



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL PRETRATAMIENTO Y SACARIFICACIÓN
DE UN CULTIVO ENERGÉTICO PARA LA OPTIMIZACIÓN
DE GENERACIÓN DE AZÚCARES SUSCEPTIBLES DE
FERMENTACIÓN A ETANOL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

P R E S E N T A :

GUILLERMO ENCISO MORENO



MÉXICO, D.F.

2014



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: Aurora de los Ángeles Ramos Mejía

VOCAL: María Rafaela Gutiérrez Lara

SECRETARIO: Jorge Arturo Aburto Anell

1er. SUPLENTE: Ma. Guadalupe Lemus Barajas

2° SUPLENTE: Alfonso Duran Moreno

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO

ASESOR DEL TEMA:

Jorge Arturo Aburto Anell

SUSTENTANTE:

Guillermo Enciso Moreno

Contenido

Resumen.....	6
Antecedentes	7
Biocombustibles.....	7
Bioetanol.....	11
Pretratamientos Físicos	17
Pretratamientos Fisicoquímicos.....	17
Pretratamientos Biológicos	18
Pretratamientos Químicos	18
Objetivo general	25
Objetivos particulares.....	25
Hipótesis.....	25
Metodología experimental	26
Caracterización Material Lignocelulósico.....	26
Planteamiento del Diseño Experimental para el Pretratamiento Ácido Diluido del Pasto Privilegio	29
Pretratamiento Ácido Diluido	32
Pretratamiento Básico con NaOH.....	34
Pretratamiento Básico con Cal	35
Pretratamiento Básico Oxidante	35
Hidrólisis Enzimática.....	36
Determinación de Lignina Soluble en Ácido	38
Determinación de Azúcares Reductores	39
Determinación de Azúcares Totales	40

Identificación de Azúcares por HPLC	42
Resultados y Discusión	45
Determinación de las condiciones óptimas del pretratamiento ácido diluido del Pasto Privilegio	45
Lignina Soluble en Ácido.....	47
Azúcares Reductores (AR).....	50
Azúcares Totales (AT).....	53
Efecto de los Pretratamientos.....	56
Pretratamientos Básicos	56
Pretratamiento Ácido Diluido.....	60
Hidrólisis enzimática	65
Conclusiones.....	72
Bibliografía	74
Anexo A.....	76
Análisis de Varianza del Diseño Experimental.....	76
Anexo B.....	78
Curvas de Calibración para la determinación de AR y AT	78
Anexo C.....	80
Curvas de Calibración para la cuantificación de los azúcares estudiados por HPLC	80
Anexo D.....	82
Cromatogramas de HPLC para identificación y cuantificación de los azúcares estudiados	82

La obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos muestra ventajas económicas y medio ambientales sobre el obtenido principalmente de maíz y caña de azúcar. Además la creciente preocupación por el incremento de emisiones de CO₂ y la preocupación por la seguridad energética conllevan a la búsqueda de nuevas alternativas energéticas no basadas en petróleo, por lo que los materiales lignocelulósicos son una alternativa interesante. Sin embargo, las barreras físicas y químicas causadas por la asociación de sus principales componentes dificultan la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa a azúcares susceptibles de fermentación a etanol.

Por lo cual es necesario emplear una etapa adicional de pretratamiento para facilitar la accesibilidad enzimática mejorando la digestibilidad de la celulosa; en la actualidad existen diversos pretratamientos y cada uno de estos tiene un efecto específico sobre la fracción lignina y/o hemicelulosa. Por lo que los pretratamientos y sus condiciones se deben elegir de acuerdo con las características de la biomasa.

En el presente trabajo, en la primera etapa se determinaron las condiciones óptimas (concentración de ácido, temperatura y tiempo de reacción) del pretratamiento ácido diluido del Pasto Privilegio Malla 40 a través de un diseño experimental. En la segunda etapa se evaluó el efecto del pretratamiento ácido diluido y su combinación con tres diferentes pretratamientos básicos (básico con NaOH, básico con CaO y básico oxidante) sobre la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico; el efecto de estos pretratamientos se evaluó mediante la medición de tres parámetros: azúcares reductores (AR), azúcares totales (AT) y lignina soluble en ácido (LSA).

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo empleando dos complejos enzimáticos comerciales, llamados E-6 y E-7, y las condiciones empleadas se establecieron a partir de trabajos previos (Guzmán Barrera, 2012) y (Vázquez Bolaños, 2012).

Biocombustibles

En la actualidad, la demanda creciente de energía, el agotamiento inevitable de los combustibles fósiles y la creciente preocupación por el calentamiento global han estimulado la búsqueda y la exploración intensa de fuentes alternativas de energía, como las energías renovables (P. Redding, *et al.*, 2011).

Se llama energía renovable a la que administrada en forma adecuada, puede explotarse ilimitadamente, ya que su cantidad disponible no disminuye a medida en que ésta se aprovecha. Su utilización radica principalmente como:

- Solución a los problemas de cambio climático
- Diversificación del mercado energético
- Oportunidad de posicionarse estratégicamente en el mercado de una nueva industria energética

Las principales ventajas que tiene su empleo son:

- Debido a su carácter sustentable son capaces de preservar las fuentes de energía no renovables
- Garantizan la seguridad y diversidad del suministro energético
- Proveen servicios de energía virtualmente sin impacto ambiental, contribuyendo a la protección del ecosistema de las generaciones presentes y futuras
- 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 que el empleo de esta representa nuevas fuentes de empleo, mayores exportaciones, la reactivación de muchas industrias tradicionales, y el fortalecimiento del aparato científico-técnico de los países, y a la vinculación de la

industria con los centros de investigación y desarrollo tecnológico (SENER, Planeación Energética, 2012).

Entre las principales energías renovables se encuentran los Bioenergéticos, y en nuestro caso de estudio particular los Biocombustibles. De acuerdo con la clasificación descrita por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), los biocombustibles pueden clasificarse de acuerdo a la fuente de biomasa de la que provienen:

Derivados de la Madera: son aquellos bioenergéticos provenientes directa o indirectamente de árboles, arbustos y matorrales (biomasa leñosa). Entre estos no se toma en cuenta la producción tradicional de leña y carbón natural.

Agro-combustibles: son aquellos bioenergéticos provenientes de cultivos energéticos, subproductos agrícolas y agroindustriales, los cuales se dividen en:

- Agrícolas: provienen de la producción, recolección y demás actividades desarrolladas en las zonas agrícolas.
- Animales: provienen de la ganadería, por ejemplo los excrementos sólidos de los animales.
- Agroindustriales: provienen de la biomasa producida en las industrias de alimentación y de elaboración de fibras, como por ejemplo el bagazo de caña de azúcar, cáscara y descascarado del arroz, corteza, fibra y médula de coco, residuos de prensado de granos, entre otros.

Cultivos energéticos: son aquellos productos agrícolas que son sembrados con el propósito exclusivo de obtener biomasa con características especiales para ser aprovechados energéticamente; son clasificados en:

- Cultivos tradicionales: son aquellos que no son rentables en su aplicación alimenticia o industrial, por lo que se destinan a la producción de energía. Algunos ejemplos son la remolacha, la caña de azúcar y el maíz.

- Cultivos poco frecuentes: son aquellos que pueden implantarse en terrenos de baja o nula rentabilidad, es decir, aquellos que por sus condiciones difícilmente pueden ser destinados para cultivar alimentos; tienen la ventaja de no competir con la producción de alimentos.
- Cultivos acuáticos: son aquellos presentes en extensiones de agua donde los rayos solares tienen la función de alimentar las plantas acuáticas, como las algas *Macrocystis*, *Nerocystis* que se dan en aguas saladas y *jacinto de agua* que se da en agua dulce, y que son susceptibles de cultivarse con la finalidad de producir energía.

Derivados de subproductos de origen urbano: son aquellos que provienen de residuos de origen municipal que suelen incinerarse directamente para producir calor y/o energía, y los derivados principalmente de la fermentación anaeróbica (biogás) de residuos sólidos y líquidos de origen municipal (SENER, Bioenergéticos, 2012).

Además de las clasificaciones anteriores, los biocombustibles pueden clasificarse por generación, es decir, por tipo de biomasa disponible.

- Biocombustibles de primera generación.

Son los biocombustibles que provienen de cultivos alimenticios y que se procesan por medios convencionales, como el bioetanol que se obtiene de la caña de azúcar, la remolacha y maíz, o el biodiesel que proviene de las semillas de cártamo o girasol. Su principal desventaja radica en la utilización de tierras destinadas a cultivos alimenticios, lo que conlleva a una competencia directa con la producción de alimentos.

En México, existe la oportunidad de producir biocombustibles de primera generación aprovechando tierras de baja productividad, sin perjudicar la producción de alimentos (SENER, Bioenergéticos, 2012).

- Biocombustibles de segunda generación.

Son los biocombustibles que se elaboran a partir de materias primas que tienen un alto contenido de celulosa, como los desechos de los cultivos alimenticios (por ejemplo los tallos de trigo o de maíz) e incluso el aserrín o plantas con un alto contenido de material lignocelulósico. Aunque el empleo de este tipo de biomasa aún se encuentra en la etapa experimental y todavía no son económicamente rentables, pero la velocidad a la que se desarrollan sus tecnologías es muy alta, por lo que existe la posibilidad de que en un mediano plazo den resultados satisfactorios que permitan su implementación (SENER, Bioenergéticos, 2012).

- Biocombustibles de tercera generación.

Son aquellos que provienen de cultivos específicos no alimentarios y que tienen ventajas potenciales muy concretas, como por ejemplo las algas, las cuales tienen un potencial energético que puede llegar a ser 30 veces mayor que el de los cultivos energéticos en tierra, capturan una gran cantidad energía solar y se reproducen rápidamente. Existen algas que de manera natural producen bioetanol; sin embargo, la tecnología y los procesos de producción para desarrollar este tipo de bioenergéticos aún se encuentran en etapa experimental, por lo que el uso de esta tecnología para producción en masa de biocombustibles no es económicamente viable (SENER, Bioenergéticos, 2012).

En la actualidad los países buscan fortalecer su seguridad energética, a través de la diversificación de las fuentes de energía y la accesibilidad de los sistemas de energía; además de contraer algunos otros beneficios como la creación de nuevas fuentes de trabajo y el aumento de ingresos en zonas rurales por la producción de insumos para bioenergéticos y su comercialización; promoviendo un desarrollo sustentable mediante la búsqueda de sistemas de energía amigables con el medio ambiente.

En este sentido, la producción de biocombustibles ha despertado el interés mundial, debido a los impactos económico, social, ambiental, institucional y político, que su desarrollo y empleo contrae.

En primer lugar, los altos precios del petróleo hacen que los países que no son autosuficientes en el suministro de combustibles fósiles inviertan parte de sus divisas en la importación de hidrocarburos. En el orden social, la necesidad de diversificar las fuentes de energía y de investigar los recursos locales ha repercutido en una mayor generación de empleo, pues ha sido necesario contratar nueva mano de obra para explorar esta posibilidad. En el aspecto ambiental, los biocombustibles parecen ser menos contaminantes y tienen menor impacto sobre el cambio climático que los combustibles fósiles (SAGARPA, 2010).

Bioetanol

El bioetanol en los últimos años ha tenido un mayor desarrollo a nivel mundial, no solo para reducir la dependencia internacional del abasto del petróleo como una prevención para preservar las reservas existentes, sino también como una manera de mitigar problemas ambientales como el calentamiento global. El bioetanol es producido principalmente a partir de maíz y caña de azúcar, y cuya producción encabezan Estados Unidos y Brasil. En 2008 se produjeron 65 mil millones de litros de bioetanol, el 52% de éste se produjo a base de maíz en Estados Unidos y un 37% a base de caña de azúcar en Brasil. Se espera que la demanda de etanol en el mundo continúe creciendo y supere los 101 mil millones de litros para 2015, equivalentes a 80 millones de toneladas (Figura 1).

