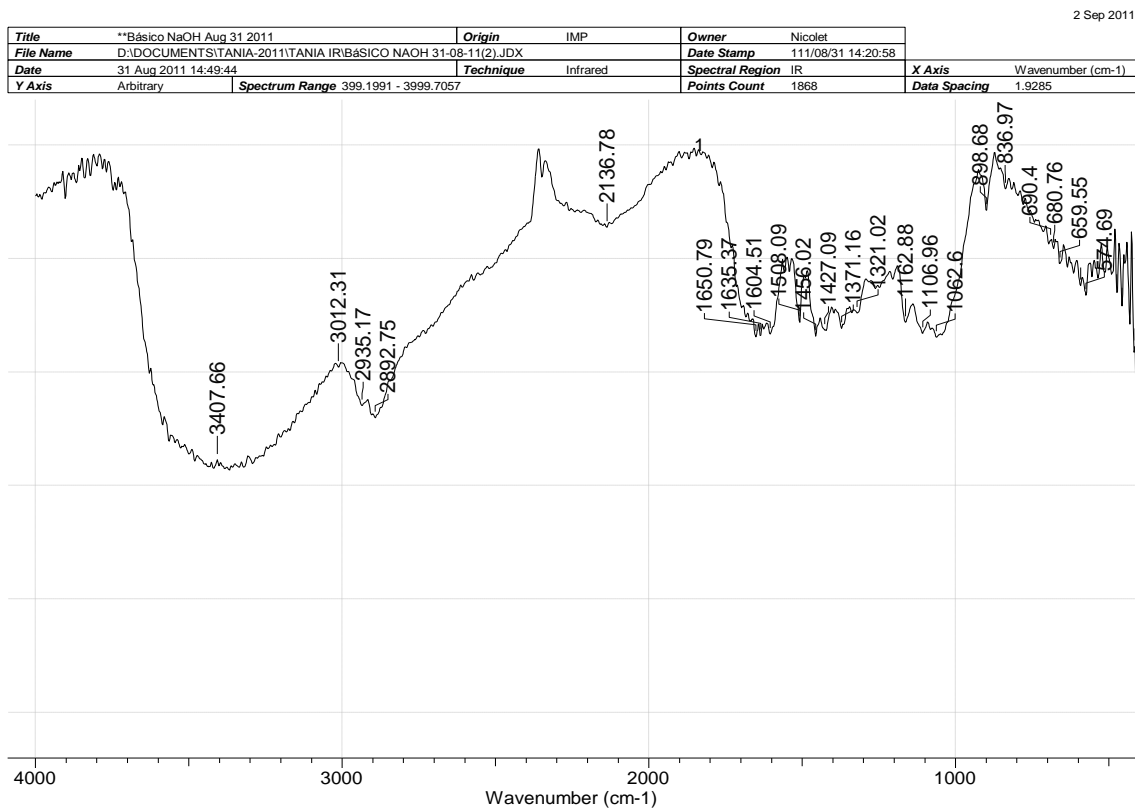


Figura 41. Espectro del bagazo de sorgo sometido a pretratamiento básico con NaOH.

Durante el pretratamiento, parte de la lignina se degrada originando una gran variedad de compuestos fenólicos. Entre ellos, se encuentran ácidos, aldehídos y alcoholes aromáticos (Oliva, 2003). Sin embargo, la presencia de éstos compuestos fenólicos, no sólo está relacionada con la degradación de lignina, sino también con la formación de melanoidinas por la reacción de Maillard de azúcares con proteínas, caramelización por sobrecalentamiento de los azúcares y la formación de furfural y HMF, que además dan un color café oscuro (Taherzadeh, 2007) tanto al licor del pretratamiento como al sólido pretratado.

La solubilización de algunos grupos fenólicos está acompañada por cambios en la región de los 1245 cm^{-1} y asociada con cambios en la región de los $1732\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$. Los cambios alrededor de los 1245 cm^{-1} están relacionados con la deformación C-O-H y el estiramiento C-O de fenoles, además del estiramiento asimétrico C-C-O de ésteres (Sene, 1994). La banda entre $1242\text{-}1247\text{ cm}^{-1}$ es común en las muestras de sorgo sin pretratamiento y su cambio sigue el mismo comportamiento que la señal en $1732\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$. Las señales en estas longitudes de onda se van desvaneciendo después del pretratamiento, confirmando la solubilización de grupos fenólicos y ésteres de la pared celular (Corredor, 2009). La solubilización de estos grupos indica la remoción de lignina de las muestras, éste comportamiento se puede analizar de manera muy representativa observando algunos de los espectros del bagazo de sorgo pretratado. Por ejemplo, en el espectro del bagazo sometido a ozonólisis (Figura 39), podemos ver que las dos señales anteriormente mencionadas, aún están presentes al igual que en la muestra sin pretratamiento (Figura 38). En cambio, estas señales ($1242\text{-}1247\text{ cm}^{-1}$ y $1732\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$) se han desvanecido en gran medida en el espectro del bagazo de sorgo del pretratamiento ácido diluido (Figura 40) y del básico con NaOH (Figura 41). Esto coincide con los resultados obtenidos para lignina soluble (Sección 4.2.1) y el rendimiento de azúcares fermentables (Sección 4.2.4) en donde el pretratamiento con ozono es el menos eficiente, seguido del básico con CaO, básico-oxidante, ácido diluido y básico con NaOH, que remueven la lignina en forma creciente en ese orden.

Por otro lado, la presencia de señales alrededor de los 1700 cm^{-1} después del pretratamiento, son características del estiramiento C=O de fenil ésteres de la lignina remanente en las muestras (Faix, 1992; Sun, 2005). Ésta señal es más notoria en el caso de la muestra sometida al pretratamiento ácido diluido (Figura 40) ya que el grupo fenil éster es completamente estable en medio ácido (Lira, 2007), en cambio, para el pretratamiento básico con NaOH (Figura 41), la banda está completamente desvanecida debido a que su rompimiento por acción de un álcali es mucho más rápido. Además, este grupo es muy susceptible al ataque del ión peróxido a pH básicos (Lira, 2007) por lo que es fácilmente degradado durante el pretratamiento básico-oxidante.

Las bandas en 1604 cm^{-1} que aparecen en todas las muestras y alrededor de 1638 cm^{-1} , son señales de compuestos fenólicos. La banda cerca de 1638 cm^{-1} está asociada a un anillo aromático, mientras que la banda en 1604 cm^{-1} está relacionada con el doble enlace α - β de grupos propanoicos laterales de la estructura de la lignina (Sene, 1994). Nuevamente, la persistencia de éstas bandas después del pretratamiento, indican la presencia de lignina remanente en las muestras sólidas.

En la zona alrededor de 1640 cm^{-1} , la intensidad de algunos los picos puede deberse al contenido de agua en las muestras (Kobayashi, 1999), que si bien fueron secadas en horno a $40\text{-}50^\circ\text{C}$, pudieron retenerla debido al pretratamiento al que fueron sometidas.

Las señales relacionadas con la celulosa pueden verse en las zonas alrededor de $1426\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$ para el plano de deformación asimétrico C-H (Pandey, 1999), de 897 a 900 cm^{-1} aparecen las vibraciones de celulosa amorfa y estiramiento del anillo de glucosa (Pandey, 1999; Stewart, 1995; Michell, 1990); entre 1098 y 1109 cm^{-1} hay señales de vibración C-O de celulosa cristalina y estiramiento de los anillos de glucosa de la celulosa (Pandey, 1999; Stewart, 1995).

Es interesante observar el comportamiento de las señales de celulosa cristalina ($1098\text{-}1109\text{ cm}^{-1}$) y amorfa ($897\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). En la muestra sin pretratamiento, las

señales de celulosa cristalina son más intensas que las señales de celulosa amorfa y conforme los pretratamientos son más severos las señales en la zona $897-900\text{ cm}^{-1}$ se van haciendo más evidentes. Las señales de celulosa cristalina son más intensas en la muestra sin pretratar y en la pretratada con ozono, mientras que para el pretratamiento básico con NaOH esta señal es mucho más pequeña, lo cual denota que el pretratamiento ha contribuido a reducir la cristalinidad de la celulosa en la muestra. La aparición de picos cristalinos y/o amorfos también indican que la celulosa ha sido expuesta por el pretratamiento aplicado (Corredor, 2009).

Las señales entre $1370-1375\text{ cm}^{-1}$ se deben a la deformación simétrica C-H de la celulosa (Pandey, 1999; Stewart, 1995) en muestras no pretratadas (Corredor, 2009). Después del pretratamiento, las señales de éstas zonas disminuyen de intensidad conforme el pretratamiento es más fuerte, sin embargo, la diferencia entre las muestras pretratadas y la original no es muy notable. La disminución de estas señales después del pretratamiento sugiere que parte de la celulosa se degrada durante el pretratamiento (Corredor, 2009) pero en muy poca cantidad.

Las diferencias del efecto de los pretratamientos sobre la estructura del material lignocelulósico, se hacen más evidentes al comparar la muestra original, y los pretratamientos considerados hasta ahora como el menos y el más eficiente (Ozonólisis y básico con NaOH). El análisis por espectroscopía de infrarrojo sugiere que el pretratamiento básico con NaOH remueve lignina en mayor cantidad y deja zonas de la celulosa accesibles por lo que es más susceptible el ataque enzimático, lo cual favorece el aumento del rendimiento de la hidrólisis enzimática.

4.2.3. Efecto del pretratamiento sobre la cristalinidad de la celulosa. Difracción de Rayos X.

La cristalinidad, morfología y superficie accesible del material lignocelulósico, son los principales factores físicos y estructurales que afectan la hidrólisis enzimática y el pretratamiento (Liu, 2005; Laureano-Perez, 2005). Por ello, junto con la espectroscopía infrarroja, la difracción de Rayos X se utiliza para determinar cambios en la estructura y composición química del bagazo de sorgo antes y después del pretratamiento (Corredor, 2009).

Los principales componentes químicos de la biomasa lignocelulósica son la celulosa, que está formada por regiones cristalinas separadas por regiones menos cristalinas o amorfas; la hemicelulosa y la lignina, que son estructuras amorfas. Las zonas que presentan elevada cristalinidad son difíciles de penetrar por disolventes y reactivos, por el contrario, las zonas relativamente más desordenadas o amorfas, son más accesibles y más susceptibles a todas las reacciones químicas y favorecen el hinchamiento de las fibras (Roncero, 2001).

No parece existir una clara diferenciación entre zonas cristalinas y no cristalinas y en principio, puede pensarse en una transición gradual de una región a otra (región paracristalina, Mitra y Mukherjee, 1980). Esta transición puede darse por el efecto del pretratamiento al que es sometido el material lignocelulósico, permitiendo relacionar la cristalinidad con el efecto positivo del pretratamiento.

En la figura 42, se observan los patrones de difracción obtenidos para la muestra sometida a varios pretratamientos y sin pretratamiento. Las señales máximas que se observan son producidas por reflexiones específicas de las regiones cristalinas de la celulosa (Roncero, 2001).