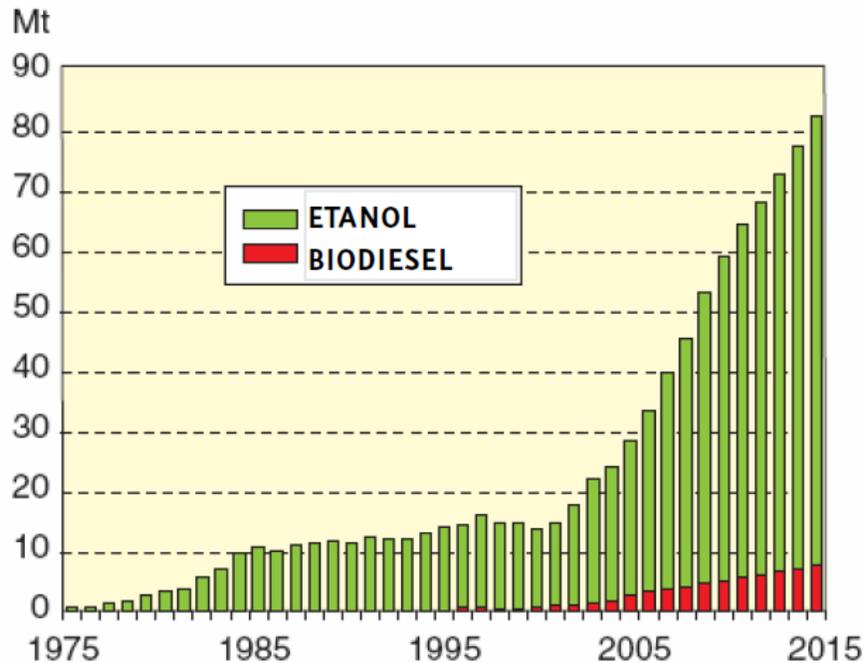


Figura 1. Proyección de la producción mundial de etanol y biodiesel, en millones de toneladas (SAGARPA, 2010).

En los Estados Unidos, el bioetanol es un combustible alternativo, prometedor y ya es ampliamente utilizado en el sector del transporte como aditivo oxigenante y como reemplazo parcial de gasolina para reducir el uso de petróleo y las emisiones atmosféricas. Por otro lado, el bioetanol brasileño producido a partir de caña de azúcar ha sido utilizado desde hace treinta años en ese país, como sustituto de gasolina, como medida para reducir las importaciones de petróleo (SENER, 2010).

En nuestro país, a partir de 2007 se han puesto en marcha acciones para el fomento y aprovechamiento de los biocombustibles, como el *Programa Sectorial de Energía 2007-2012* que considera principalmente fomentar el aprovechamiento de las fuentes renovables de energía y biocombustibles, técnica, económica, ambiental y socialmente viables. Además que a través de estas fuentes renovables de energía se reduzca la utilización de combustibles fósiles provocando una disminución proporcional de la contaminación y un desarrollo sustentable.

Otras acciones puestas en marcha son la promulgación de la *Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos*, que tiene el objetivo de promover el desarrollo de los bioenergéticos con el fin de coadyuvar a la diversificación energética y el desarrollo sustentable, como condiciones que permitan garantizar el apoyo al campo mexicano (SENER, Bioenergéticos, 2012).

Con este tipo de programas, se busca en una primera etapa sustituir el Metil Terbutil Éter (MTBE), empleado como oxigenante de gasolinas, por bioetanol y posteriormente en una segunda etapa generar la biomasa requerida para emplear sólo etanol. Con respecto a la primera etapa, el bioetanol ya es empleado como oxigenante en las gasolinas utilizadas por el transporte de las zonas metropolitanas de Monterrey, Guadalajara y la Ciudad de México.

Como se mencionó anteriormente, el bioetanol de primera generación, se produce por la fermentación de los azúcares de algunos productos como la caña de azúcar, la remolacha y en algunos países como Estados Unidos también se obtiene a partir de granos, como el maíz. Pero debido a la competencia de algunas de estas materias con la producción alimentaria, la disponibilidad de suelo y agua, algunos problemas ambientales como la contaminación por nutrientes y la erosión del suelo, además de otros factores económicos y políticos, se limita su utilización como materias primas renovables. Debido a esto, se ha recurrido a la obtención de bioetanol de segunda generación, es decir, a partir de materias primas lignocelulósicas (biomasa).

La biomasa lignocelulósica, como los residuos de cultivos agrícolas, forestales, municipales, etc., proporciona una materia prima de bajo costo para la producción de biocombustibles. Por lo que su conversión en combustibles ofrece una ventaja tanto económica como ambiental ante los combustibles fósiles tradicionales y los biocombustibles de primera generación.

Los residuos de cultivos agrícolas como la paja de arroz, paja de trigo, bagazo de caña, tapas de la caña de azúcar, tallo de algodón, bambú suave, residuos de procesamiento de bambú se consideran ejemplos principales de biomasa

lignocelulósica disponibles para la producción de bioetanol a nivel mundial (Raveendran, *et al.*, 2011).

Los materiales lignocelulósicos se encuentran compuestos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 2).

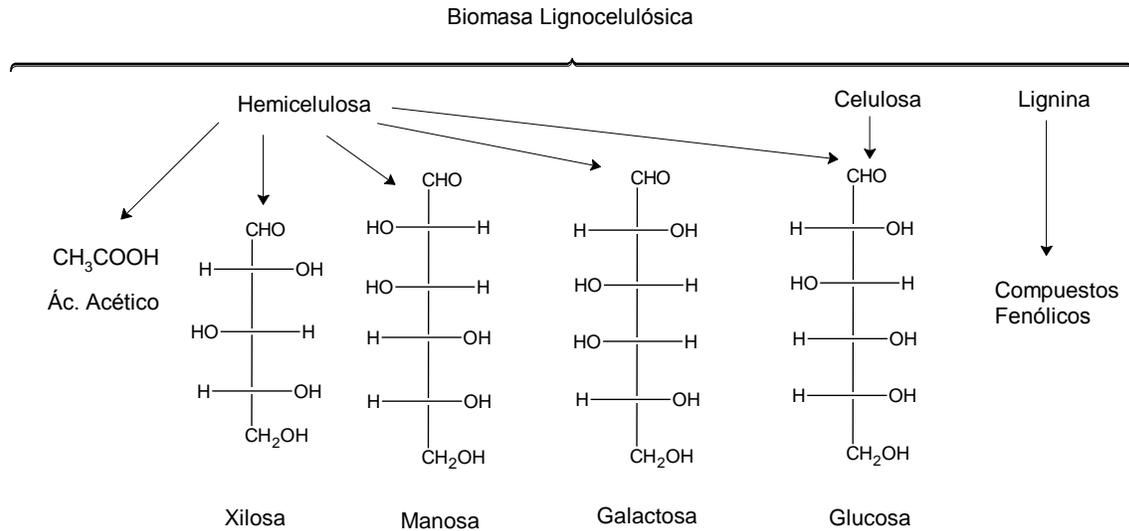


Figura 2. Composición general de la biomasa lignocelulósica.

La celulosa es el componente principal de las paredes de las células vegetales, en donde se encuentran la hemicelulosa y la lignina asociadas a ella. La celulosa es un homopolímero completamente lineal (Figura 3) formada por unidades de D-glucosa, que se encuentran unidas mediante enlaces β 1-4, los cuales le dan una estructura cristalina. Las cadenas individuales de glucanos de la celulosa están formadas por aproximadamente 2,000 y 25,000 residuos de glucosa.

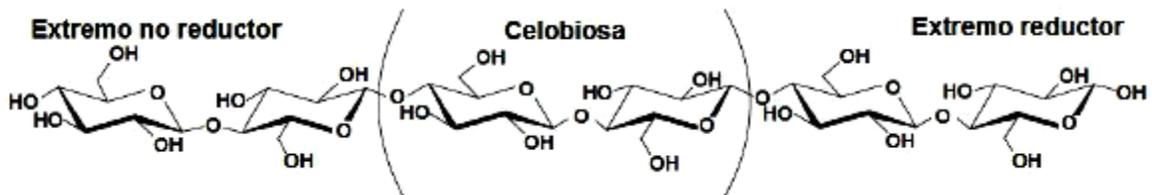


Figura 3. Representación de la estructura principal de la celulosa.

La hemicelulosa es un heteropolímero compuesto principalmente por xilosa y arabinosa, y en menor proporción por glucosa, manosa, galactosa y algunos ácidos glucorónicos.

Mientras que la lignina es una macromolécula compuesta por diferentes unidades de compuestos fenólicos y aromáticos, los cuales tienen como función proporcionar rigidez a la pared celular del material. La lignina es hidrofóbica y altamente resistente a la degradación química y biológica.

Por lo cual, el bioetanol producido de material lignocelulósico es una interesante alternativa, ya que las materias primas lignocelulósicas no compiten con cultivos alimenticios, además que son menos costosos que las materias primas agrícolas convencionales. Por otro lado la materia lignocelulósica es la biomasa renovable más abundante, con una producción anual estimada en 1×10^{10} millones de toneladas mundiales.

La producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos comprende las siguientes etapas: hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, fermentación de azúcares, separación de residuos de lignina y recuperación y purificación del bioetanol para cumplir con las especificaciones como combustible.

Para poder procesar adecuadamente los materiales lignocelulósicos (Figura 4) es necesario someterlos a pretratamientos para poder favorecer la hidrólisis de la celulosa con el fin de generar azúcares fermentables. Los materiales lignocelulósicos son altamente resistentes a la hidrólisis, ya que el conjunto de celulosa, hemicelulosa y lignina, están unidos entre sí por enlaces covalentes, diversos puentes intermoleculares y fuerzas de van der Waals (Kumar, 2010).

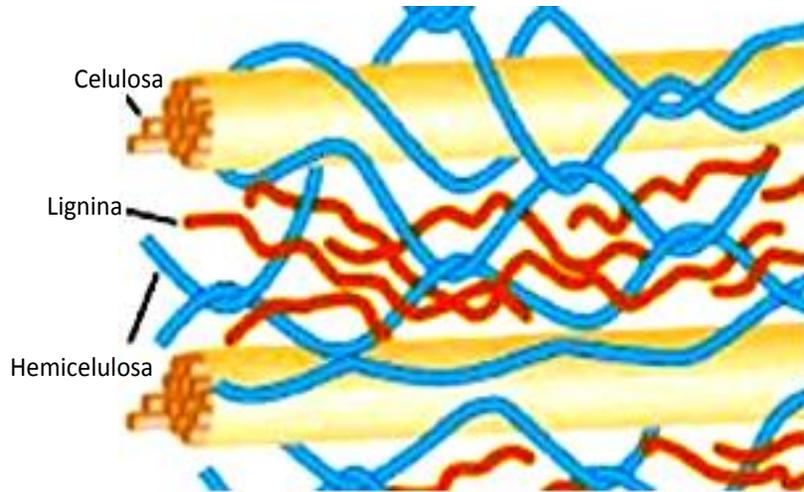


Figura 4. Esquema de la estructura general de los materiales lignocelulósicos.

El objetivo de someter a pretratamiento a los materiales lignocelulósicos es reducir la cristalinidad de la celulosa, aumentar el área superficial del material y promover la generación de regiones amorfas en la celulosa, de este modo se facilita la hidrólisis del material por agentes químicos o enzimas hidrolíticas (Figura 5).

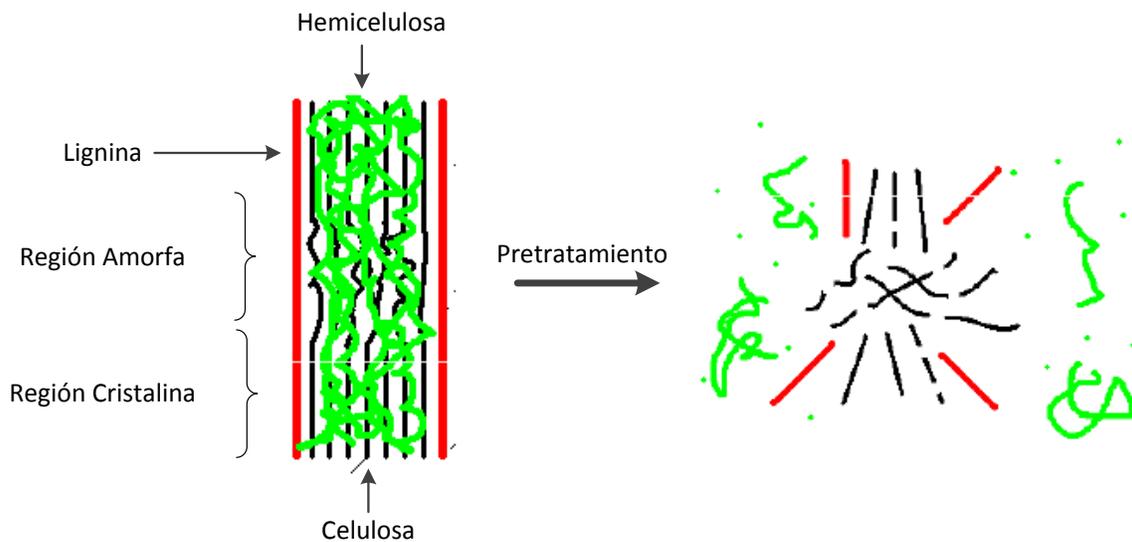


Figura 5. Representación esquemática del efecto de los pretratamientos.

Ya que existe una gran variedad de materiales lignocelulósicos con características fisicoquímicas diferentes, es necesario adoptar pretratamientos adecuados con base en las propiedades de cada material lignocelulósico. Actualmente existen diversos pretratamientos para llegar a este fin, los cuales se pueden dividir en cuatro grupos:

- Físicos
- Fisicoquímicos
- Biológicos
- Químicos

Pretratamientos Físicos

Los pretratamientos físicos se pueden dividir en dos categorías principales:

- ✓ *Mecánicos*: consisten en la reducción del tamaño de partícula del material lignocelulósico con el fin de aumentar el área superficial del material, disminuir el grado de polimerización de los compuestos y la cristalinidad de la celulosa.
- ✓ *Térmicos*: consiste en la exposición de los materiales lignocelulósicos a altas temperaturas, provocando que la hemicelulosa y lignina comiencen a solubilizarse dejando a la celulosa expuesta para ser hidrolizada posteriormente.

Pretratamientos Fisicoquímicos

Son conocidos también como explosión con vapor, ya que consisten principalmente en someter a los materiales lignocelulósicos con vapores (o gases) a altas presiones y temperaturas, seguido de una reducción súbita de la presión que provoca la explosión de la estructura fibrosa del material lignocelulósico y con esto el aumento del área superficial accesible y en algunos procesos la reducción del contenido de lignina, descristalización de celulosa y prehidrólisis de hemicelulosa; entre los más importantes se encuentran los pretratamientos AFEX

(*Ammonia fiber explosion*), Autohidrólisis (emplean sólo vapor de agua) y Explosión con CO₂.

Pretratamientos Biológicos

Los pretratamientos biológicos emplean cultivos de microorganismos y sus sistemas de enzimas sobre el material lignocelulósico, con el fin de romper la estructura de la lignina. Hongos de pudrición blanca, que pertenecen a los *Basidiomicetos*, son los organismos más eficaces y estudiados para el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos. Los radicales libres en las fracciones aromáticas generados por las enzimas oxidativas de los hongos, junto con catalizadores, resultan en la degradación de compuestos aromáticos (Xu, *et al.*, 2011).

Pretratamientos Químicos

Los pretratamientos químicos consisten en la utilización de agentes químicos con el fin de provocar alteraciones en la estructura lignocelulósica. Entre los pretratamientos más comunes se encuentran:

- ✓ Alcalino
- ✓ Ácido
- ✓ Ozonólisis
- ✓ Organosolv

Pretratamiento Alcalino

El efecto que tienen algunas bases sobre la materia lignocelulósica depende del contenido de lignina; estos pretratamientos incrementan la disponibilidad de la celulosa debido a una efectiva solubilización de lignina y en menor proporción solubilización de celulosa y hemicelulosa, comparado a otros pretratamientos como el ácido o hidrotérmicos.

Los pretratamientos alcalinos pueden ser llevados a cabo a temperatura ambiente y rangos de tiempo entre segundos y días, debido a que causan menor

degradación de azúcares que los pretratamientos ácidos; por otro lado, han demostrado ser pretratamientos más efectivos sobre residuos agrícolas; (Alvira, *et al.*, 2010).

Los pretratamientos alcalinos emplean principalmente bases como:

Hidróxido de Sodio, causa hinchazón, incremento de la superficie interna de la celulosa y disminución del grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, provocando además la ruptura estructural de la lignina.

Hidróxido de Calcio o Cal: remueve sustancias amorfas como la lignina aumentando la accesibilidad de la celulosa y la efectividad de las enzimas debido a la reducción de los sitios de adsorción no productivos. Además la cal remueve los grupos acetil de la hemicelulosa reduciendo el impedimento estérico de las enzimas y mejorando la digestibilidad de la celulosa (Alvira, *et al.*, 2010).

Básico Oxidante: este pretratamiento consiste en adicionar un agente oxidante (O_2 ó H_2O_2) a un pretratamiento alcalino con el objetivo de mejorar la remoción de lignina. En el caso del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se ha utilizado exitosamente por muchos años como blanqueador de pulpas de madera de alto contenido de lignina. El poder blanqueador del H_2O_2 se debe a la formación del anión hidroperóxido (HOO^-), formado en un medio alcalino de acuerdo a la siguiente reacción de equilibrio: $H_2O_2 + HO^- \leftrightarrow HOO^- + H_2O$; el cual es un nucleófilo fuerte que ataca preferentemente los grupos etilénicos y carbonilo presentes en la lignina y por otro lado la generación de radicales activos como radicales hidroxilo (HO^\bullet) y radicales anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que participan en la deslignificación (Run Cang Sun, *et al.*, 2000).

Pretratamiento Ácido Diluido.

En este pretratamiento se pone en contacto el material lignocelulósico con ácido sulfúrico en concentraciones bajas y altas temperaturas, provocando la alteración de los enlaces covalentes, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals que mantienen unidos a los componentes lignocelulósicos, que, en consecuencia,

provoca la hidrólisis de la hemicelulosa (Figura 6) y la reducción de la cristalinidad y prehidrólisis de la celulosa (Figura 7) (P. Redding, *et al.*, 2011). Es así que se obtienen altas recuperaciones de hemicelulosa en forma de monómeros (pentosas y hexosas) en la fracción líquida (licor prehidrolizado) y una fracción sólida con concentraciones altas de celulosa. También durante el pretratamiento se puede solubilizar la lignina que se condensa y se precipita.

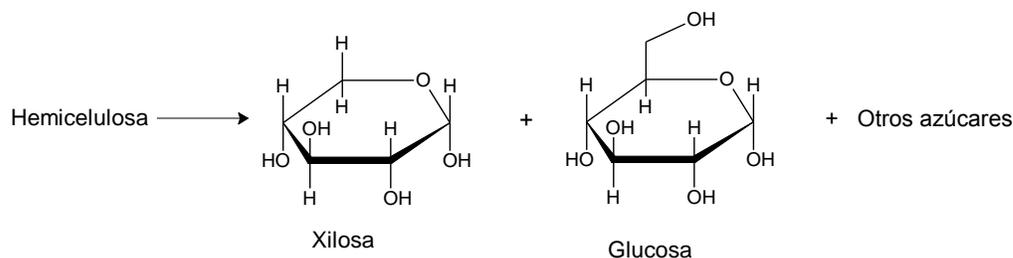


Figura 6. Hidrólisis de la fracción hemicelulósica.

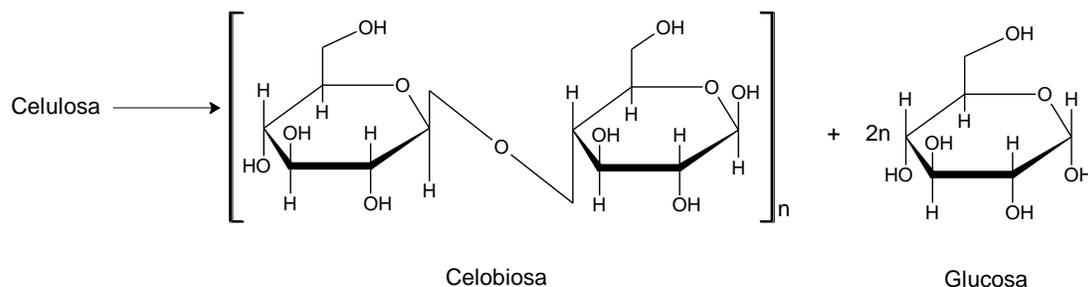


Figura 7. Hidrólisis de la fracción celulósica.

Aunque debido a las altas temperaturas y condiciones ácidas del medio, los azúcares de la hidrólisis se degradan (oxidan) produciendo dos compuestos: el Furfural (Figura 8), proveniente de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa); y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Figura 9) proveniente de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa), que son compuestos inhibidores para los procesos subsecuentes.

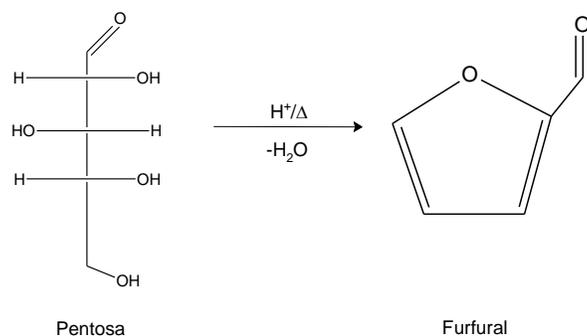


Figura 8. Obtención de Furfural a partir de la deshidratación de pentosas.

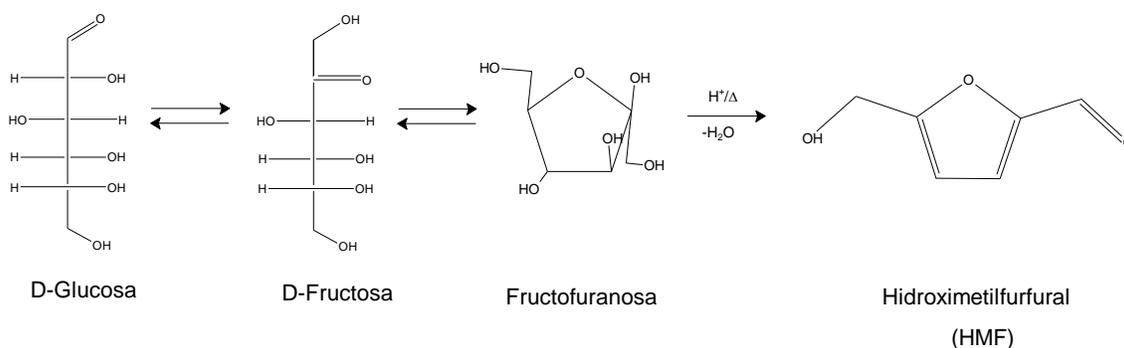


Figura 9. Obtención de HMF a partir de la deshidratación de hexosas.

En general, los pretratamientos mecánicos y térmicos se pueden combinar con los químicos para aumentar la disponibilidad de la celulosa para su hidrólisis.

Para la obtención de los azúcares susceptibles a fermentación, con el fin de obtener bioetanol, es necesario que los polisacáridos de los materiales lignocelulósicos sean convertidos a azúcares simples mediante una hidrólisis química o enzimática.

La hidrólisis química se lleva a cabo empleando un catalizador ácido para aumentar el rendimiento de los azúcares simples, provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa y celulosa del material lignocelulósico. La hidrólisis se lleva a cabo en dos etapas. La primera etapa busca principalmente hidrolizar la hemicelulosa, para esto se emplean generalmente condiciones muy ácidas (concentraciones de ácido de 30 a 70% v/v) y bajas temperaturas (de 30 a 40 °C). Mientras la segunda

etapa busca hidrolizar la celulosa generalmente a concentraciones bajas de ácido y altas temperaturas (de 180 a 230°C).

Por otra parte, la hidrólisis enzimática de los polisacáridos se lleva a cabo empleando enzimas hidrolíticas (celulasas) como catalizadores. En comparación con la hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática requiere menos costos de operación, ya que normalmente se llevan a condiciones suaves (aproximadamente 50°C y pH 4.8). La celulosa es hidrolizada por las celulasas que pueden ser producidas por diversos microorganismos incluyendo bacterias y hongos. Las celulasas fungales, especialmente de *Trichoderma reesei*, son las enzimas celulíticas más prometedoras para la liberación de azúcares reductores en la producción de etanol a escala comercial, (Xu, *et al.*, 2011).

Las celulasas son una mezcla de tres enzimas diferentes, endoglucanasa (1,4-β-D-glucano glucanohidrolasa), exoglucanasa (1,4-β-D-glucano celobiohidrolasa), y celobiasa (β-glucosidasa), que actúan de forma sinérgica para hidrolizar celulosa.

Las endoglucanasas atacan al azar los enlaces glucosídicos β-(1-4) de la celulosa para formar una cadena de oligosacáridos de menor longitud con extremos no reductores (Figura 10); las exoglucanasas liberan celobiosa de los extremos libres de las cadenas (Figura 11), y las β-glucosidasas degradan celobiosa en glucosa (Figura 12).

Las celulasas generalmente actúan sobre las regiones amorfas de la celulosa y muy pocas celulosas aisladas han mostrado la capacidad de hidrolizar celulosa cristalina. Por otro lado se sabe que las endoglucanasas y exoglucanasas se inhiben con la presencia de celobiosa mientras que las β-glucosidasas se inhiben por la presencia de glucosa, lo cual afecta negativamente la actividad de estas enzimas (Xu, *et al.*, 2011).