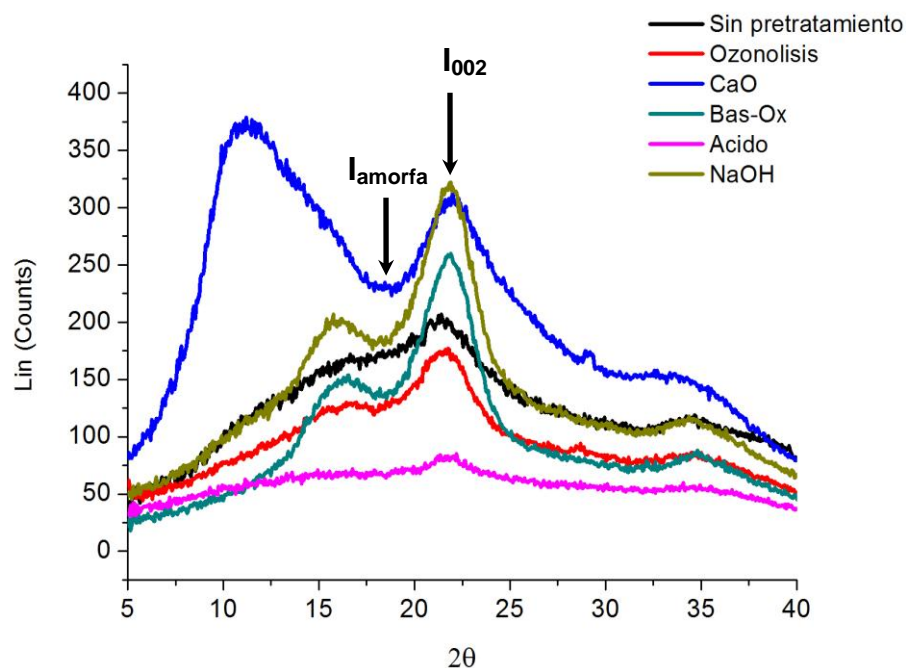


Figura 42. Patrones de Difracción de Rayos X del bagazo de sorgo sin pretratamiento y sometido a distintos pretratamientos.

La relación entre la intensidad de difracción de las zonas cristalina y amorfa, es aproximadamente igual a la relación de las masas de la parte amorfa y cristalina del polímero (Kasai, 2005). La disminución de la cristalinidad del material se ha asociado con una reducción de la cristalinidad de la celulosa en unos casos y en otros con el alto contenido de material amorfo (Liu, 2005).

En la muestra sin pretratamiento, se puede observar un patrón de difracción en el que predomina la parte amorfa sobre la cristalina, probablemente debido a un alto contenido de celulosa amorfa y materiales amorfos como la hemicelulosa (Corredor, 2009) y la lignina. En cambio, después del pretratamiento, el pico principal relativo al plano 002 (región cristalina; Corredor, 2009) se observa más claro en todas las muestras, a excepción de la sometida al pretratamiento ácido diluido. Esto muestra que la relación de celulosa cristalina incrementó debido a la

eliminación de lignina y hemicelulosa de las muestras (Corredor, 2009) y/o a la eliminación de celulosa menos ordenada (Evans, 1995; Roncero, 2001).

En el patrón de difracción del pretratamiento básico con NaOH, la señal correspondiente a la zona cristalina es más evidente, mientras que para el pretratamiento de ozonólisis la señal es más débil. Lo anterior también confirma qué pretratamiento es más eficaz para exponer la celulosa al ataque enzimático (Corredor, 2009). Ahora bien, tal conclusión no es definitiva para todos los pretratamientos, ya que en el caso del pretratamiento ácido diluido, el hecho por el cual la zona amorfa predomina, se atribuye a otra razón. La baja intensidad de los picos cristalinos sugiere que el pretratamiento fue efectivo para transformar la celulosa cristalina en amorfa (Corredor, 2009; Mitra y Mukherjee, 1980) o bien, que la severidad del pretratamiento no sólo remueve lignina e hidroliza hemicelulosa, sino que también ataca y remueve parte de la celulosa cristalina del material. Durante el pretratamiento ácido diluido, las microfibrillas de celulosa son parcialmente hidrolizadas, preferentemente en las regiones amorfas (Thompson, 1989) pero también en las zonas cristalinas (Evans, 1995; Roncero, 2001), a esto se debe la disminución de la señal.

En el caso de la muestra sometida al pretratamiento básico-oxidante, tenemos un patrón de difracción que muestra la exposición de la región cristalina del material a comparación de la muestra sin pretratamiento. Además, la señal de la región cristalina es intermedia entre los pretratamientos básico con NaOH y ozonólisis, lo cual sugiere que dicho pretratamiento podría tener una mayor capacidad que la ozonólisis para remover los componentes amorfos de la muestra, pero menor capacidad que el básico con NaOH.

En la muestra del pretratamiento básico con CaO, se obtuvo un patrón de difracción distinto al de los demás pretratamientos. Como se observa en la Figura 42, se obtiene una señal de una zona cristalina en $2\theta = 10-15^\circ$, la cual no corresponde a ninguna forma cristalina esperada de la celulosa en este tratamiento (Johnson, 2010). Pero es importante resaltar que el pretratamiento

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

alcalino puede causar la solubilización, redistribución, y condensación de lignina, así como la modificación del estado cristalino de la celulosa. Este efecto, además de que puede disminuir o contrarrestar los efectos positivos de la eliminación de lignina, puede impedir en cierta medida, la hinchazón de las fibras de celulosa (Gregg y Saddler, 1996; Hendriks y Zeeman, 2009). Además, la hemicelulosa, aunque es fácilmente hidrolizable y nunca forma agregados, puede cocrystalizar con la celulosa (Roncero, 2001). Por lo anterior, se cree que dicho pretratamiento originó alguna forma cristalina que presenta ese patrón de difracción.

Para confirmar las diferencias entre los pretratamientos, hechas en base a los comportamientos de los patrones de difracción, estos se pueden analizar mediante los índices de cristalinidad (IC) determinados (Tabla 16) (Ver sección 3.3.4.8).

Tabla 16. Índice de Cristalinidad del bagazo de sorgo sin pretratamiento y sometido a distintos pretratamientos.

<i>Bagazo de sorgo</i>	<i>Índice de Cristalinidad (% IC)</i>
Sin pretratamiento	17.5
Ozonólisis	33.1
Básico con CaO	28.7
Básico-Oxidante	48.8
Ácido diluido	24.7
Básico con NaOH	45.3

El aumento del índice de cristalinidad significa que la fracción cristalina es mayor que la fracción amorfa en la muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos observar que para todos los pretratamientos el % IC es mayor que en la muestra original o sin pretratamiento, lo cual confirma que este aumento en la cristalinidad se debe a la eliminación de la fracción amorfa de la muestra.

Si observamos los valores de % IC obtenidos, podemos notar que se tienen los valores más altos para los pretratamientos básico con NaOH y básico-oxidante (45.3 y 48.8 %), lo que significa que con ambos pretratamientos se removió en

mayor medida el material amorfo. Además, contrario a lo que se pensaba, el pretratamiento básico-oxidante, no parece tener una menor capacidad que el básico con NaOH para remover los componentes amorfos, ya que incluso tiene el índice de cristalinidad más alto.

La muestra sometida a ozonólisis tiene un % IC intermedio (33.1 %). Al observar su patrón de difracción (Figura 42), podemos ver que su región amorfa es más pronunciada y la cristalina es relativamente débil a comparación de los dos pretratamientos antes mencionados.

Las muestras de los pretratamientos básico con CaO y ácido diluido son las de % IC de menor valor (28.7 y 24.7 % respectivamente). En el caso del pretratamiento básico con CaO, como ya se mencionó, se obtuvo un patrón de difracción donde es difícil apreciar qué tanto predomina la zona amorfa sobre la cristalina y viceversa, pero el valor del índice de cristalinidad indica que la parte amorfa predomina más que en los demás pretratamientos. Lo anterior indica que durante éste pretratamiento, no se removieron los componentes amorfos (hemicelulosa y lignina) en la misma medida que en el básico-oxidante y el básico con NaOH, y tampoco se dejó tan expuesta la celulosa. Para el caso de la muestra sometida al pretratamiento ácido diluido, se tiene el menor valor de % IC de las muestras pretratadas, se podría pensar que es porque la celulosa no quedó lo suficientemente expuesta y la región amorfa predomina sobre la cristalina, pero al observar el patrón de difracción, podemos ver que la zona cristalina es casi imperceptible, lo que significa que la parte cristalina de la celulosa se degradó o transformó en celulosa amorfa, ésta es la razón de que el índice de cristalinidad disminuya y no que los componentes amorfos no hayan sido removidos.

Se ha sugerido que la parte amorfa de la celulosa es más accesible y se degrada más fácilmente que las regiones cristalinas, las cuales son menos accesibles (Fan, 1980; Baker, 1973; Ioelovich, 2011). Pero como puede verse en este estudio, no hay una clara relación entre el análisis de difracción de rayos X y los resultados hasta ahora obtenidos para lignina soluble, la cantidad de azúcares fermentables

obtenida y el análisis por espectroscopía de infrarrojo; ya que el pretratamiento con el que se obtiene un mayor rendimiento en la hidrólisis enzimática (básico con NaOH; Ver sección 4.2.4) es uno de los que tienen mayor índice de cristalinidad (45.3 %), mientras que el pretratamiento con el que se obtiene un menor rendimiento en la hidrólisis tiene un % IC intermedio. Este comportamiento se ha estudiado para distintos sustratos lignocelulósicos, y se ha encontrado que la hidrólisis no es tan dependiente del IC (Thompson, 1989) como de otros factores, tal es el caso de la superficie de contacto, que se considera como un factor más importante, al menos en las primeras etapas de la hidrólisis (Lee y Fan, 1983).

Algunas investigaciones (Marsden, 1983; Puri, 1984), han informado que los materiales lignocelulósicos pretratados y que resultan con mayor cristalinidad, pueden tener tasas y alcances de hidrólisis más altos que materiales no pretratados con menor cristalinidad. Además, la naturaleza cristalina de la celulosa no debe ser un impedimento a la hidrólisis enzimática, como han demostrado las preparaciones enzimáticas de varios hongos, las cuales hidrolizan celulosa cristalina sin problemas. La hidrólisis de la celulosa se lleva a cabo por tres tipos de enzimas, exo- y endo- β -1,4 glucanasas y β -1,4 glucosidasas, las cuales, cuando actúan en conjunto, pueden degradar completamente la celulosa cristalina, en cambio, pierden ésta capacidad si actúan por separado (Wood, 1981; Puri, 1984).

Por ello, se piensa que el aumento en la cristalinidad se debe a la eliminación de material amorfo y que el valor del IC probablemente no es tan importante como se pensaba (Thompson, 1989), al menos para poder predecir qué pretratamiento favorecerá el aumento del rendimiento en la producción de azúcares fermentables. Sin embargo, el análisis mediante difracción de rayos X permite evaluar el efecto del pretratamiento sobre la estructura del material lignocelulósico, permitiendo aportar gran información de lo que está sucediendo durante el pretratamiento.

4.2.4. Hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo sujeto a pretratamiento. Cuantificación de azúcares mediante HPLC.

Después del pretratamiento se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico bajo las condiciones determinadas en el diseño de experimentos:

Tiempo: 2 h; Proporción de enzima: 0.9 mL_{Enzima E7}/g_{Bagazo}; Harina de bagazo: 5 % p/v.