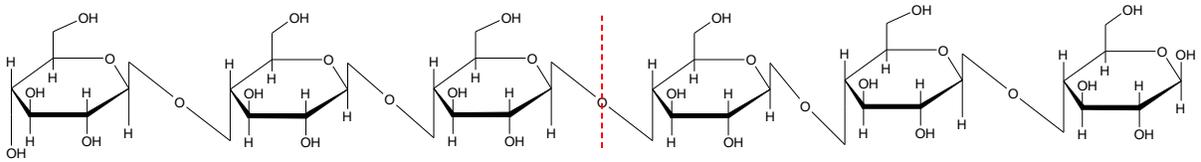


Figura 10. Ruptura de la celulosa para la formación de oligosacáridos de menor longitud por la acción de endoglucanasas.

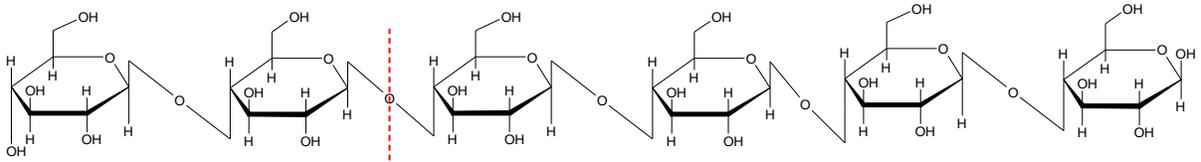


Figura 11. Obtención de celobiosa de los extremos libres de las cadenas de celulosa por la acción de exoglucanasas.

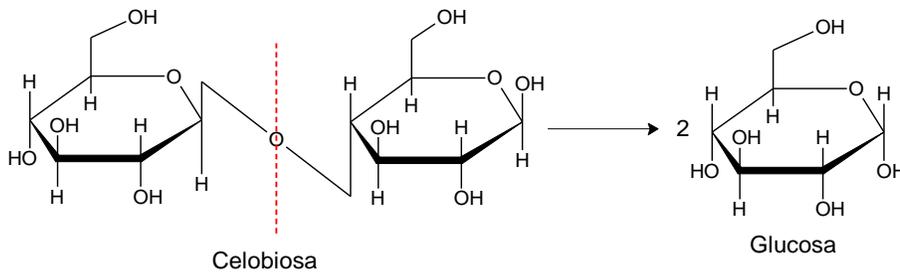


Figura 12. Obtención de glucosa a partir de la degradación de celobiosa por la acción de β -glucosidasas.

Se han realizado muchos estudios para encontrar la dosificación óptima de celulasas, pero los estudios muestran que esta dosificación y la relación entre endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas depende de las propiedades del sustrato y del pretratamiento utilizado (Xu, *et al.*, 2011).

En el caso de la hidrólisis de la hemicelulosa también existen una gran variedad de hemicelulasas provenientes de varios tipos de microorganismos, como bacterias, hongos y levaduras. La hidrólisis de xilano, que es la hemicelulosa en mayor proporción en la mayoría de los materiales lignocelulósicos, existen tres enzimas importantes que son la endo- β -(1-4)-xilanasas, que se encarga de catalizar

la hidrólisis de los enlaces β -(1-4) entre los residuos de D-xilosa provenientes de los heteroxilanos y los xilo-oligosacáridos; exo-xilanasas que liberan xilobiosas y β -xilosidasas que hidrolizan los xilo-oligosacáridos a xilosa (Xu, *et al.*, 2011).

Debido a la abundancia y disponibilidad de materiales lignocelulósicos, principalmente residuos agroindustriales; estos tienden a ser una tecnología sostenible para la producción de bioetanol. Aunque estos materiales requieren una etapa de pretratamiento adicional que incrementa los costos para la obtención de bioetanol. Actualmente, el pretratamiento, la hidrólisis enzimática y la fermentación son las áreas clave que están siendo investigadas para hacer a las materias primas lignocelulósicas competitivas para la producción de bioetanol (P. Redding, *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se empleará como material lignocelulósico el Pasto Privilegio Malla 40, proveniente del Municipio de Cardel, Estado de Veracruz.

Objetivo general

Evaluación del Pasto Privilegio como materia prima lignocelulósica para la obtención de azúcares susceptibles de fermentación para la producción de bioetanol.

Objetivos particulares

Evaluación y determinación de las condiciones óptimas del pretratamiento ácido diluido (concentración de ácido sulfúrico, temperatura y tiempo de reacción).

Evaluación de los pretratamientos alcalinos (básico con sosa, básico con cal y básico oxidante) y su combinación con el pretratamiento ácido como posibles pretratamientos para aumentar la disponibilidad de la celulosa del Pasto Privilegio para su posterior hidrólisis enzimática, a través de la cuantificación de los azúcares reductores.

Hipótesis

La etapa de pretratamiento al pasto privilegio, aumentará la disponibilidad de la celulosa para su posterior hidrólisis, aumentando la producción de azúcares susceptibles a fermentación, debido a la solubilización de lignina e hidrólisis y prehidrólisis de la hemicelulosa y celulosa respectivamente.

Caracterización Material Lignocelulósico

Se evaluó el potencial del Pasto Privilegio (Figura 13) como material lignocelulósico para la obtención de azúcares susceptibles a fermentación para la producción de bioetanol carburante; el Pasto Privilegio (*Panicum maximum*) proveniente del Municipio de Cardel, Estado de Veracruz fue proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Las principales características del Pasto Privilegio se pueden observar en la Tabla 1 y Tabla 2.

Tabla 1. Caracterización del Pasto Privilegio

Componente	Composición (%)	Desviación Estándar
Azúcares Totales	75.88	± 4.17
Azúcares Reductores	60.12	± 3.58
Grado de Polimerización	1.26	-
Lignina Soluble	6.85	± 0.04
Lignina Insoluble	15.64	± 0.62
Lignina Total	22.49	-
Cenizas	10.51	± 0.76
Humedad	2.95	± 0.01

Tabla 2. Perfil de azúcares obtenidos en la hidrólisis total del Pasto Privilegio

Azúcar	Fracción (%)
Glucosa	26.65
Xilosa	8.29
Celobiosa	0.00
Relación hexosa/pentosa	3.21



Figura 13. Pasto Privilegio Malla 40.

En la Figura 14 se presenta un resumen de la metodología experimental propuesta para el pretratamiento del Pasto Privilegio Malla 40, en esta se ha propuesto un pretratamiento ácido diluido, además, de un tren de pretratamientos que consiste en un pretratamiento básico (con NaOH, Cal o Básico Oxidante) seguido del pretratamiento ácido diluido. Después de cada pretratamiento (básico y ácido) se obtuvo la biomasa y licor pretratado los cuales fueron separados por filtración al vacío; posteriormente se determinó el contenido de azúcares reductores (AR), azúcares totales (AT) y lignina soluble en ácido (LSA) en el licor pretratado. La biomasa proveniente del pretratamiento ácido fue sometida a una hidrólisis enzimática; al licor hidrolizado de igual forma se le determinó el contenido de azúcares reductores (AR), azúcares totales (AT) y se identificaron y cuantificaron los azúcares susceptibles a ser fermentados.

Con el fin de evaluar el efecto de los pretratamientos se llevó a cabo la hidrólisis del material lignocelulósico sin pretratar.

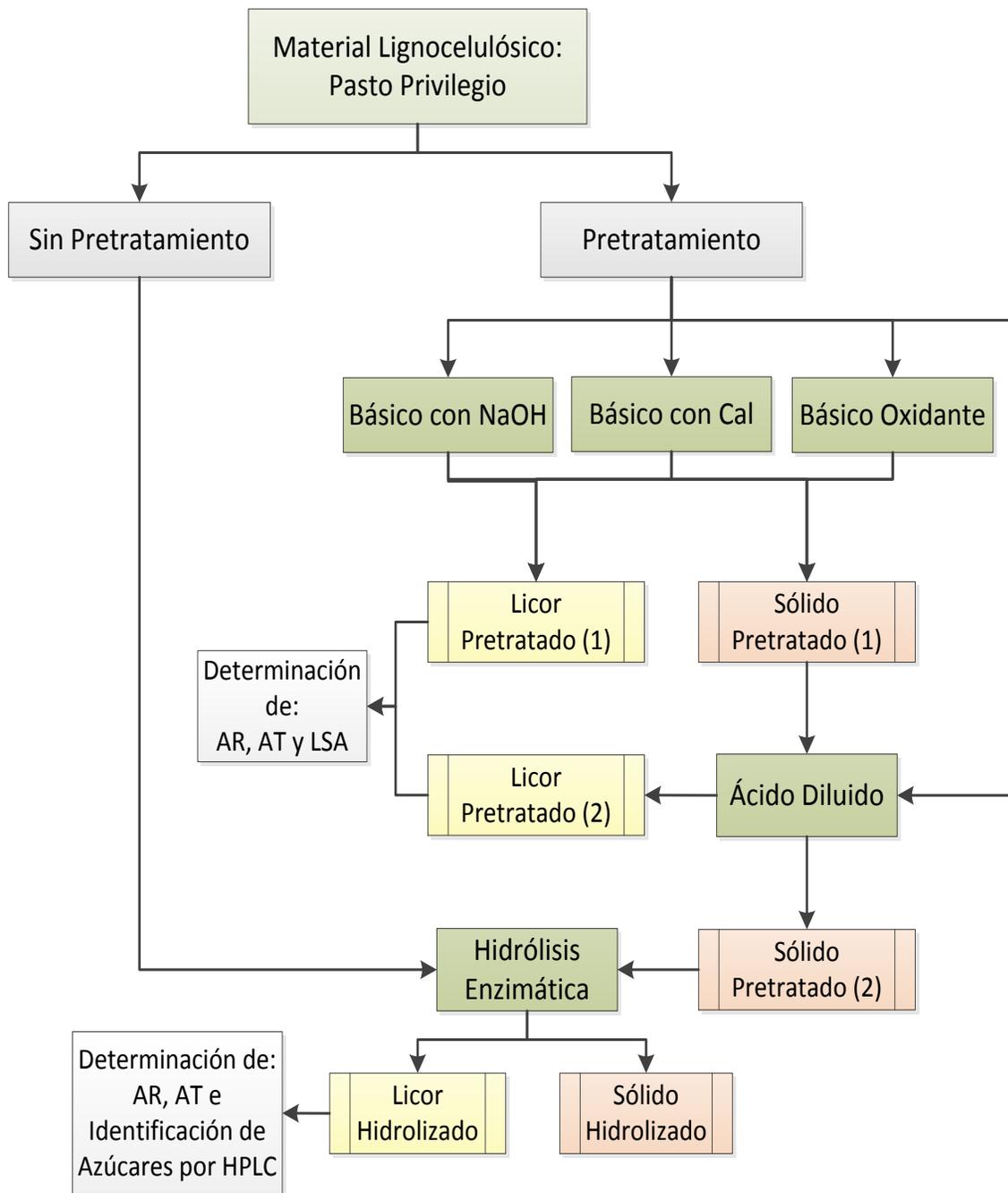


Figura 14. Esquema general de la Metodología Experimental propuesta para el Pretratamiento del Pasto Privilegio.

Planteamiento del Diseño Experimental para el Pretratamiento Ácido Diluido del Pasto Privilegio

Con base en la revisión bibliográfica, ((Raveendran, *et al.*, 2011), (P. Redding, *et al.*, 2011), (Xu, *et al.*, 2011) y (Ziyu, *et al.*, 2011)), se encontró que las principales variables (factores) que afectan el desempeño del pretratamiento ácido diluido son la temperatura, la concentración del ácido empleado y el tiempo de reacción; por lo cual se ha planteado un Diseño Experimental Factorial 2^3 con tres Compositos Centrales Aleatorio, con el fin de optimizar las condiciones del pretratamiento ácido diluido.

El objetivo del empleo de un diseño experimental es variar simultáneamente varios factores (variables independientes) pero evitando que estos cambien siempre en la misma dirección, así al no haber factores correlacionados se evita la realización de experimentos redundantes, además que el planteamiento de estos nos permiten explorar todas las combinaciones posibles entre los factores, con el fin de determinar la influencia de estos y sus combinaciones sobre las variables de respuesta seleccionadas con un mínimo número de experimentos (menores costos y tiempo) y disminuyendo la incertidumbre (aleatoriedad de los experimentos).

El Diseño Experimental Factorial 2^3 nos permite elegir tres factores (temperatura, concentración y tiempo) y dos niveles (máximo y mínimo) para cada factor, con el fin de determinar la variación del efecto de cada factor cuando cambian los niveles de los otros factores, permitiéndonos optimizar las variables de respuesta o dependientes. Además la combinación de este diseño experimental con un diseño compuesto (compositos centrales) nos permite explorar puntos fuera del rango experimental (puntos axiales) y la adición de tres puntos centrales mejora la reproducibilidad de los experimentos y por lo tanto su precisión (Figura 15).