Los azúcares se cuantificaron por HPLC acoplado a un detector de dispersión de luz evaporativa, y haciendo la correspondiente corrección anhidra.

Tabla 17. Concentración de azúcares determinados por HPLC después de la hidrólisis enzimática con el coctel enzimático E7 del bagazo de sorgo pretratado y sin pretratamiento y contenido de lignina soluble.

Bagazo sometido a:	[Xilosa] %p/p	[Glucosa] %p/p	[Celobiosa] %p/p	%Lignina Soluble
Sin pretratamiento	0.361±0.18	2.564±0.12	1.086±0.16	--
Ozonólisis	2.419±0.187	7.262±1.47	1.511±0.288	0.5856±0.006
Básico con CaO	5.083±0.007	7.293±1.63	0.939±0.016	1.0489±0.014
Básico-Oxidante	5.132±0.012	9.366±1.25	0.751±0.061	1.9903±0.028
Ácido diluido	0	10.231±0.082	4.405±0.456	2.7017±0.114
Básico con NaOH	17.128±0.040	18.125±0.205	5.514±0.033	4.1406±0.246

Como se puede observar en la tabla 17, la concentración de glucosa y xilosa va en aumento correspondiendo con la cantidad de lignina soluble obtenida para cada pretratamiento, lo cual confirma el hecho de que entre más lignina fue removida, las fibras de celulosa y hemicelulosa quedaron más susceptibles a la hidrólisis enzimática. Uno de los factores que afectan la hidrólisis de la biomasa

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

lignocelulósica, es la asociación de las cadenas de celulosa con otros polímeros y estructuras protectoras que están presentes en la pared celular como la lignina, pectinas, hemicelulosa, proteínas, elementos minerales, etc. (Tahezadeh, 2007).

El rendimiento es notablemente mayor con el pretratamiento básico con NaOH para ambas concentraciones de azúcares (xilosa 10.231 ± 0.082 % p/p y glucosa 18.125 ± 0.205 % p/p). Esto nos sugiere que dicho pretratamiento es el más adecuado para mejorar la eficiencia de la hidrólisis enzimática.

Después del básico con NaOH, el pretratamiento con el que se obtiene un mayor rendimiento, es el ácido diluido. Este pretratamiento, además de que consigue solubilizar la lignina en menor medida que el pretratamiento básico con NaOH, presenta una desventaja frente a otros tipos de pretratamientos: la degradación de los azúcares durante la hidrólisis y la formación de productos indeseables. Estos derivados, no solamente disminuyen el rendimiento de los azúcares sino que inhiben severamente la producción de etanol durante el proceso de fermentación (Tahezadeh, 2007). Algunos de estos potenciales inhibidores son el furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido levunílico, acético, fórmico, urónico, vainillínico, vainillina, fenol, formaldehído, etc. (Larsson, 2000; Tahezadeh, 2007). Por otro lado, como puede observarse en la tabla 17, no se pudo cuantificar la concentración de xilosa, esto se debe a que la mayor parte de la hemicelulosa puede ser hidrolizada durante este pretratamiento a temperaturas menores a los 200°C (Tahezadeh, 2007) y la xilosa se pierde en el lavado que se realiza posterior al pretratamiento, de tal manera que después de la hidrólisis ya no hay xilosa que cuantificar.

Para el resto de los pretratamientos, el rendimiento en las concentraciones de xilosa y glucosa, disminuye en gran medida a comparación de los dos pretratamientos anteriormente mencionados, por lo cual se consideran menos eficientes. Sin embargo, cabe mencionar que a pesar de su bajo rendimiento, todos los pretratamientos fueron capaces de aumentar las concentraciones de

glucosa y xilosa obtenidas en la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo sin pretratamiento, que fueron 2.564 y 0.520 % p/p, respectivamente.

Por otro lado, la hidrólisis de celulosa produce celobiosa en una primera etapa y posteriormente glucosa (Seyhan, 2000); por esta razón, se esperaba que entre más fuerte fuera el pretratamiento y más lignina removiera, más eficiente fuera la hidrólisis y por lo tanto disminuyera la concentración de celobiosa. Observando las concentraciones de celobiosa en la tabla 17, para los pretratamientos de ozonólisis, básico con CaO y básico-oxidante, la concentración sigue una tendencia de mayor a menor como se esperaba. Pero para los pretratamientos ácido diluido y básico con NaOH, la concentración vuelve a aumentar y es incluso mayor que en la ozonólisis, en la cual se esperaba la mayor concentración de celobiosa. En este caso, se puede considerar una hidrólisis incompleta puesto que el remanente de celobiosa es mayor que en los demás pretratamientos y este comportamiento puede atribuirse a que ambos, ácido diluido y básico con NaOH, son los pretratamientos más fuertes, los que más lignina removieron y en los que se obtuvo el mayor rendimiento de glucosa. Esto indica que las fibras de celulosa estuvieron más susceptibles al ataque enzimático, produciendo la mayor concentración de celobiosa en una primera etapa de la hidrólisis y finalmente produciendo más glucosa, sin embargo, durante el proceso enzimático no toda la celobiosa fue hidrolizada a glucosa, quedando una mayor concentración que en los demás pretratamientos.

Finalmente y de acuerdo a los resultados obtenidos, se puede considerar al pretratamiento básico con NaOH como el más adecuado para obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables a partir de bagazo de sorgo dulce.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

1.- Con la realización de un diseño factorial completo 2^3 , fue posible evaluar la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo sin pretratamiento. Se determinaron las condiciones óptimas de proporción de enzima, tiempo de reacción y contenido de harina de bagazo, para llevar a cabo la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo a 50°C , obteniendo el mejor rendimiento de azúcares fermentables.

2.- De acuerdo al diseño experimental, durante la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo sin pretratar, los dos factores que tienen un efecto significativo en la obtención de glucosa y celobiosa, son la proporción de enzima y el tiempo de reacción, ya que al aumentar estas dos variables, la concentración de dichos azúcares aumenta y disminuye, respectivamente. El contenido de sólidos, no tuvo un impacto significativo en el rendimiento de azúcares; sin embargo, el aumento de ésta variable disminuye la concentración de glucosa obtenida, por lo que es más conveniente mantener el 5 % p/v de harina de bagazo.

3.- Ningún factor por sí solo mostró un efecto significativo sobre la generación de xilosa en la hidrólisis enzimática.

4.- Las condiciones establecidas como las más adecuadas para la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo sin pretratar, a una temperatura fija de 50°C , utilizando el coctel enzimático E7, son: $0.9 \text{ mL}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{bagazo}}$, 5 % p/v de harina de bagazo y 2 h de reacción enzimática.

5.- Someter el bagazo de sorgo dulce a un pretratamiento, incrementa de manera potencial el rendimiento de azúcares fermentables.

6.- De los cinco pretratamientos evaluados, el pretratamiento que removió en mayor medida la lignina, fue el básico con NaOH. El menos eficaz fue la ozonólisis pero se cree que una modificación en el tiempo de reacción y concentración de O_3 , favorecería el efecto positivo del pretratamiento.

7.- La caracterización por medio de espectrofotometría de infrarrojo, señala al pretratamiento básico con NaOH como el que más lignina logra remover. Los cambios en la estructura del material lignocelulósico se hacen más notables

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

conforme el pretratamiento es más severo y las señales de absorbancia evidencian la presencia de grupos fenólicos provenientes de la lignina solubilizada, así como de los residuos de hemicelulosa removida.

8.- Es difícil afirmar si el aumento en la digestibilidad enzimática se debe exclusivamente a la reducción de cristalinidad, como han sugerido algunos autores, o puede ser causado por otros cambios físicos. En este trabajo, se ha concluido que la digestibilidad de la biomasa en general, es producto de varios factores en conjunto, como el tamaño de partícula, el aumento en la superficie de contacto, la remoción de lignina y hemicelulosa, la exposición de las fibras de celulosa, etc., en lugar de la reducción de cristalinidad. De hecho, los resultados obtenidos en el análisis de difracción de rayos X, indican que el aumento de cristalinidad por un lado, se da por la remoción de material amorfo y por otro lado, por la transición de celulosa cristalina a amorfa, pero el efecto depende del pretratamiento que se utilice, en la medida en que el pretratamiento remueva hemicelulosa y lignina y deje expuesta la celulosa para el ataque enzimático y por lo tanto, la reducción de cristalinidad es independiente para cada uno de ellos, por lo que es difícil relacionar ésta característica con el rendimiento de azúcares fermentables. En cambio, éste análisis permitió evaluar el efecto que tiene el pretratamiento sobre el material lignocelulósico y esclarecer a qué se debe el aumento o disminución de cristalinidad en cada uno de ellos.

9.- La cantidad de azúcares fermentables aumenta considerablemente a medida que se remueve el material amorfo (hemicelulosa y lignina) de la biomasa, siendo el pretratamiento básico con NaOH, el que proporciona el mejor rendimiento tanto de xilosa como de glucosa.

10.- La alta concentración de celobiosa obtenida durante el pretratamiento básico con NaOH, confirma que la celulosa se degrada en mayor medida con éste pretratamiento, sin embargo, también indica una hidrólisis incompleta.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

11.- Se sugiere estudiar la hidrólisis enzimática con el coctel E7 en un intervalo de tiempo que comprenda más allá de las 2 horas, para evaluar su actividad sobre el remanente de celobiosa y evitar una hidrólisis incompleta.

12.- Se recomienda una evaluación más profunda de los pretratamientos con los que se obtuvo un menor rendimiento en la obtención de azúcares fermentables, pero que, sin embargo, presentan grandes ventajas como lo es el bajo costo en el caso del básico con CaO y que no provoquen la formación de derivados que inhiban la fermentación, como en el caso de la ozonólisis. Una optimización del proceso del pretratamiento, podría representar una alternativa rentable y con potencial para la producción de azúcares fermentables a etanol.

13.- Durante el presente estudio, sólo se evaluaron tanto el pretratamiento como la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo dulce, para optimizar la obtención de azúcares fermentables, pero es importante enfocar un estudio hacia la fermentación de estos azúcares y evaluar la obtención de bioetanol en futuras investigaciones.

ANEXO A

- Identificación de azúcares por HPLC.

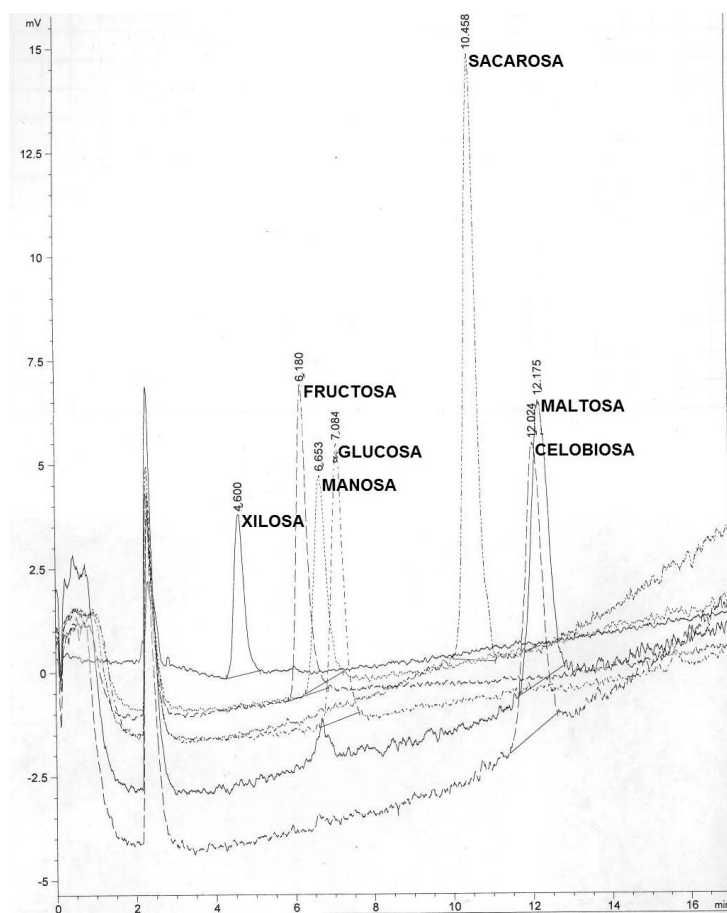


Figura 43. Cromatograma de una mezcla de azúcares para su identificación por HPLC.

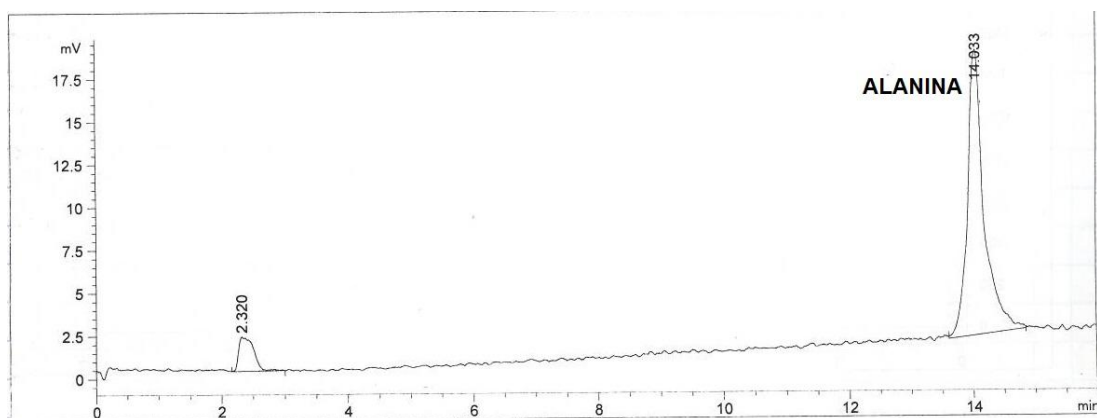


Figura 44. Cromatograma del estándar interno (Alanina).

Tabla 18. Tiempo de retención de los diferentes azúcares y del estándar interno.

<i>Estándar</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>
Alanina (EI)	14.033
Xilosa	4.600
Fructosa	6.180
Manosa	6.653
Glucosa	7.084
Sacarosa	10.458
Celobiosa	12.024
Maltosa	12.175

- **Curvas de calibración de azúcares para el método DNS y HPLC con estándar interno.**

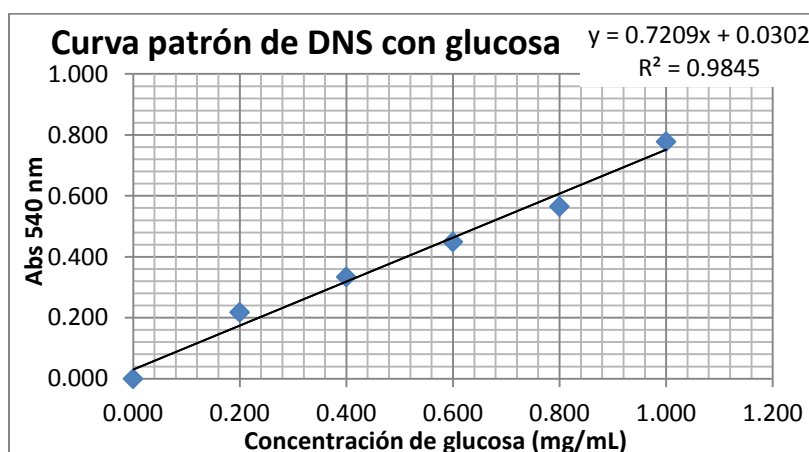


Figura 45. Curva patrón de DNS.

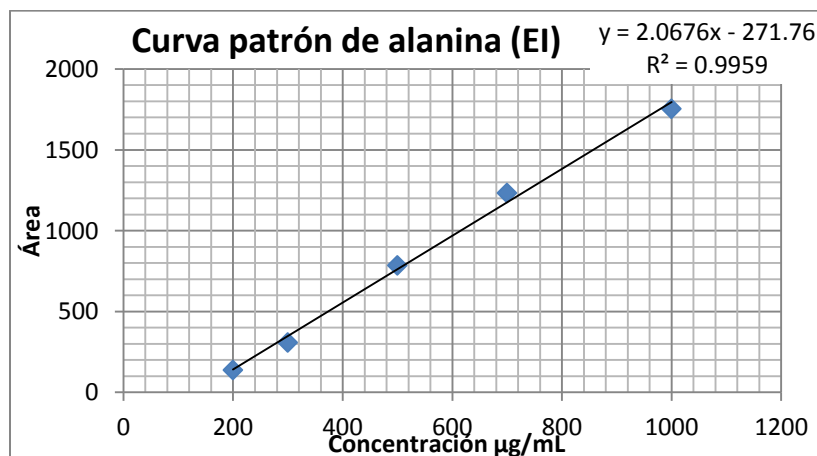


Figura 46. Curva patrón de alanina (Estándar Interno).

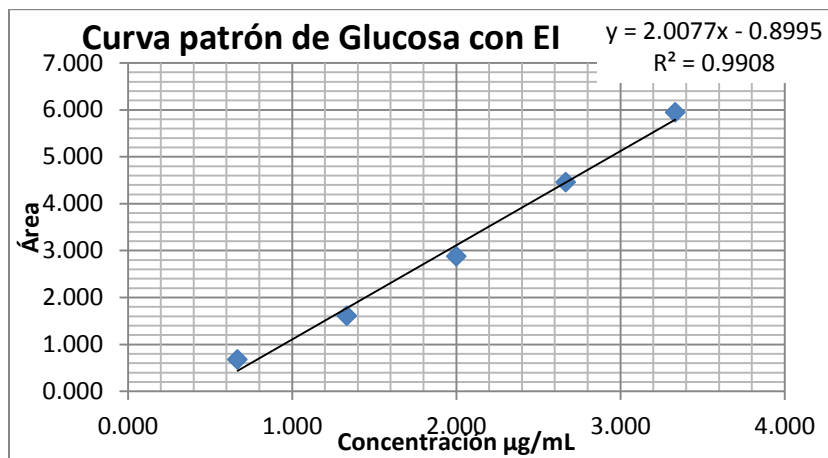


Figura 47. Curva patrón de glucosa con EI para HPLC.

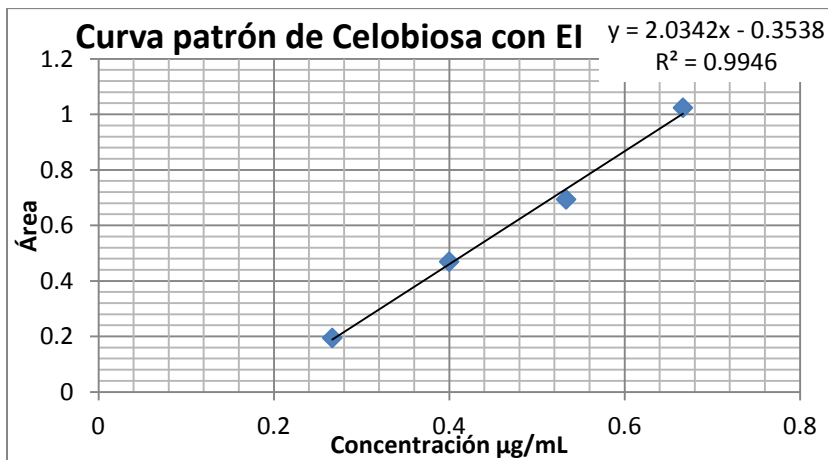


Figura 48. Curva patrón de celobiososa con EI para HPLC.

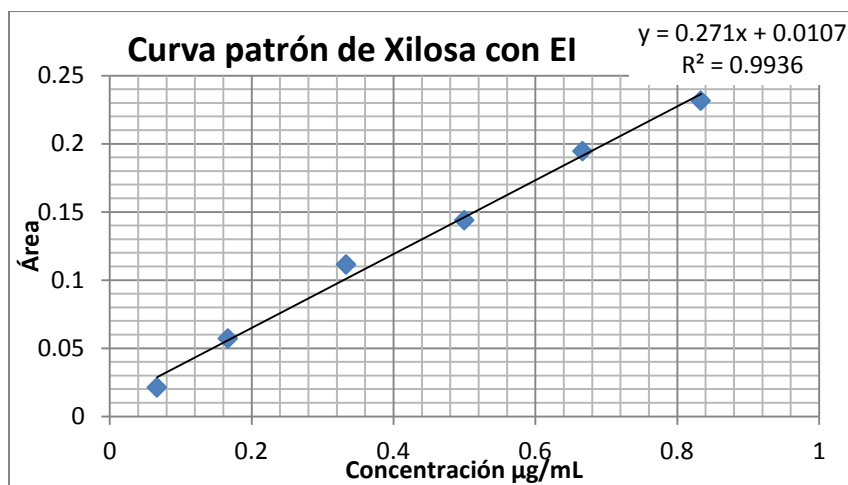


Figura 49. Curva patrón de xilosa con EI para HPLC.

- **Análisis de varianza de la evaluación de la actividad enzimática.**

Tabla 19. ANOVA de la evaluación de la actividad enzimática.

<i>Fuente de Variación</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de Libertad</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F calculada (Fc)</i>	<i>p</i>
Entre Tratamientos	114.3805	2	57.1903	4.3308	0.1305
Error	39.6166	3	13.2055		
Total	153.9971	5			

F valor crítico = 9.5521

$\alpha = 0.05$

Para concluir si se acepta o se rechaza la hipótesis, se utiliza el valor de *F* obtenido del análisis de varianza (*F_c*) y el valor de *F* de tablas (valor crítico) para los grados de libertad entre tratamientos y del error (*F* valor crítico_(2, 3) = 9.5521). O bien, se utiliza el valor de *p* y un $\alpha = 0.05$. Si *F_c* > *F* valor crítico ó $\alpha > p$, se rechaza la hipótesis nula, es decir, se puede aceptar que existe una diferencia significativa entre los tratamientos.

De acuerdo a lo anterior:

F calculada < *F* valor crítico; 4.3308 < 9.5521,

o bien

$\alpha < p$; 0.05 < 0.1305

Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y no existe diferencia significativa entre las temperaturas de evaluación de la actividad enzimática.

- Gráficos del Diseño de Experimentos.