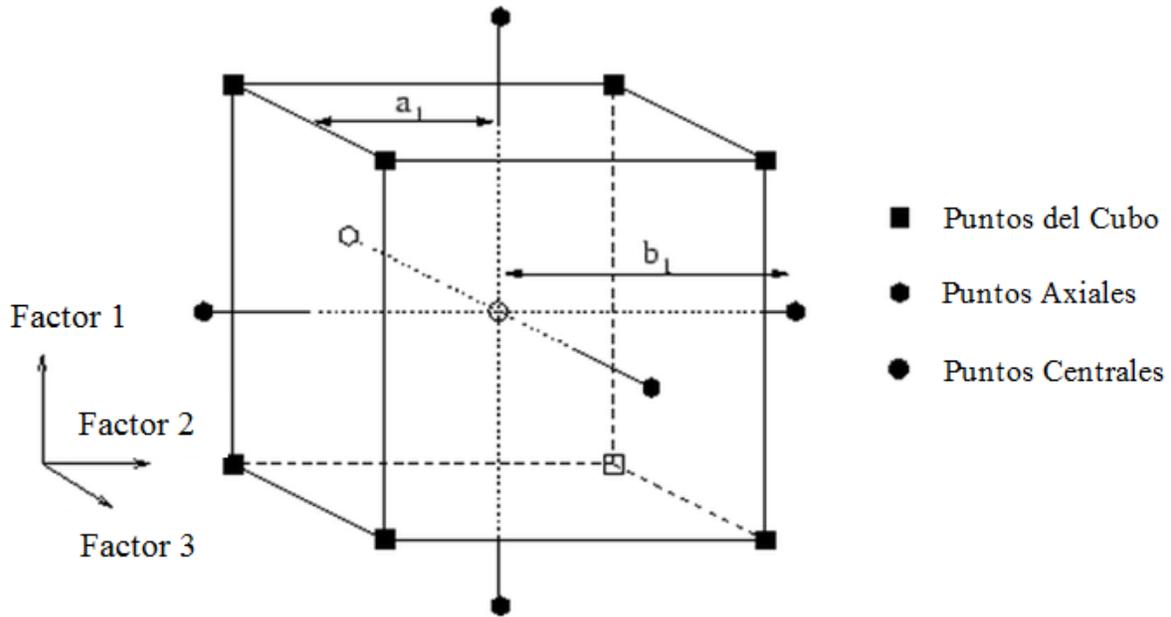


Figura 15. Representación esquemática del Diseño Experimental Factorial 2^3 con tres Compositos Centrales Aleatorio.

Como se mencionó anteriormente los tres factores considerados para el pretratamiento ácido diluido fueron temperatura (X_1), concentración de ácido sulfúrico (X_2) y tiempo de reacción (X_3).

Los valores centrales respectivamente para cada factor fueron: 120 °C, concentración de ácido sulfúrico al 1.2% p/p y 60 min, de acuerdo a la bibliografía consultada, Raveendran, *et al.*, 2011; P. Redding, *et al.*, 2011; Xu, *et al.*, 2011 y Ziyu, *et al.*, 2011.

Cada factor se varió en dos niveles, mínimo y máximo, con un intervalo de ± 20 °C, $\pm 0.3\%$ p/p y ± 30 minutos, respectivamente. Los niveles se codificaron con la notación -1 para el mínimo y +1 para el máximo. En la Tabla 3, se muestran los valores seleccionados de los factores, así como su valor mínimo y máximo. El diseño experimental constó de 19 corridas (Tabla 4) y las variables de respuesta seleccionadas para evaluar la efectividad de los pretratamientos fueron azúcares reductores (AR), azúcares totales (AT) y lignina soluble en ácido (LSA).

Tabla 3: Valores para los factores del Pretratamiento Ácido Diluido.

Factor	Central	[+1]	[-1]
Temperatura (°C)	120	140	100
C H ₂ SO ₄ (p/p%)	1.2	1.5	0.9
t (min)	60	90	30

Tabla 4: Diseño Experimental para el Pretratamiento Ácido Diluido.

Experimento	Temperatura (°C)	C H₂SO₄ (p/p%)	t (min)
6	140.0	0.9	90.0
2	100.0	0.9	90.0
15 (C*)	120.0	1.2	60.0
14	120.0	1.2	110.5
1	100.0	0.9	30.0
10	153.6	1.2	60.0
7	140.0	1.5	30.0
13	120.0	1.2	9.5
9	86.4	1.2	60.0
3	100.0	1.5	30.0
8	140.0	1.5	90.0
19 (C*)	120.0	1.2	60.0
18 (C*)	120.0	1.2	60.0
4	100.0	1.5	90.0
11	120.0	0.7	60.0
17 (C*)	120.0	1.2	60.0
5	140.0	0.9	30.0
12	120.0	1.7	60.0
16 (C*)	120.0	1.2	60.0

C* = Punto central

Pretratamiento Ácido Diluido

Como se mencionó anteriormente se empleó como material lignocelulósico Pasto Privilegio Malla 40. Con base en el diseño de experimento del pretratamiento ácido diluido se prepararon disoluciones de ácido sulfúrico a concentraciones de 1.7, 1.5, 1.2, 0.9, 0.7 y 0.5 % p/p, a partir de ácido sulfúrico concentrado (96.10%); las disoluciones fueron preparadas antes de ser requeridas.

Los pretratamientos fueron llevados a cabo en un Reactor Batch, “A3260HC2EB, Parr” con capacidad de 100 mL, el cual fue operado desde el Sistema de Control, “Power Controller 4875, Parr” (Figura 16).

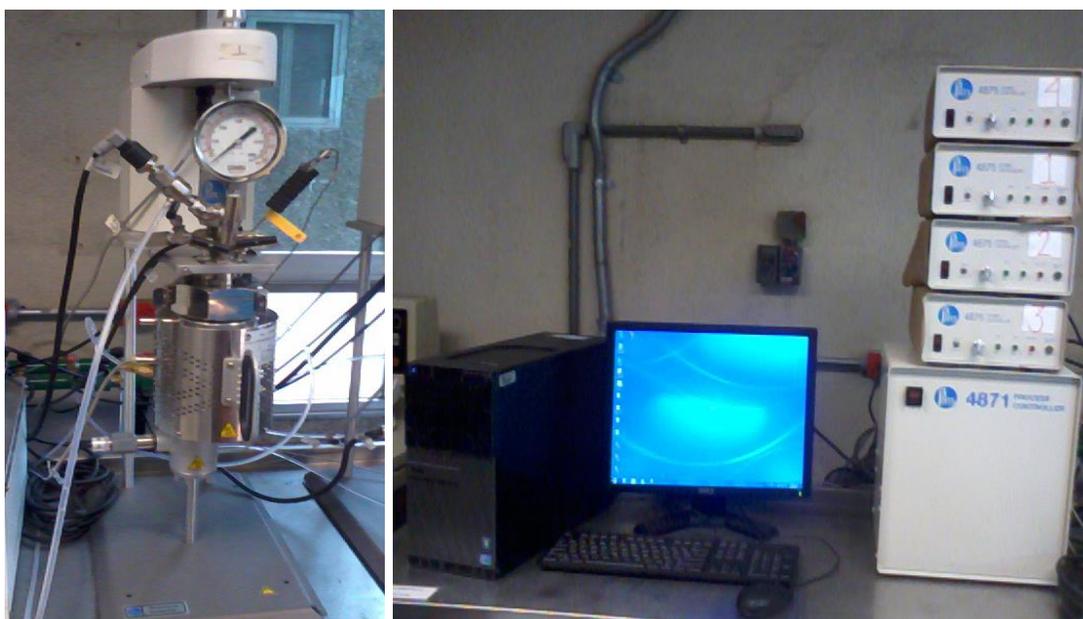


Figura 16. Reactor Batch, “A3260HC2EB, Parr” y Sistema de Control, “Power Controller 4875, Parr”.

Para el reactor se utilizó una relación biomasa - disolución de ácido de 1:10 (1g de biomasa en 10 mL de disolución de ácido diluido) y el pH de la mezcla se midió con tiras pH Merck® (pH 0-14). Posteriormente, en el sistema de control se programaron las condiciones de operación; temperatura y tiempo de reacción, además de requerir un tiempo de calentamiento para alcanzar la temperatura deseada, un tiempo de enfriamiento para poder llevar a cabo la descarga segura

del reactor a temperatura ambiente y la velocidad de agitación durante la operación.

El tiempo de calentamiento fue estimado a partir de que el sistema de calentamiento aumenta la temperatura interna de 3 a 5 °C por minuto, mientras que el tiempo de enfriamiento y la velocidad de agitación para todas las corridas experimentales se establecieron en 30 min aproximadamente y 250 rpm, respectivamente.

El calentamiento del reactor se llevó a cabo por un calentador eléctrico y el enfriamiento por un serpentín, usando agua (aproximadamente a 4°C) como líquido de enfriamiento. La temperatura interna del reactor fue medida por un termopar dentro del reactor, la señal es enviada al sistema de control para mantener la temperatura deseada (set-point).

Una vez terminado el ciclo de operación del reactor, nuevamente se midió el pH de la mezcla; la biomasa y el licor pretratados se separaron por filtración al vacío. La biomasa se almacenó en tubos falcón y se congeló para conservarla hasta su disposición. Por otro lado el volumen del licor recuperado se cuantificó y de este se tomaron aproximadamente 1 mL para llevar a cabo la determinación de azúcares reductores, azúcares totales y lignina soluble en ácido. El licor restante se almacenó en tubos falcón y se congeló hasta su disposición.

En el caso de la biomasa proveniente de algún pretratamiento básico, está se lavó dos veces con 2.5 mL de agua destilada para eliminar los sólidos solubles, la biomasa se separó del licor por filtración al vacío y se lavó con aproximadamente 5 mL de buffer de citratos (pH 5) con el fin de neutralizar el exceso de base. Nuevamente la biomasa fue separada del licor, se homogenizó y se determinó su humedad por pérdida de peso, en una Termobalanza (*OHAUS® modelo MB45*). Posteriormente la biomasa fue sometida al pretratamiento ácido diluido a las condiciones de temperatura, concentración de ácido y tiempo óptimos elegidos.

Pretratamiento Básico con NaOH

Con base en trabajos anteriores (Guzmán Barrera, 2012 y Vázquez Bolaños, 2012) se establecieron las condiciones del Pretratamiento Básico con NaOH (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones del Pretratamiento Básico con NaOH del Pasto Privilegio.

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	120
Concentración NaOH (% p/v)	1
Tiempo de reacción (min)	60
% Sólidos (p/v)	10

Al igual que el pretratamiento ácido diluido, el pretratamiento básico con NaOH se llevó a cabo en el Reactor Batch "A3260HC2EB, Parr", siguiendo el mismo procedimiento para la operación del reactor.

El reactor fue cargado con 1 gramo de biomasa (base seca) y 10 mL de disolución de hidróxido de sodio al 1% p/v. El pH de la mezcla fue medido. Posteriormente, en el sistema de control se programaron las condiciones de temperatura y tiempo de reacción que se muestran en la Tabla 5. Para este pretratamiento se estableció un tiempo de calentamiento y enfriamiento de 40 min y velocidad de agitación de 250 rpm.

Terminado el ciclo de operación del reactor, el pH de la mezcla fue medido. Posteriormente la biomasa y el licor pretratados fueron separados por filtración al vacío, la biomasa pretratada se lavó dos veces con 1.5 mL de agua destilada y nuevamente separada del líquido. El líquido recuperado es mezclado con el licor pretratado y el volumen total se cuantificó. De este último licor se tomaron aproximadamente 3 mL para determinar el contenido de azúcares reductores, azúcares totales y lignina soluble en ácido. El resto del licor se almacenó en tubos falcón y se congeló para conservarlo hasta su disposición. Mientras tanto la biomasa se almacenó en tubos falcón para su posterior disposición en el pretratamiento ácido diluido.

Pretratamiento Básico con Cal

Las condiciones propuestas para el Pretratamiento Básico con Cal (Vázquez Bolaños, 2012) se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones del Pretratamiento Básico con Cal del Pasto Privilegio.

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	120
Concentración _{cal} (% p/v)	1
Tiempo de reacción (min)	60
% Sólidos (p/v)	10

El pretratamiento básico con cal, al igual que los pretratamientos anteriores, se llevó a cabo en el Reactor Bach, siguiendo una metodología similar al pretratamiento básico con hidróxido de sodio, empleando en su lugar una suspensión de óxido de calcio comercial (cal) al 1% p/v.

Pretratamiento Básico Oxidante

Las condiciones propuestas para el Pretratamiento Básico Oxidante (Vázquez Bolaños, 2012) se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones del Pretratamiento Básico Oxidante del Pasto Privilegio.