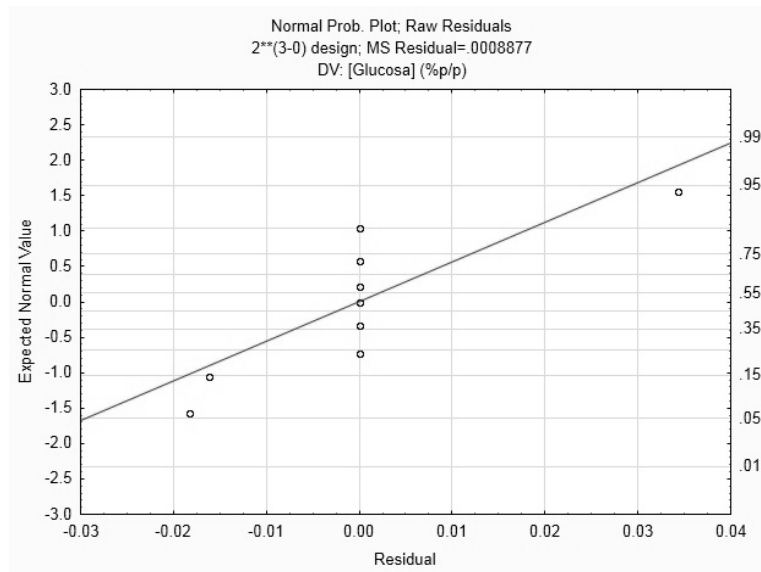


Figura 50. Gráfico de probabilidad normal de residuales de glucosa.

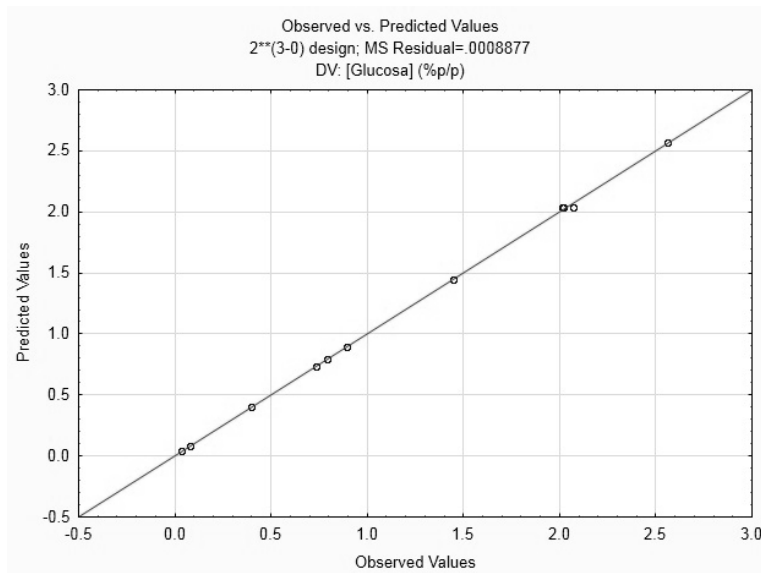


Figura 51. Gráfico de valores predichos contra valores observados de glucosa.

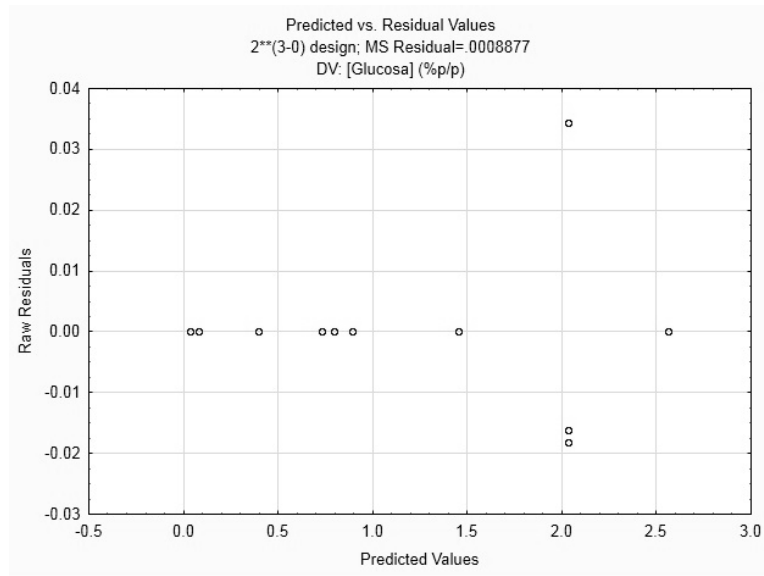


Figura 52. Gráfico de valores predichos contra residuales de glucosa.

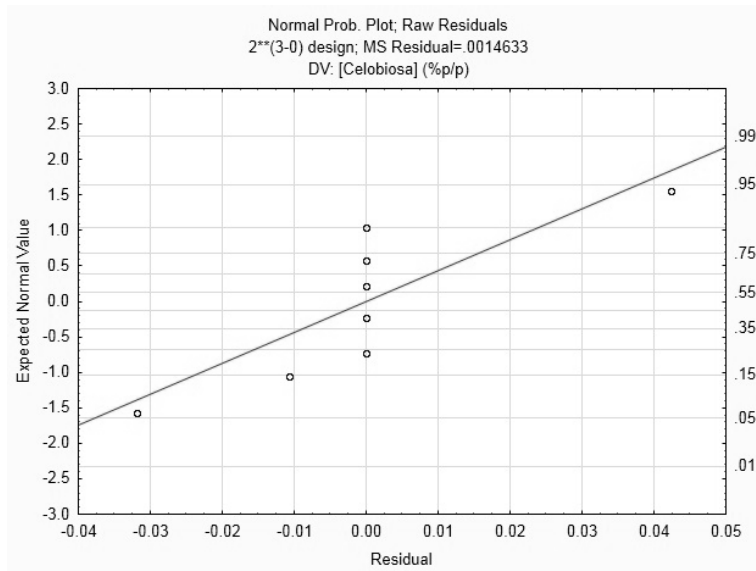


Figura 53. Gráfico de probabilidad normal de residuales de celobiosa.

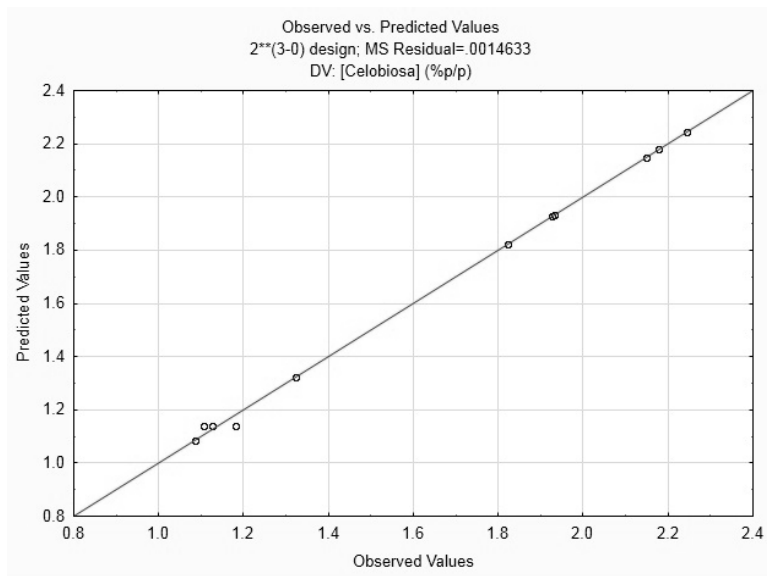


Figura 54. Gráfico de valores predichos contra valores observados de celobiosa.

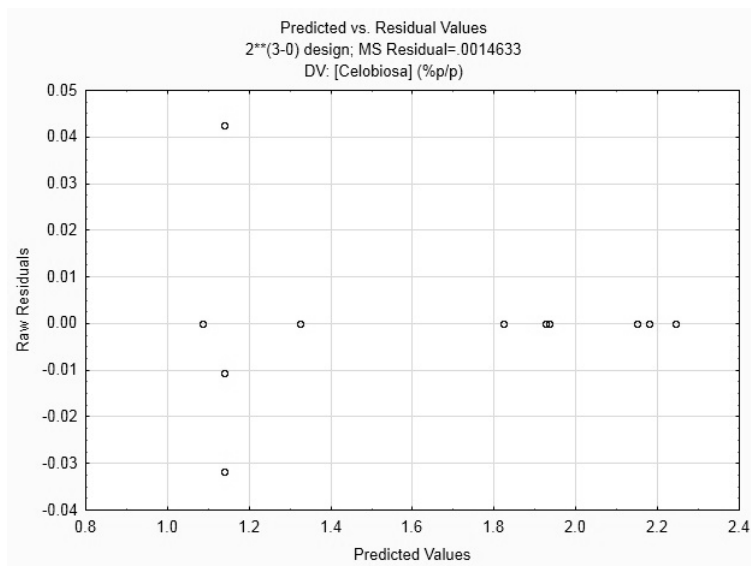


Figura 55. Gráfico de valores predichos contra residuales de celobiosa.

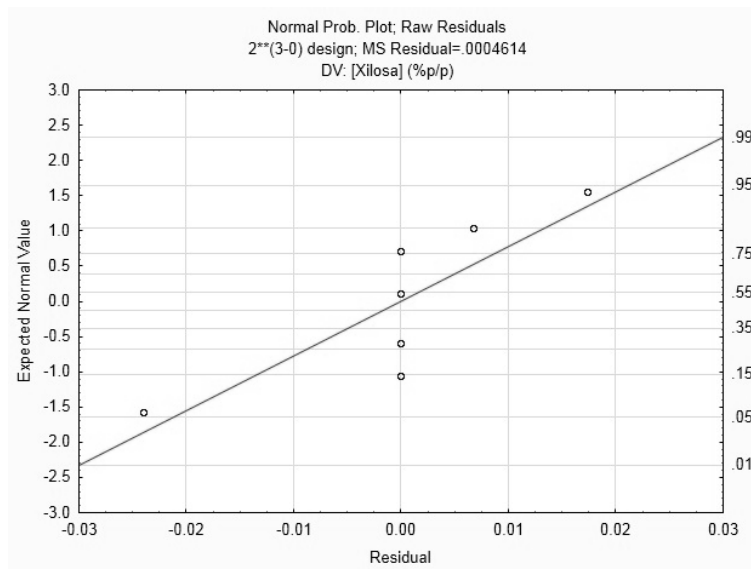


Figura 56. Gráfico de probabilidad normal de residuales de xilosa.

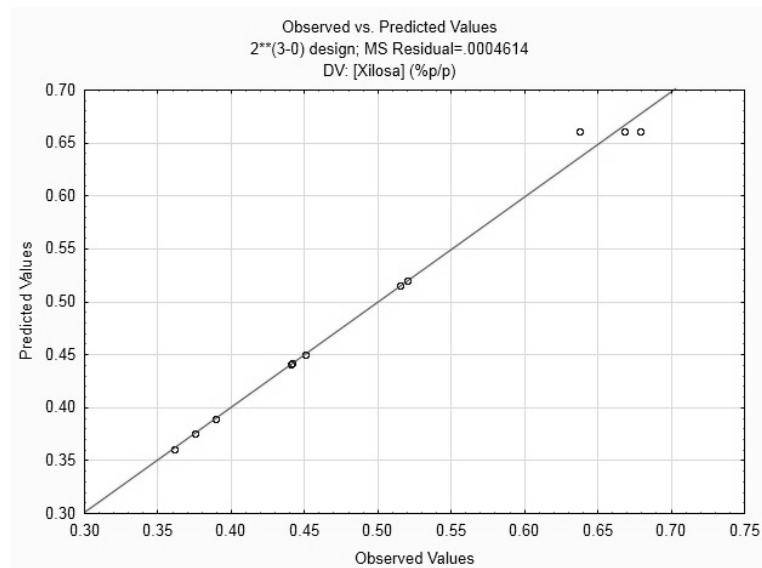


Figura 57. Gráfico de valores predichos contra valores observados de xilosa.

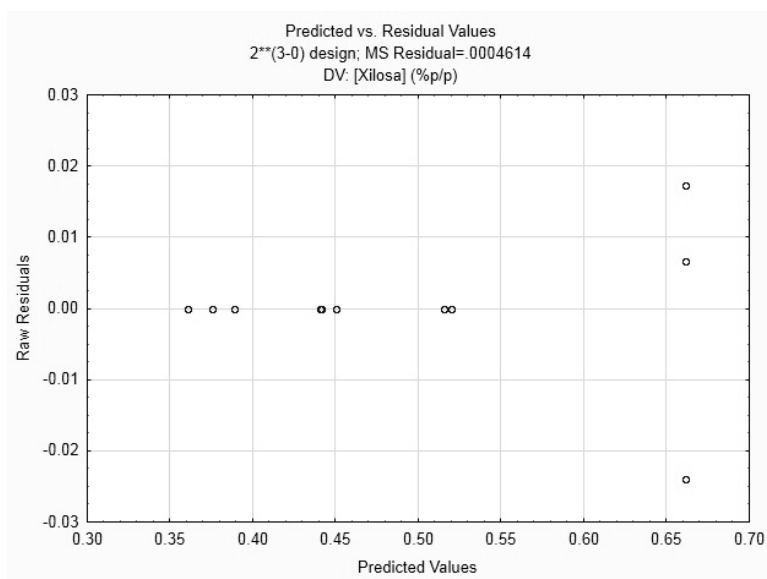


Figura 58. Gráfico de valores predichos contra residuales de xilosa.

- **Análisis de varianza de las respuestas del diseño de experimentos.**

Tabla 20. ANOVA de la generación de glucosa como variable de respuesta en el diseño de experimentos.

Factor / Interacción	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F calculada (Fc)	p
Concentración de enzima (mL Enzima/g Bagazo) *	0.9131	1	0.9131	1028.61	0.0010
Tiempo (min) *	2.4778	1	2.4778	2791.29	0.0003
Harina de bagazo (% p/v)	0.0046	1	0.0046	5.15	0.1513
1 by 2 *	0.4777	1	0.4777	538.20	0.0018
1 by 3 *	0.0653	1	0.0653	73.53	0.0133
2 by 3 *	0.6201	1	0.6201	698.56	0.0014
1'2'3 *	0.2156	1	0.2156	242.91	0.0041
Error	0.0018	2	0.0009		
Total	7.7413	10			

F valor crítico = 18.5128; $\alpha = 0.05$

**De acuerdo a los valores de Fc y p, estos factores y/o interacciones tienen efecto significativo en el aumento o disminución de la generación de glucosa durante la hidrólisis enzimática.*

Tabla 21. ANOVA de la generación de celobiosa como variable de respuesta en el diseño de experimentos.

Factor / Interacción	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F calculada (Fc)	p
Concentración de enzima (mL Enzima/g Bagazo) *	0.3282	1	0.3282	224.27	0.0044
Tiempo (min) *	0.6883	1	0.6883	470.37	0.0021
Harina de bagazo (% p/v)	0.000001	1	0.000001	0.0008	0.9797
1 by 2 *	0.1400	1	0.1400	95.65	0.0103
1 by 3	0.00005	1	0.00005	0.0337	0.8713
2 by 3 *	0.0578	1	0.0578	39.50	0.0244
1'2'3	0.0102	1	0.0102	7.01	0.1179
Error	0.0029	2	0.0015		
Total	2.2819	10			

F valor crítico = 18.5128; $\alpha = 0.05$

*De acuerdo a los valores de *F*_c y *p*, estos factores y/o interacciones tienen efecto significativo en el aumento o disminución de la generación de celobiosa durante la hidrólisis enzimática.

Tabla 22. ANOVA de la generación de xilosa como variable de respuesta en el diseño de experimentos.

Factor / Interacción	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F calculada (Fc)	p
Concentración de enzima (mL Enzima/g Bagazo)	0.0003	1	0.0003	0.6455	0.5060
Tiempo (min)	0.0006	1	0.0006	1.34	0.3662
Harina de bagazo (% p/v)	0.0002	1	0.0002	0.5015	0.5523
1 by 2	0.0003	1	0.0003	0.6893	0.4937
1 by 3	0.0008	1	0.0008	1.77	0.3143
2 by 3	0.0082	1	0.0082	17.69	0.0521
1'2'3 *	0.0146	1	0.0146	31.67	0.0301
Error	0.0009	2	0.0005		
Total	0.1362	10			

F valor crítico = 18.5128; $\alpha = 0.05$

*De acuerdo a los valores de *F*_c y *p*, estos factores y/o interacciones tienen efecto significativo en el aumento o disminución de la generación de xilosa durante la hidrólisis enzimática.

ANEXO B

- **Equipo utilizado.**



Figura 59. Equipo de HPLC.



Figura 60. Sistema de ozonólisis.



Figura 61. Espectrofotómetro Uv-Vis.



Figura 62. Espectrofotómetro Infrarrojo.



Figura 63. Difractómetro de Rayos X.

- **Índice de Figuras**

Figura 1. Rutas tecnológicas para la producción de bioetanol (BNDES y CGEE, 2008).

Figura 2. Producción global de Etanol y Biodiesel 2000-2010 (REN21, 2011).

Figura 3. Estructura de la biomasa lignocelulósica (Tabil, 2011).

Figura 4. Estructura primaria de la celulosa.

Figura 5. Estructura de las diferentes cadenas de hemicelulosa que pueden estar presentes en la biomasa lignocelulósica (Lozanoff, 2007).

Figura 6. Estructura de la lignina.

Figura 7. Producción de etanol a partir de material lignocelulósico (Singh nee' Nigam, 2009).

Figura 8. Diagrama esquemático de la utilización de sorgo dulce para la producción de etanol (Sipos, 2009).

Figura 9. Cambio estructural de la biomasa lignocelulósica después del pretratamiento (McCutchen, 2006).

Figura 10. Esquema de la hidrólisis enzimática de la celulosa (Mussatto, 2010).

Figura 11. Composición del material lignocelulósico y los productos potenciales de su hidrólisis (Taherzadeh, 2007).

Figura 12. Caña de sorgo dulce.

Figura 13. Dominio experimental para tres factores continuos en variables naturales. Los experimentos de los vértices son los utilizados en el diseño factorial completo 2^3 .

Figura 14. Reacción del Método de DNS.

Figura 15. Sistema de Ozonólisis.

Figura 16. Columna empacada con la muestra en el sistema de Ozonólisis.

Figura 17. Sistema para cuantificación de O_3 .

Figura 18. Burbujeadores del sistema de cuantificación de O_3 .

Figura 19. Difractograma XRD de una muestra de pasta de madera.

Figura 20. Actividad enzimática del coctel enzimático E7.

Figura 21. Representación gráfica del dominio experimental de la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo sin pretratamiento.

Figura 22. Concentraciones de glucosa obtenidas en los tratamientos del diseño experimental.

Figura 23. Efecto del contenido de harina de bagazo (% p/v) y de enzima ($\text{mL/g}_{\text{Bagazo}}$) sobre la generación de glucosa (Tiempo = 40 min).

Figura 24. Efecto del contenido de harina de bagazo (% p/v) y de enzima ($\text{mL/g}_{\text{Bagazo}}$) sobre la generación de glucosa (Tiempo = 80 min).

Figura 25. Efecto del contenido de harina de bagazo (% p/v) y de enzima ($\text{mL/g}_{\text{Bagazo}}$) sobre la generación de glucosa (Tiempo = 120 min).

Figura 26. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima ($\text{mL/g}_{\text{Bagazo}}$) sobre la generación de glucosa (Harina de bagazo = 5 % p/v).

Figura 27. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima ($\text{mL/g}_{\text{Bagazo}}$) sobre la generación de glucosa (Harina de bagazo = 10 % p/v).

Figura 28. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima ($\text{mL/g}_{\text{Bagazo}}$) sobre la generación de glucosa (Harina de bagazo = 15 % p/v).

Figura 29. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de glucosa (Proporción de Enzima = $0.3 \text{ mL}_{\text{Enzima}}/\text{g}_{\text{Bagazo}}$).

Figura 30. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de glucosa (Proporción de Enzima = $0.6 \text{ mL}_{\text{Enzima}}/\text{g}_{\text{Bagazo}}$).

Figura 31. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de glucosa (Proporción de Enzima = $0.9 \text{ mL}_{\text{Enzima}}/\text{g}_{\text{Bagazo}}$).

Figura 32. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima ($\text{mL/g}_{\text{Bagazo}}$) sobre la generación de celobiosa (Harina de bagazo = 5 % p/v).

Figura 33. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima ($\text{mL/g}_{\text{Bagazo}}$) sobre la generación de celobiosa (Harina de bagazo = 10 % p/v).

Figura 34. Efecto del tiempo de reacción (min) y de la proporción de enzima ($\text{mL/g}_{\text{Bagazo}}$) sobre la generación de celobiosa (Harina de bagazo = 15 % p/v).

Figura 35. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de xilosa (Proporción de Enzima = $0.3 \text{ mL}_{\text{Enzima}}/\text{g}_{\text{Bagazo}}$).

Figura 36. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de xilosa (Proporción de Enzima = $0.6 \text{ mL}_{\text{Enzima}}/\text{g}_{\text{Bagazo}}$).

Figura 37. Efecto del tiempo de reacción (min) y del contenido de harina de bagazo (% p/v) sobre la generación de xilosa (Proporción de Enzima = $0.9 \text{ mL}_{\text{Enzima}}/\text{g}_{\text{Bagazo}}$).

Figura 38. Espectro del bagazo de sorgo dulce sin pretratamiento.

Figura 39. Espectro del bagazo de sorgo sometido a pretratamiento con ozono (Ozonólisis).

Figura 40. Espectro del bagazo de sorgo sometido a pretratamiento ácido diluido.

Figura 41. Espectro del bagazo de sorgo sometido a pretratamiento básico con NaOH.

Figura 42. Patrones de Difracción de Rayos X del bagazo de sorgo sin pretratamiento y sometido a distintos pretratamientos.

Figura 43. Cromatograma de una mezcla de azúcares para su identificación por HPLC.

Figura 44. Cromatograma del estándar interno (Alanina).

Figura 45. Curva patrón de DNS.