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	35
Concentración _{H₂O₂} (% v/v)	9
pH ajustado con NaOH 2.5 M	11.5
Tiempo de reacción (h)	26
% Sólidos (p/v)	15

Para este pretratamiento se utilizó como agente oxidante peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual fue preparado previamente a ser utilizado a partir de H₂O₂ al 30% v/v. Como agente básico se empleó hidróxido de sodio 2.5 M, con el cual se ajustó el pH del H₂O₂ de 2.51 a 11.45, con el fin aumentar su poder oxidante. Posteriormente en un tubo de ensaye de 30 mL se colocó 1 gramo de biomasa

(base seca) y se le adicionaron 15 mL de la solución de H₂O₂ al 9% v/v, la mezcla se homogenizó, tratando de que la biomasa estuviese siempre en contacto con el peróxido. La reacción se llevó a cabo a 35°C y 250 rpm en una incubadora por 26 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la biomasa y el licor pretratados fueron separados por filtración al vacío, la biomasa pretratada fue lavada dos veces con 1.5 mL de agua destilada y nuevamente separada del líquido. El líquido recuperado se mezcló con el licor pretratado y el volumen total se cuantificó. De este último licor se tomaron aproximadamente 3 mL para determinar el contenido de azúcares reductores, azúcares totales y lignina soluble en ácido. El resto del licor se almacenó en tubos falcón y se congeló para conservarlo hasta su disposición. Mientras tanto la biomasa se lavó con aproximadamente 5 mL de buffer de citratos (pH 5) con el fin de neutralizar el exceso de base. Nuevamente la biomasa se separó del licor, se homogenizó y se determinó su humedad por pérdida de peso; por último ésta se almacenó en tubos falcón y se congeló para conservarla hasta su disposición.

Hidrólisis Enzimática

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico, tanto para el material sin pretratar y pretratado, con el objetivo de evaluar el efecto de los pretratamientos ácido diluido y básico más ácido diluido.

Además para la hidrólisis enzimática de los materiales se utilizaron dos complejos enzimáticos comerciales diferentes, denominados E-6 y E-7, con las siguientes características (Tabla 8)

Tabla 8. Caracterización de los complejos enzimáticos

Complejo Enzimático	E-6	E-7
AR (mg/mL enzima)	11.83	31.07
AT (mg/mL enzima)	157.08	133.82
Actividad Enzimática (FPU/mL)	142.30	463.00
Actividad de Endocelulasas (UI/mL)	2.81	13.70
Actividad de Exocelulasas (UI/mL)	0.09	0.16
Actividad de β-glucosidasas (UI/mL)	0.90	0.90

Cada hidrólisis se realizó pesando 100 mg de biomasa base seca (por lo cual fue necesario determinar la humedad de la biomasa sin pretratar y pretratados, en la Tabla 9 se muestra la humedad promedio de los materiales), y se calculó el volumen de enzima y buffer de citratos (pH 4.80) necesarios para tener un volumen total de 1 mL, con base en trabajos anteriores (Vázquez Bolaños, 2012 y Guzmán Barrera, 2012) se estableció una relación de 0.9 mL de enzima por g biomasa seca y una relación del 10% p/v biomasa seca-volumen total (enzima-buffer), a continuación se muestra un cálculo:

$$V_{enzima}(mL) = \left(0.9 \frac{\text{mL de enzima}}{\text{g biomasa seca}}\right) \cdot (m_{biomasa\ seca}(g))$$

$$V_{enzima}(mL) = \left(0.9 \frac{\text{mL de enzima}}{\text{g biomasa seca}}\right) \cdot (0.1\ \text{g biomasa seca}) = 0.09\ \text{mL de enzima}$$

$$V_{buffer}(mL) = V_{total}(mL) - V_{enzima}(mL)$$

$$V_{buffer}(mL) = 1\ \text{mL} - 0.09\ \text{mL} = 0.91\ \text{mL Buffer de Citratos}$$

Tabla 9. Determinación de la Humedad Pasto Privilegio Malla 40

Pretratamiento	% Humedad Promedio	Fracción de Biomasa Seca
Sin Pretratar	6.62	0.93
Básico NaOH	76.39	0.24
Básico NaOH + Ácido Dil.	67.13	0.33
Básico CaO	76.39	0.24
Básico CaO + Ácido Dil.	63.9	0.36
Básico Oxidante	74.81	0.25
Básico Oxidante + Ácido Dil.	57.4	0.43

Una vez pesada la biomasa se agregó la cantidad necesaria de enzima y buffer de citratos (para mantener el pH óptimo de la enzima) en viales con tapa rosca de 20mL y se incubó a 50°C, 180 rpm durante un tiempo de reacción de 60 minutos (Vázquez Bolaños, 2012). Al término de la reacción, los viales se sumergieron en un baño de agua a ebullición por 5 minutos con el objetivo de desnaturalizar la enzima y desactivarla.

La biomasa y el licor hidrolizados se centrifugaron dos veces a 10,000 rpm durante 10 minutos para separar la fase líquida del sólido. El licor hidrolizado se almacenó en tubos eppendorf y una parte de las muestras se dispuso para llevar a cabo la determinación de azúcares reductores, azúcares totales e identificación y cuantificación de azúcares.

Determinación de Lignina Soluble en Ácido

La determinación de lignina en el licor debe llevarse a cabo en un tiempo menor de 6 horas después de la hidrólisis, debido a la repolimerización de esta. Con el fin de tener resultados comparativos entre las corridas experimentales, la determinación de lignina soluble en ácido se llevó a cabo en un tiempo de 30 a 40 minutos después de finalizar el ciclo de operación del reactor.

La lignina soluble en ácido contenida en el licor se determinó con base en la técnica “*Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*” del “*Laboratory Analytical Procedure (LAP)*”.

La técnica consiste en realizar un barrido espectral desde una longitud de onda de 190 a 500 nm, usando como blanco agua destilada o ácido sulfúrico al 4%. Con base en valores recomendados de longitud de onda para diversos materiales lignocelulósicos, se ha establecido que a una longitud de onda de 240nm la absorbancia de la muestra debe estar dentro del rango de 0.7 a 1.0, para que el ensayo sea válido; si lo anterior no ocurre, se deben realizar diluciones de las muestras.

Por último, la cantidad de lignina soluble en ácido en porcentaje, se calculó de la siguiente manera:

$$\%LSA = \frac{UV_{abs} \cdot Volumen\ de\ Filtrado \cdot Dilución}{\epsilon \cdot Peso\ de\ la\ Biomasa\ sin\ humedad \cdot ancho\ de\ la\ celda}$$

Dónde:

- UV_{abs} : valor de la absorbancia de la muestra.
- Volumen del filtrado: [mL]
- ϵ = absorptividad (biomasa) a la longitud de onda específica (Tabla 10)
- Peso de la biomasa seca: [mg]
- Ancho de la celda [cm] (Tabla 10)
- Dilución: factor de dilución de la muestra.

Tabla 10. Parámetros para la determinación de Lignina Soluble en Ácido.

ϵ (absortividad a 240 nm)	25
Ancho de la celda [cm]	0.40

Determinación de Azúcares Reductores

Se determinaron azúcares reductores a los licores, usando el método colorimétrico DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico), donde el grupo aldehído de los azúcares reductores reaccionan con el grupo 3-nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para producir el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Este último reacciona con el reactivo DNS para producir ozazona (que es un compuesto colorido, de tonalidad amarilla) y el ácido correspondiente al carbohidrato que actuó como agente reductor (Figura 17).

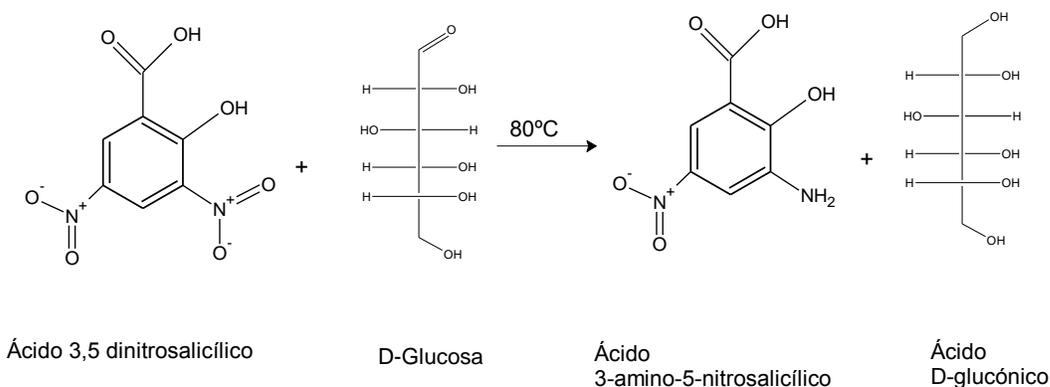


Figura 17. Reacción de hidrólisis y condensación de glucosa para la cuantificación de azúcares reductores.

Para esto fue necesario elaborar una curva patrón de azúcares reductores a diferentes concentraciones (Figura 34 del anexo B), se usó glucosa como azúcar reductor. Para la construcción de la curva patrón se preparó una solución de glucosa 1000 µg/mL (1 mg/mL). Se pesó 0.01 g de glucosa y se disolvió en 10 mL de agua destilada. De esta solución se tomaron volúmenes de 100, 200, 300, etc. hasta 1000 µL y se depositaron en tubos de ensaye con rosca. A los tubos de ensaye con volúmenes de 100 a 900 µL de la solución de glucosa se les agregó agua destilada para completar un volumen total de 1000 µL. Además se preparó un tubo con 1 mL agua destilada como blanco.

A los 11 tubos se les agregó 1 mL del reactivo DNS. Los tubos se sumergieron en un baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo los tubos fueron sacados del baño, se dejaron enfriar, se les agregó 8 mL de agua destilada y fueron agitados para homogenizar los tubos en el Vortex. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

Con estos datos se llevó a cabo la construcción de la gráfica de absorbancia contra concentración de glucosa, se realizó una regresión lineal para generar una ecuación de la absorbancia en función de la concentración de glucosa.

Para determinar el contenido de azúcares reductores de los licores pretratados e hidrolizados se tomó 1 mL de la muestra y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente. El método DNS para determinar azúcares reductores sólo es válido para un rango de concentración de azúcares de 100 a 1000 µg/mL, por lo que es necesario llevar a cabo diluciones de las muestras.

Determinación de Azúcares Totales

También se determinó el contenido de azúcares totales en el licor prehidrolizado, usando el método colorimétrico Fenol-Sulfúrico, ya que a condiciones ácidas y altas temperaturas los carbohidratos (azúcares) son sensibles, es decir, se hidrolizan y deshidratan dando lugar a la formación de furfural y HMF (5-hidroximetilfurfural), que al reaccionar con el fenol forman compuestos coloridos

que pueden ser leídos en una longitud de onda específica, como por ejemplo, en el caso de las pentosas, el color de la reacción debe ser leído a una longitud de onda de 480 nm, mientras para las hexosas a 490 nm (Figura 18).

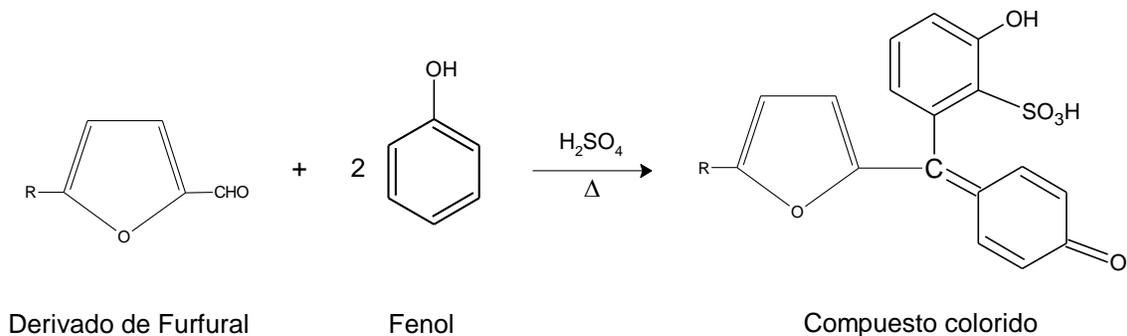


Figura 18. Determinación de Azúcares Totales por el Método Fenol-Sulfúrico.

Para esto fue necesario elaborar una curva patrón de glucosa a diferentes concentraciones (Figura 35 del anexo B). Para la construcción de la curva patrón se preparó una solución de glucosa 100 µg/mL. Se pesó 0.01 g de glucosa y se disolvió y aforó en 10 mL; de esta solución se tomó 1 mL y se aforó nuevamente a 10 mL. De la solución anterior se tomaron volúmenes de 100, 200, 300, etc. hasta 1000 µL y se depositaron en tubos de ensaye con rosca. A los tubos de ensaye con volúmenes de 100 a 900 µL de la solución de glucosa se les agregó agua destilada para completar un volumen total de 1000 µL (1 mL). Además se preparó un tubo con 1 mL agua destilada como blanco.

A los 11 tubos se les agregó 1 mL de solución de fenol al 5% p/v, se mezclaron y posteriormente se les adicionó cuidadosamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, los tubos se homogenizaron con Vortex y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

Con estos datos se llevó a cabo la construcción de la gráfica de absorbancia contra concentración de glucosa (curva patrón), se realizó una regresión lineal para generar una ecuación de la absorbancia en función de la concentración de glucosa.

Para determinar el contenido de azúcares totales de los licores pretratados e hidrolizados se tomó 1 mL de la muestra y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente. El método Fenol-Sulfúrico para determinar azúcares totales sólo es válido para un rango de concentración de azúcares de 10 a 100 µg/mL, por lo que es necesario llevar a cabo diluciones de las muestras.

Identificación de Azúcares por HPLC

En la actualidad, uno de los mejores métodos con los que se cuenta para conseguir una separación de componentes relacionados en una mezcla compleja es la cromatografía; en sus orígenes esta era solo una técnica de separación, pero la cromatografía se ha convertido en un método analítico que además de separar, nos permite identificar y cuantificar los compuestos presentes en muestras líquidas o gaseosas.

En esta técnica, los analitos son separados con base en sus distintas velocidades de desplazamiento, los analitos son disueltos en la fase móvil y se hacen pasar a través de una fase estacionaria que se mantiene fija en una columna; las fases se eligen de tal modo que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre las fases, por lo que los analitos que son fuertemente retenidos en la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que los que se retienen débilmente avanzan con mayor rapidez.

Entre las técnicas cromatográficas en la que la fase móvil es un líquido, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es la más empleada, la cual surgió por la necesidad de aumentar la eficiencia de la separación y así incrementar su resolución.

El cromatógrafo de líquidos consta de una serie de elementos indispensables que son: sistema de suministro de la fase móvil (depósito de disolventes y bomba de alta presión), sistema de inyección, columna cromatográfica y detector. La identificación y determinación de los componentes de la fase móvil se realizó mediante un detector de dispersión de luz (ELSD) acoplado con un detector de

absorbancia UV-Vis de diodos en serie (DAD) a una longitud de onda de 280 nm, con el fin de comprobar que las señales detectadas con el ELSD pertenecieran a los azúcares de interés (glucosa, xilosa, sacarosa y celobiosa), y no a otras fracciones como las proteínas provenientes de los complejos enzimáticos. En la Tabla 11 se muestran las condiciones empleadas para el método HPLC.

Tabla 11. Condiciones del Método HPLC utilizado.

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	35 min
Volumen de inyección	10 µL
Fase móvil	Agua 18%, Acetonitrilo 82%
Rampa	60 min, relación de acetonitrilo final 65%
Columna	Tamaño de partícula 5µm, tamaño de poro 110Å, rango de pH: 2.5 a 7.5

Para la identificación y cuantificación de los componentes, se utilizó el método de estándar interno que consiste básicamente en añadir una cantidad conocida de un compuesto patrón a la muestra a analizar, con el fin de compensar posibles errores derivados de la manipulación de la muestra.

Para realizar la calibración se prepararon disoluciones de concentraciones crecientes de los compuestos a analizar (glucosa, manosa, xilosa y celobiosa) a las que se les añadió una cantidad idéntica del compuesto estándar (alanina) en una relación volumen de muestra-volumen de estándar 9:1.

Tras obtener los correspondientes cromatogramas, se llevó a cabo la integración de las áreas de los componentes a analizar y el estándar interno, con el fin de elaborar los gráficos que representen la concentración del compuesto a analizar en función de la relación de áreas analito/estándar interno (Figura 37-Figura 40 del

anexo C), además de determinar los tiempos de retención de cada componente y estándar a estas condiciones (Tabla 12).

Tabla 12. Tiempos de retención de los analitos y estándar a analizar

Analito	Tiempo de retención (min)
Xilosa	4 a 5
Manosa	6 a 7
Glucosa	7 a 9
Celobiosa	19 a 21
Alanina (Estándar)	26 a 30

Los licores hidrolizados y complejos enzimáticos se sometieron a análisis por HPLC bajo las condiciones anteriores con el fin de identificar y cuantificar la concentración de los azúcares estudiados (Figura 41-Figura 50 del anexo D).

Determinación de las condiciones óptimas del pretratamiento ácido diluido del Pasto Privilegio

El objetivo del diseño experimental fue determinar las condiciones para optimizar la obtención principalmente de azúcares reductores en la etapa de pretratamiento.

El dominio experimental está dado por la combinación de los factores (variables independientes): temperatura, concentración de ácido y tiempo, los cuales fueron distribuidos entre sí de manera aleatoria con el fin de disminuir la incertidumbre entre estos. Las variables de respuesta seleccionadas fueron: azúcares reductores (AR), azúcares totales (AT) y lignina soluble en ácido (LSA).

Se empleó un diseño de composito central 2³, generado con ayuda del programa “*Statistica 10.1*”. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con el fin de determinar los factores que presentan significancia sobre las respuestas, es decir, qué variables independientes afectan el comportamiento de las variables de respuesta ya sea individualmente o en combinación de manera positiva o negativa.

Para el análisis de las superficie de respuesta, se empleó un modelo cuadrático (Ecuación 1) considerando los efectos principales de las variables independientes, además de los efectos de interacción de dos vías, que incluye interacciones entre temperatura-concentración (T-C), temperatura-tiempo (T-t), y concentración-tiempo (C-t) (P. Redding, *et al.*, 2011).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \dots\dots\dots \text{Ec.1}$$

En donde Y es el valor de la variable de respuesta (%LSA, AR o AT); X₁, X₂ y X₃ son las variables independientes codificadas: temperatura, concentración de ácido y tiempo de reacción, respectivamente. β₀ es el coeficiente intersección; y β_i, β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes lineal, cuadrático y de interacción entre las variables

independientes, respectivamente. En la Tabla 13 se muestran los coeficientes de regresión.

Tabla 13. Coeficientes de regresión del modelo cuadrático para cada variable de respuesta.

Coeficiente de Regresión	%LSA	Desviación Estándar %LSA (\pm)	%AR promedio (mg AR/mg biomasa)	Desviación Estándar AR (\pm)	%AT promedio (mg AR/mg biomasa)	Desviación Estándar AT (\pm)
β_0	7.45	0.53	14.12	1.17	18.73	1.16
β_1	1.99	0.32	3.24	0.71	3.87	0.70
β_{11}	0.40	0.32	-1.85	0.71	-2.55	0.70
β_2	0.25	0.32	1.25	0.71	0.86	0.70
β_{22}	-0.29	0.32	0.45	0.71	-0.94	0.70
β_3	0.41	0.32	0.85	0.71	0.76	0.70
β_{33}	-0.23	0.32	-0.12	0.71	-0.60	0.70
β_{12}	-0.25	0.42	-1.39	0.93	-1.48	0.91
β_{13}	0.00	0.42	-0.26	0.93	-0.48	0.91
β_{23}	-0.26	0.42	-0.51	0.93	-0.30	0.91

Para determinar las condiciones del pretratamiento que maximizan el valor de las variables de respuesta, se realizó un análisis individual para cada variable de respuesta empleando la metodología de Superficies de Respuesta, dando mayor importancia a la variable de respuesta azúcares reductores, debido a que el efecto principal de este pretratamiento es la hidrólisis de la fracción de hemicelulosa en forma de monómeros, pentosas (xilosa y arabinosa principalmente) y hexosas (manosa y glucosa principalmente) en la fracción líquida. En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos para cada corrida experimental.

Tabla 14. Resultados del Pretratamiento Ácido Diluido del Pasto Privilegio

Experimento	%AR prom. (mg AR/mg biomasa)	Desv. Estándar AR	%AT prom. (mg AT/mg biomasa)	Desv. Estándar AT	GP	%LSA
6	20.35	0.10	22.67	0.49	1.11	10.04
2	7.73	0.18	10.41	0.18	1.35	5.55
15 (C*)	16.75	0.22	21.87	1.22	1.31	9.52
14	14.12	0.06	17.85	1.52	1.26	7.52
1	6.52	0.19	8.91	0.46	1.37	5.30
10	10.48	0.02	15.85	0.14	1.51	13.11
7	18.16	0.19	18.58	2.53	1.02	9.17
13	10.66	0.03	14.70	0.64	1.38	6.02
9	4.53	0.15	5.64	0.51	1.25	3.97
3	10.09	0.32	10.30	0.14	1.02	5.68
8	16.30	0.39	16.94	2.10	1.04	8.38
19 (C*)	14.80	0.17	18.35	0.15	1.24	6.96
18 (C*)	13.28	0.09	18.46	0.39	1.39	6.96
4	12.79	0.45	13.28	0.22	1.04	6.99
11	10.73	0.14	10.86	0.12	1.01	6.06
17 (C*)	13.46	0.05	17.88	0.09	1.33	6.88
5	16.64	0.25	20.39	0.96	1.23	7.71
12	17.28	0.08	19.77	3.39	1.14	7.10
16 (C*)	12.80	0.14	17.36	1.37	1.36	6.92

GP = Grado de Polimerización, AT/AR

C*= Punto central

Lignina Soluble en Ácido

La lignina, después de la celulosa, es el polímero más abundante en las plantas (aproximadamente del 15 al 30%), la cual se caracteriza por ser un material polifenólico, amorfo y con una estructura tridimensional derivada de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico), la cual proporciona rigidez a la pared celular y resistencia química, como por ejemplo a la degradación enzimática por parte de microorganismos. Por otra parte, la lignina tiene una baja solubilidad en ácidos mientras que en álcalis fuertes como el hidróxido de sodio es altamente soluble; por lo que se eligió como una variable de

respuesta para tratar de observar el efecto que el pretratamiento ácido diluido tiene sobre ésta.

Para validar la cuantificación de la lignina por el Método Lignina Soluble en Ácido, se comparó el perfil del espectro de absorbancia del Pasto Privilegio con el estándar de bagazo de caña y rastrojo de maíz, teniendo un espectro similar al del bagazo de caña, con lo cual se puede determinar el contenido de lignina soluble en ácido por este método a una longitud de onda de 240 nm (Vázquez Bolaños, 2012).

En el caso de esta variable de respuesta, se determinó por análisis de varianza que la temperatura es la única variable que muestra una influencia significativa, ya que $p < 0.05$ (Tabla 22 de anexo A). Esto es evidente al comparar el efecto de la disminución y aumento de la temperatura en los experimentos, sin tomar en cuenta lo que pasa con las otras dos variables independientes, el porcentaje de lignina soluble en ácido disminuye y aumenta, respectivamente. En la Figura 19, se muestran las superficies de respuesta predichas por el modelo para lignina soluble en ácido en función de la temperatura y concentración, para diferentes tiempos (-1, 0 y +1), donde podemos visualizar que independientemente de la concentración y el tiempo, la lignina soluble en ácido aumenta al aumentar la temperatura.