Figura 46. Curva patrón de alanina (Estándar Interno).

Figura 47. Curva patrón de glucosa con EI para HPLC.

Figura 48. Curva patrón de celobiosa con EI para HPLC.

Figura 49. Curva patrón de xilosa con EI para HPLC.

Figura 50. Gráfico de probabilidad normal de residuales de glucosa.

Figura 51. Gráfico de valores predichos contra valores observados de glucosa.

Figura 52. Gráfico de valores predichos contra residuales de glucosa.

Figura 53. Gráfico de probabilidad normal de residuales de celobiosa.

Figura 54. Gráfico de valores predichos contra valores observados de celobiosa.

Figura 55. Gráfico de valores predichos contra residuales de celobiosa.

Figura 56. Gráfico de probabilidad normal de residuales de xilosa.

Figura 57. Gráfico de valores predichos contra valores observados de xilosa.

Figura 58. Gráfico de valores predichos contra residuales de xilosa.

Figura 59. Equipo de HPLC.

Figura 60. Sistema de ozonólisis.

Figura 61. Espectrofotómetro Uv-Vis.

Figura 62. Espectrofotómetro Infrarrojo.

Figura 63. Difractómetro de Rayos X.

- **Índice de Tablas.**

Tabla 1. Volumen de etanol anhidro que PEMEX adquirirá conforme a los plazos establecidos (SENER, 2011c).

Tabla 2. Composición de la planta completa de Sorgo dulce (SAGARPA, 2011; SENER, 2006).

Tabla 3. Composición del bagazo de sorgo dulce (Sipos, 2009).

Tabla 4. Valores reales para las variables codificadas.

Tabla 5. Tratamientos del Diseño de Experimentos realizados a una temperatura constante de 50°C y un volumen final fijo de 2 mL.

Tabla 6. Condiciones del Método de HPLC utilizado en el experimento.

Tabla 7. Condiciones del pretratamiento Básico-Oxidante (Guzmán, 2011).

Tabla 8. Condiciones del pretratamiento Ácido diluido.

Tabla 9. Condiciones del pretratamiento Básico con NaOH.

Tabla 10. Condiciones del pretratamiento Básico con CaO (Cal).

Tabla 11. Condiciones del pretratamiento de Ozonificación.

Tabla 12. Condiciones del análisis de Difracción de Rayos X.

Tabla 13. Variables de respuesta encontradas para cada tratamiento de la hidrólisis enzimática a 50°C.

Tabla 14. Coeficientes del modelo experimental de la hidrólisis enzimática de bagazo de sorgo sin pretratamiento.

Tabla 15. Contenido de lignina soluble determinada para cada pretratamiento.

Tabla 16. Índice de Cristalinidad del bagazo de sorgo sin pretratamiento y sometido a distintos pretratamientos.

Tabla 17. Concentración de azúcares determinados por HPLC después de la hidrólisis enzimática con el coctel enzimático E7 del bagazo de sorgo pretratado y sin pretratamiento y contenido de lignina soluble.

Tabla 18. Tiempo de retención de los diferentes azúcares y del estándar interno.

Tabla 19. ANOVA de la evaluación de la actividad enzimática.

Tabla 20. ANOVA de la generación de glucosa como variable de respuesta en el diseño de experimentos.

Tabla 21. ANOVA de la generación de celobiosa como variable de respuesta en el diseño de experimentos.

Tabla 22. ANOVA de la generación de xilosa como variable de respuesta en el diseño de experimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Abril, Diana y Abril, Alejandro. (2009). Ethanol from lignocellulosic biomass. *Ciencia e Investigación Agraria*. Vol. 36, (2). pp. 177-190.

Adel, Abeer M. et. al. (2010). Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis. *Bioresource Technology*. Vol. 101, (12). pp. 4446-4455.

Adney, Bill y Baker, John (1996). Measurement of Cellulase Activities. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. LAP-006. *Chemical Analysis and Testing Task*.

Alatorre Frenk, Claudio (2009). Energías Renovables para el Desarrollo Sustentable en México. SENER/GTZ. D. F., México. pp. 33-42.

Álvarez, María de los Ángeles (2008). Guía de Cromatografía. Instrumental Analítico. Escuela de Química. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. pp. 9-10. *Accesado el 04/08/2011 en <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf>*

ARPEL & IICA (2009). Manual de Biocombustibles *ARPEL ICA#6-2009*. pp. 106-109.

ASTM International (2011). Standard Test Methods for Rubber Deterioration-Reference and Alternative Method(s) for Determining Ozone Level in Laboratory Test Chambers. Test Method C. pp. 4-7. *Annual Book of ASTM Standards: Rubber, Natural and Synthetic - General Test Methods; Carbon Black*. Vol. 90.01 July, 2011. Designation D4575-09.

Baker, A. J. (1973). Effect of Lignin on the *In Vitro* Digestibility of Wood Pulp. *Journal of Animal Science*. Vol. 36, (4). pp. 768-771.

Banerjee, Goutami. et. al. (2011). Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnology for Biofuels*. Vol. 4, (16).

Barba Pacheco, Claudia. (2002). Apéndice III. Determinación del Índice de Cristalinidad. En Síntesis de carboximetilcelulosa (CMC) a partir de pastas de plantas anuales. Tesis Doctoral. Depto. de Ingeniería Química. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Química, Universitat Rovira I Virgili. pp. 202. Accedido el 04/12/11 en <http://tdx.cat/handle/10803/8503>

Binder, A. et. al. (1980). Delignification of straw with ozone to enhance biodegradability. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 11, (1). pp. 1-5.

Bisaria, V. S. y Ghose, T. K. (1978). Sorption characteristics of cellulose on cellulosic substrates. En Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals, and Microbial Protein, Symposium Proceedings. T. K. Ghose, Editor. IIT, New Delhi. pp. 155.

BNDES y CGEE (coord.) (2008). Bioetanol de Caña de Azúcar. Energía para el Desarrollo Sostenible. Banco Nacional de Desenvolvimento Económico y Social (BNDES). Río de Janeiro, Brasil. pp. 25- 41, 70, 125-129.

Brodeur, Gary. et. al. (2011). Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Research*. Vol. 2011. Article ID 787532. pp. 1-17.

Caballero Martínez, Karla S. (2010). Evaluación de la producción de bioetanol a partir de residuos de malta. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Chaplin, M. F. y Kennedy J. F. (1986). Monosaccharides. En Carbohydrate Analysis: A Practical Approach. IRL Press (Oxford, England). pp. 1-36.

Cheng, Ke-Ke. et. al. (2008). Sugarcane Bagasse Mild Alkaline/Oxidative Pretreatment for Ethanol Production by Alkaline Recycle Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 151, (1). pp. 43-50.

Corredor, D. Y. et. al. (2009). Evaluation and Characterization of Forage Sorghum as Feedstock for Fermentable Sugar Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 158, (1). pp. 174-179.

De Dios Barragán, Ana C. (2001). Aplicación del Diseño de Experimentos en el proceso de tintura del poliéster. Tesis de Licenciatura. Escuela de Ingeniería y Ciencias. Universidad de las Américas Puebla. *Accesado el 20/12/11 en http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lmnf/de_d_ac/indice.html*

Dosal Gómez, M. A. et. al. (2007). Análisis Cuantitativo de Analitos con base en Equilibrios Redox. Manual de Química Analítica Experimental I. Dpto. de Química Analítica, Facultad de Química, UNAM.

Evans, R. et. al. (1995). Changes in cellulose crystallinity during kraft pulping. Comparison of infrared, X-ray diffraction and solid state NMR results. *Holzforchung*. Vol. 49, (6). pp. 498-504.

Faix, O. (1992). Fourier transform infrared spectroscopy. En *Methods in Lignin Chemistry*. S. Y. Lin & C. W. Dence, Eds. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 83-93.

Fan, L. T y Lee, Y. H. (1983). Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Derivation of a mechanistic kinetic model. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 25, (11). pp. 2707-2733.

Fan, L. T., Lee, Y. H. y Beardmore, D. H. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 22, (1). pp. 177-199.

Ferré, Joan (2004). El Diseño Factorial Completo 2^k . *Técnicas de Laboratorio*. Vol. 292, pp. 430-434.

García-Cubero, Ma. Teresa. et. al. (2009). Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology*. Vol. 100, (4). pp. 1608-1613.

Gilbertson, R. & L. Ryvarde (1986). North American Polypores. *Fungiflora A/S*. Oslo. 885 págs.

Goldemberg, J. (2008). Prefacio. En Bioetanol de Caña de Azúcar. Energía para el Desarrollo Sostenible. 1ª edición. BNDES y CGEE, Coordinación. Río de Janeiro, Brasil. pp. 13-14.

Gómez-Ullate R. R. y Serrano Á. R. A. (2006). Cromatografía: Principios y aplicaciones. pp. 11, 15. Accesado el 29/11/11 en <http://es.scribd.com/doc/11642417/Cromatografia-Fundamentos-y-Aplicaciones>

Gomis Yagües, Vicente (2008). Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial. Dpto. de Ingeniería Química, Universidad de Alicante. pp. 2, 12-14. Accesado el 29/11/11 en <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>

Gregg, D. y Saddler, J. N. (1996). A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 57-58, (1). pp. 711-727.

Guzmán, Nydia (2012). Pretratamiento de bagazo de gramíneas para el incremento de azúcares reductores fermentables a etanol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Harris, Daniel C. (2007). Capítulo 16. Valoraciones Redox. En Análisis Químico Cuantitativo. 3ª edición. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 361, 607-614.

Hendriks, A. T. W. M. y Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. Vol. 100, (1). pp. 10-18.

Hernández Sampedro, Patricia (2010). Evaluación del pretratamiento básico-oxidante, ácido diluido y de la sacarificación enzimática mediante E6 de diferentes materiales lignocelulósicos en la obtención de azúcares reductores y totales. Tesis de Licenciatura. Programa Académico de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Puebla.

loelovich, Michael y Morag, Ely (2011). Effect of cellulose structure on enzymatic hydrolysis. *BioResources*. Vol. 6, (3). pp. 2818-2835.

Iturbe, Francisca. et. al. (2007). Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos (2007-2008). Manual de Laboratorio de Alimentos I. Departamento de alimentos y biotecnología. Facultad de Química, UNAM. pp. 27. *Accesado el 23/11/2011 en http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOS_YTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf*

Johnson Ford, Ericka N. et. al. (2010). X-ray Diffraction of Cotton Treated with Neutralized Vegetable Oil-based Macromolecular Crosslinkers. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. Vol. 5, (1). pp. 10-20.

Karimi, K. et. al. (2005). Fed-batch cultivation of *Mucor indicus* in dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate for ethanol production. *Biotechnology Letters*. Vol. 27, (18). pp. 1395-1400.

Kasai, N. y Kakudo, M. (2005). X-Ray Diffraction by Macromolecules. Springer Series in Chemical Physics. Kodansha Ltd. And Springer. Berlin, Heidelberg. pp. 394-401.

Kerley, M. S. et. al. (1988). Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment of cotton and wheat straw on cellulose crystallinity and on composition and site and extent of disappearance of wheat straw cell wall phenolics and monosaccharides by sheep. *Journal of Animal Science*. Vol. 66, (12). pp. 3235-3244.

Kim, D. W. et. al. (1988). Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on microcrystalline cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 28, (2). pp. 148-154.

Kobayashi, Shiro. et. al. (1999). Enzymatic Synthesis of Cellulose. En *Methods in Biotechnology*, Vol. 10: Carbohydrate Biotechnology Protocols. Christopher Bucke, Editor. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp. 57-69.

Larsson, S. et. al. (2000). Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol.84, (6). pp. 617-632.

Laureano-Pérez, L. et. al. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. Characterization of pretreated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 124, (1-3). pp. 1081-1099.

Lira Navarrete, Erandi (2007). Síntesis de Péptidos. Curso: Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. Instituto de Biotecnología, UNAM. *Accesado el 02/01/12 en http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/sintesis_de_peptidos.pdf*

Liu, R. et. al. (2005). Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose*. Vol. 12, (1). pp. 25-34.

Lozanoff, Jorge. et. al. (2007). Bioenergía. Revisión de tecnologías emergentes. Observatorio de Políticas Públicas. Administradores Gubernamentales, Jefatura de Gabinete de Ministros. Argentina. pp. 12-28.

Luley, Christopher J. (2006). Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos. ISA Hispana, Sociedad Internacional de Arboricultura. *Accesado el 03/02/12 en <http://isahispana.com/treecare/articles/decay-fungi.aspx>*

Lynd, Lee R. et. al. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 66, (3). pp. 506-577.

Marsden, W. L. et. al. (1983). Action of *Trichoderma reesei* QM9414 and C30 cellulase on substrates with varying crystallinity. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 5, (5). pp. 345-351.

Marsden, W. L. y Gray P. P. (1986). Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 3, (3). pp. 235-276.

Martínez Anaya, Claudia. et. al. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 50, (3-4). pp. 119-131.

McCutchen, Bill F. (2006). Plant Biotechnology's Role in Feedstock Engineering. Positioning Sorghum as an Energy Crop. Texas A&M Agriculture. pp. 12.

Medrano Buenrostro, Brenda Y. (2010). Evaluación de la producción de etanol a partir de salvado de trigo. Efecto de diferentes pretratamientos químicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Michell, A. J. (1990). Second-derivative FT-IR spectra of native celluloses. *Carbohydrate Research*. Vol. 197, (25). pp. 53-60.

Millati, R. et. al. (2005). Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolyzates. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 36, (2-3). pp. 294-300.

Mitra, G. B. y Mukherjee, P. S. (1980). X-ray diffraction study of fibrous polymers. I. Degree of paracrystallinity – a new parameter for characterizing fibrous polymers. *Polymer*. Vol. 21, (12). pp. 1403-1409.

Mungall, James (2008). Titration involving Ozone and Iodide. *Accesado el 15/08/11 en [http://www.chemistry.jamesmungall.co.uk/pdfFiles/Moles%20Questions/titration\(ozone%20and%20iodide\).pdf](http://www.chemistry.jamesmungall.co.uk/pdfFiles/Moles%20Questions/titration(ozone%20and%20iodide).pdf)*

Mussatto S. I. y Teixeira, J. A. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Vol. 2. pp. 897-907.

Oliva Domínguez, José M. (2003). Efecto de los Productos de Degradación Originados en la Explosión por Vapor de Biomasa de Chopo sobre

Kluyveromyces marxianus. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. Accesado el 19/10/11 en <http://www.ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucm-t26833.pdf>

Pandey, K. K. (1999). A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 71, (12). pp. 1969-1975.

Park, Nahyun. et. al. (2010). Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*). *Bioresource Technology*. Vol. 101, (18). pp. 7046-7053.

Pasa Duarte, V. M. (2010). Recomendaciones de especificaciones técnicas para el etanol y sus mezclas (E-6) y la infraestructura para su manejo en México. SENER/GTZ. D. F., México. pp. 13-15.

Pérez Martínez, Carlos S. (2004). Espectroscopía Infrarroja. Departamento de Química Física. Facultad de Química, Universidad de la Habana, Cuba. pp. 68, 70, 85-86.

Popoff, Orlando (2008). Hongos Xilófagos. Instituto de Botánica del Nordeste. Corrientes. Argentina. Accesado el 03/02/12 en <http://www.biologia.edu.ar/fungi/xilofagos.htm>

Puri, V. P. (1984). Effect of crystallinity and degree of polymerization on enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 26, (10). pp. 1219-1222.

Qin, Wenjuan (2010). High Consistency Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios de Posgrado. Universidad de Columbia Británica.

REN21 (2011). Renewables 2011 Global Status Report. Renewable Energy Policy Network for the 21st Century. Paris: REN21 Secretariat. pp. 31-32. Accesado el 25/01/12 en http://www.ren21.net/Portals/97/documents/GSR/REN21_GSR2011.pdf

Roncero Vivero, M. B. (2001). Capítulo 12. Determinación de la Cristalinidad y de la Accesibilidad de las Fibras de Celulosa Mediante Diferentes Técnicas. En Obtención de una secuencia "TCF" con la aplicación de ozono y enzimas, para el blanqueo de pastas madereras y de origen agrícola. Optimización de la etapa Z. Análisis de los efectos en la fibra celulósica y sus componentes. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de Terrassa, Universidad Politécnica de Cataluña. pp. 12/1, 12/7-12/9. *Accesado el 16/10/2011 en <http://tdx.cat/handle/10803/6489>*

SAGARPA (2009). Programa de Producción Sustentable de Insumos para Bioenergéticos y de Desarrollo Científico y Tecnológico. SAGARPA. México, D.F. pp. 9.

SAGARPA (2011). Bioetanol. *Accesado el 18/01/12 en <http://www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/bioetanol.html>*

Segal, L. et. al. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*. Vol. 29, (10). pp. 786-794.

Sene, C. F. B. et. al. (1994). Fourier-Transform Raman and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (An Investigation of Five Higher Plan Cell Walls and Their Components). *Plant Physiology*. Vol. 106, (4). pp. 1623-1631.

SENER (2006). Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México. SENER/BID/GTZ (Edit.). México, D. F.

SENER (2009). Estrategia Intersecretarial de los Bioenergéticos. SAGARPA/SENER/SE/SEMARNAT/SHCP (Edit.) México, D. F.

SENER (2010). Fuentes de Energía. Planeación Energética y Desarrollo Tecnológico. *Accesado el 11/01/12 en http://www.sener.gob.mx/portal/fuentes_de_energia.html*

SENER (2011a). Bioenergéticos. *Accesado el 11/01/12 en <http://www.renovables.gob.mx>*

SENER (2011b). Prospectiva de energías renovables 2011-2025. Secretaría de Energía. México, D. F. pp. 30-34, 52-54 y 115-116.

SENER (2011c). Programa de Introducción de Etanol Anhidro. Secretaría de Energía. México, D. F.

Seyhan, Ege (2000). Carbohidratos. En Química Orgánica. Estructura y Reactividad. Tomo 2. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España. pp. 1178-1180.

Sherman, Hsu (1997). Chapter 15. Infrared Spectroscopy. En Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Frank A. Settle, Editor. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. México. pp. 248-249, 262.

Singh nee' Nigam, P. et. al. (2009). Chapter 2. Pre-treatment of Agro-Industrial Residues. En Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization. Utilization of Agro-Residues. Poonam Singh nee' Nigam & Ashok Pandey, Editors. Springer Netherlands. pp. 13-33.

Sipos, Bálint. et. al. (2009). Sweet Sorghum as Feedstock for Ethanol Production: Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 153, (1-3). pp. 151-162.

Sipos, Bálint (2010). Conversion of Lignocelluloses to Fermentable Sugars for Ethanol Production. Tesis Doctoral. Facultad de Tecnología Química y Biotecnología. Universidad de Tecnología y Economía de Budapest. *Accesado el 25/01/12 en http://dokutar.omikk.bme.hu/collections/phd/Vegyeszmernokies_Biomernoki_Kar/2011/Sipos_Balint/tezis_eng.pdf*

Sluiter, A. et. al. (2008). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory*.

Sluiter, A. y Sluiter, J. (2011). Review and Integration: Pretreated Slurries. En Summative Mass Closure. *Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory*. pp. 6-9.

Stewart, D. et. al. (1995). Fourier-Transform Infrared and Raman Spectroscopic Study of Biochemical and Chemical Treatments of Oak Wood (*Quercus rubra*) and Barley (*Hordeum vulgare*) Straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 43, (8). pp. 2219-2225.

Sun, Ye y Cheng, Jiayang (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. Vol. 83, (1). pp. 1-11.

Sun, R. y Tomkinson, J. (2005). Separation and Characterization of Cellulose from Wheat Straw. *Separation Science and Technology*. Vol. 39, (2). pp. 391-411.

Tabil, Lapo. et. al. (2011). Biomass Feedstock Pre-Processing – Part 1: Pre-Treatment. En *Biofuel's Engineering Process Technology*. Marco A. Dos Santos Bernardes, Editor. Editorial InTech. ISBN 978-953-307-480-1. pp. 411-438.

Taherzadeh, M. J. y Karimi, K. (2007). Acid-Based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review. *BioResources*. Vol. 2, (3). pp. 472-499.

Tapia Peña, Erika (2010). Sacarificación enzimática de diferentes materiales lignocelulósicos. Tesis de Licenciatura. Programa Académico de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Politécnica de Puebla.

Thompson, David N. (1989). The Effects of Physical and Chemical Constraints on the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. Tesis de Maestría. Department of Chemical Engineering. Michigan State University.

Torres, F. y Gómez, E. (2006). Energías Renovables para el Desarrollo Sustentable en México. SENER/GTZ. D. F., México. pp. 24.

Velázquez M. O. y Conca T. A. (2010). Módulo de Cereales. Sesión 6, Nixtamalización y evaluación de textura de productos nixtamalizados. Manual de Prácticas de Laboratorio de Tecnología de Alimentos. Dpto. de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química, UNAM. pp. 50-53.

Vera Terrazas, Karla L. (2012). Optimización del pretratamiento ácido de residuos de malta para la obtención de etanol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Vidal, P. F. y Molinier, J. (1988). Ozonolysis of lignin-Improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*. Vol. 16, (1). pp. 1-17.

Villaseñor Solis, Alicia (2010). Evaluación del efecto de diferentes pretratamientos en la producción de etanol a partir del olote de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Wood, T. M. (1981). Enzyme Interactions Involved on Fungal Degradation of Cellulosic Materials. En *Chemistry and Biochemistry of Wood-based Processes and Products*. Volume III. Session 4: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. The Ekman Days. *International Symposium on Wood Pulping Chemistry*. June 9-12, 1981. Stockholm, Sweden. pp. 31.

Wyman, Charles E. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. Vol. 96, (18). pp. 1959-1966.

Ximing, Zhang. et. al. (2011). Pretreatment of Corn Stover for Sugar Production with Combined Alkaline Reagents. *Energy & Fuels*. Vol. 25, (10). pp. 4796-4802.

Xu, J. et. al. (2010). Sodium hydroxide pretreatment of switchgrass for ethanol production. *Energy & Fuels*. Vol. 24, (3). pp. 2113-2119.

Zheng, Y. Z. et. al. (1998). Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnology Progress*. Vol. 14, (6). pp. 890-896.