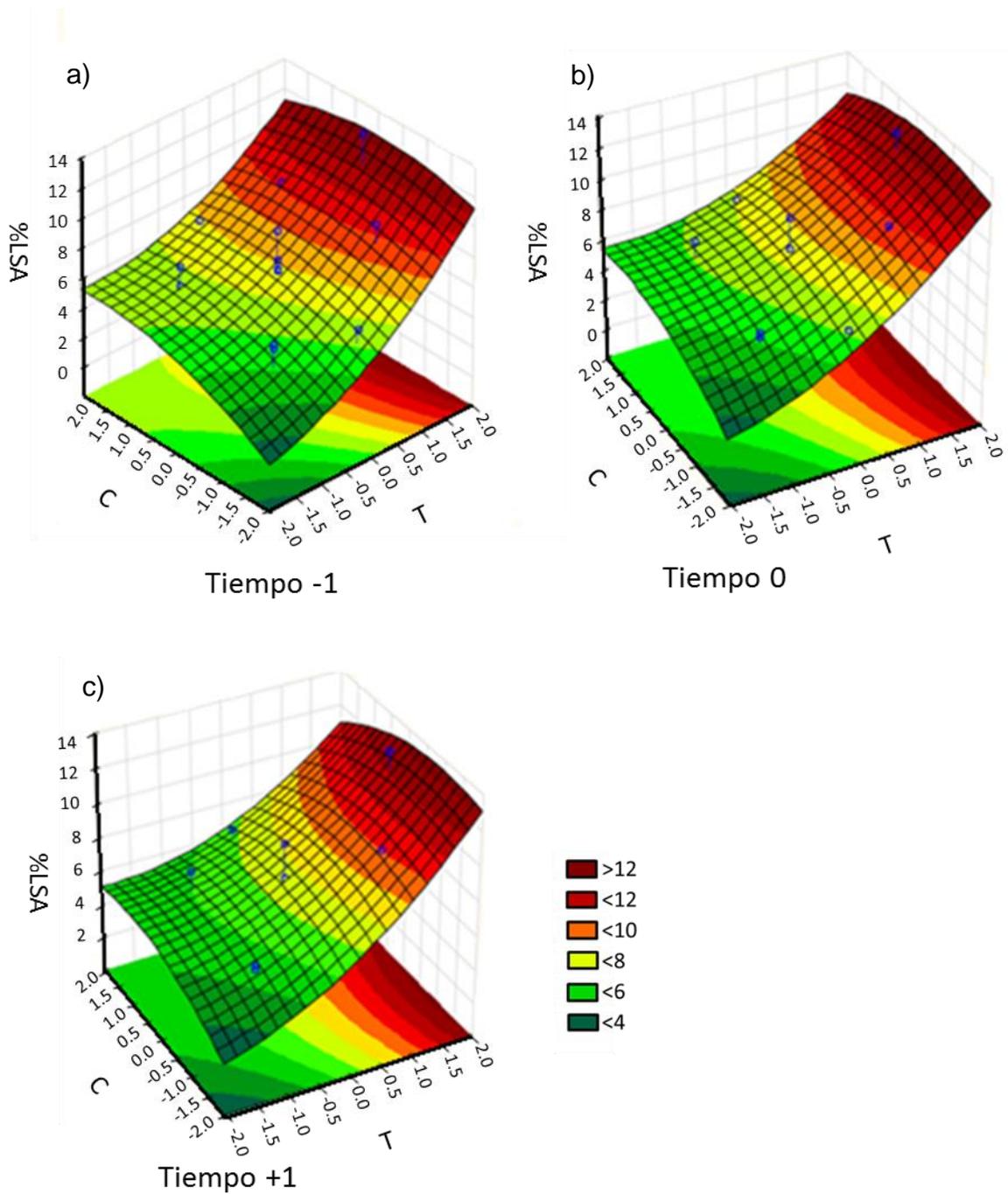


Figura 19. Superficies de respuesta para el porcentaje de lignina soluble en ácido (%LSA) removida por el pretratamiento en función de la temperatura (T) y concentración de ácido sulfúrico (C) para los tiempos en variables codificadas de a)-1, b) 0 y c)+1.

Además, se puede observar que el tiempo no es una variable que afecte de manera importante el rendimiento de %LSA, por lo que no se recomienda trabajar a tiempos largos (tiempos mayores a +1), mientras que en el caso de la concentración de ácido, el modelo nos predice que el aumento de esta variable (a concentraciones mayores a +1) no aumenta de manera significativa la remoción de lignina, por lo que se recomienda trabajar en un rango de -1 a 0. Con base en estos criterios se proponen las condiciones para remoción de lignina citadas en la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones de pretratamiento propuestas para la remoción de lignina.

Temperatura (T)	Concentración (C)	Tiempo (t)	T (°C)	C (p/p%)	t (min)	% LSA Calculado
0.00	0	0	120.0	1.2	60.0	7.45
1.00	-1	0	140.0	0.9	90.0	9.55
1.00	0	0	140.0	1.2	90.0	9.83
1.68	0	0	153.6	1.2	110.4	11.91

Analizando las condiciones propuestas, podemos afirmar que el aumento de la temperatura de 120 a 140°C y 120 a 154°C no representa un cambio significativo en el aumento de la remoción de lignina; ese mismo comportamiento muestra el aumento de la concentración de ácido. Con el análisis anterior se proponen como condiciones de pretratamiento para esta variable una temperatura de 120°C, concentración de ácido sulfúrico de 1.2% p/p y un tiempo de reacción de 60 minutos.

Azúcares Reductores (AR)

Para cuantificar el efecto del pretratamiento ácido diluido sobre la hidrólisis del pasto, se empleó el Método DNS para estimar la concentración de azúcares reductores en los licores pretratados, considerando que los azúcares presentes en el licor tienen el mismo poder reductor que la glucosa.

Llevando a cabo un análisis semejante del efecto del pretratamiento sobre la lignina soluble en ácido, se determinó que la temperatura es la única variable que

muestra una influencia significativa sobre la obtención de azúcares reductores (Tabla 16), aunque la temperatura tiene un comportamiento diferente sobre la obtención de azúcares reductores; se observa que al ir aumentando la temperatura se llega un punto máximo para la obtención de AR y a partir de este punto el rendimiento de AR comienza a disminuir. Esta disminución podría deberse a que las condiciones altas de temperatura y ácidas del medio provocan la oxidación de los azúcares a dos compuestos no deseados para la etapa siguiente de hidrólisis, el furfural proveniente principalmente de la degradación de las pentosas y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) proveniente de la degradación de las hexosas.

En la Figura 20, se muestran las superficies de respuesta predichas por el modelo para la obtención de AR en función de la temperatura y concentración, para diferentes tiempos (-1, 0 y +1), donde podemos visualizar nuevamente que el tiempo prácticamente no influye en la obtención de AR, por lo que no se recomienda trabajar a tiempos largos de reacción.

En el caso de la concentración de ácido, el modelo nos predice que a temperaturas bajas (de -1.68 a -1), la concentración influye en la obtención de AR, pero al aumentar la temperatura este efecto es eliminado, con estos criterios se recomienda trabajar a condiciones de temperatura entre 0 y 1; concentraciones de ácido entre -1 y 1; y tiempos cortos, de -1 a 0.

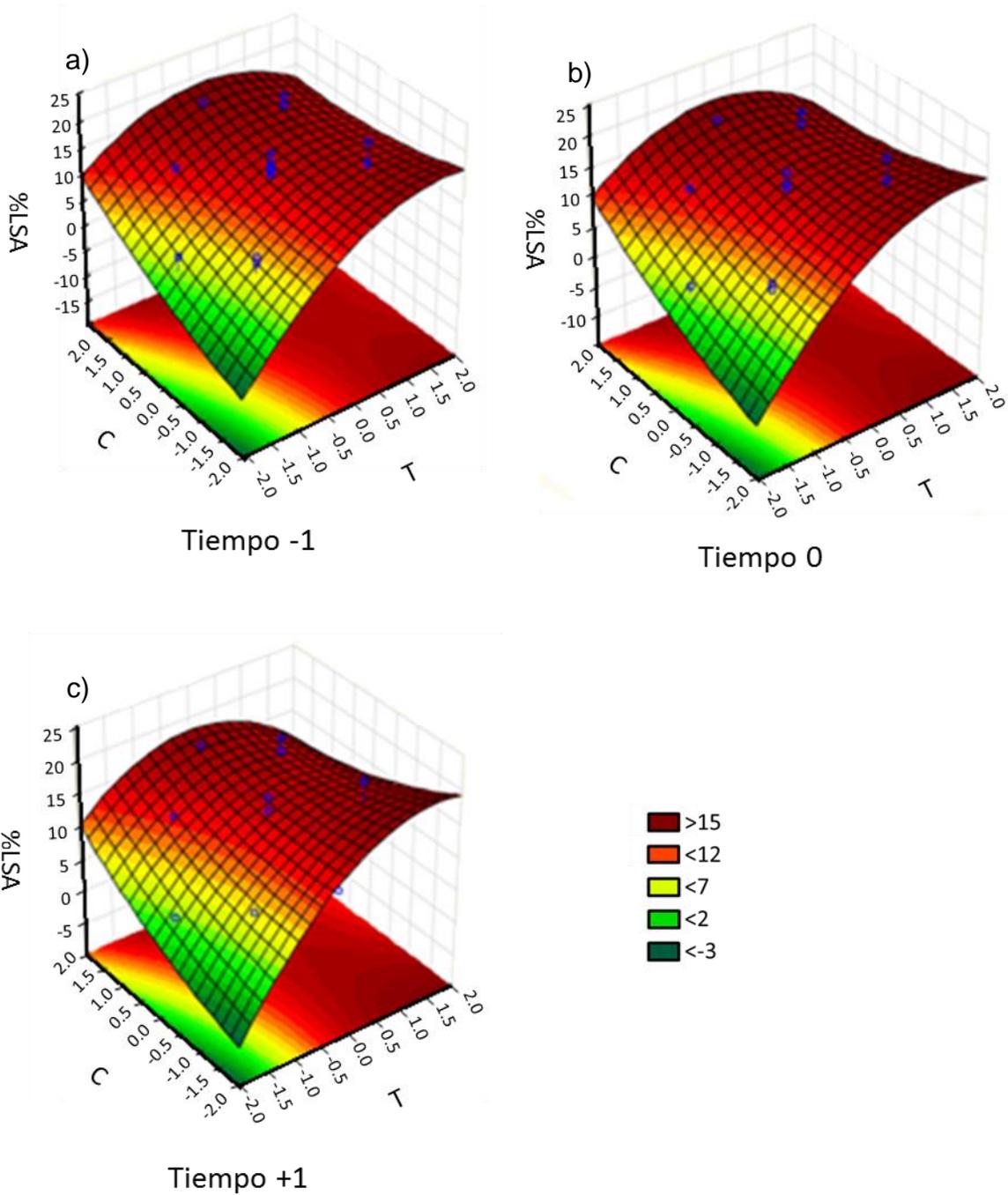


Figura 20. Superficies de respuesta para la obtención de azúcares reductores (AR) en función de la temperatura (T) y concentración de ácido sulfúrico (C) para los tiempos en variables codificadas de a) -1, b) 0 y c) +1.

Con base en las recomendaciones anteriores se proponen las condiciones mostradas en la Tabla 16 para la obtención de azúcares reductores (AR).

Tabla 16. Condiciones de pretratamiento propuestas para la obtención de AR.

Temperatura (T)	Concentración (C)	Tiempo (t)	T (°C)	C (p/p%)	t (min)	%AR (mg/mg biomasa) Calculado
0.00	0	0	120.0	1.2	60.0	14.12
1.00	-1	0	140.0	0.9	90.0	16.10
1.00	1	0	140.0	1.5	90.0	15.82
1.68	0	0	153.6	1.2	110.4	14.35

Analizando las condiciones propuestas, podemos afirmar que el aumento de la temperatura de 120 a 140°C y 120 a 154°C no representa un cambio significativo en el aumento de la obtención de AR a partir de las condiciones de pretratamiento centrales; y un comportamiento similar muestra el aumento de la concentración de ácido, con lo que se tomó la decisión de trabajar a una concentración cercana al punto central.

Con el análisis anterior se proponen como condiciones de pretratamiento para esta variable una temperatura de 120°C, concentración de ácido sulfúrico de 1.2% p/p y un tiempo de reacción de 60 minutos.

Azúcares Totales (AT)

Para la determinación de los azúcares totales se empleó el Método Fenol-Ácido Sulfúrico. Se sabe que los azúcares con grupos funcionales aldehídos y ceto libres se deshidratan formando derivados de furfural y HMF al reaccionar con ácido sulfúrico concentrado, posteriormente los derivados de furfural y HMF reaccionan con fenol formando complejos coloridos que pueden ser detectados a una longitud de onda de 490 nm. De igual forma, en esta técnica se considera que la presencia de color en la mezcla de reacción se debe solo a la formación de complejos derivados de HMF provenientes de la oxidación de glucosa.

En el caso de esta variable de respuesta, se determinó nuevamente que la temperatura es la única variable que tiene un efecto significativo (Tabla 24 del anexo) sobre la obtención de AT.

Con base en la Figura 21, donde se muestran las superficies de respuesta predichas por el modelo en función de la temperatura y concentración, para diferentes tiempos (-1, 0 y +1), se observa una clara tendencia alrededor de las condiciones centrales donde se obtiene el máximo rendimiento de AT. Por lo que se recomienda trabajar a temperaturas entre 0 y 1, concentraciones de ácido de alrededor del valor central y tiempos cortos, entre -1 y 0.

Con base en las recomendaciones anteriores se proponen las siguientes condiciones para la obtención de azúcares totales (AT):

Tabla 17. Condiciones de pretratamiento propuestas para la obtención de AT.

Temperatura (T)	Concentración (C)	Tiempo (t)	T (°C)	C (p/p%)	t (min)	AT Calculado
0.00	0	0	120.0	1.2	60.0	18.73
1.00	-1	0	140.0	0.9	90.0	19.73
1.00	0	0	140.0	1.2	90.0	20.05
1.68	0	0	153.6	1.2	110.4	18.02

Analizando las condiciones propuestas, podemos afirmar que el aumento de la temperatura de 120 a 140°C y 120 a 154°C no representa un cambio significativo en el aumento de la obtención de AT a partir de las condiciones de pretratamiento centrales; y un comportamiento similar muestra el aumento de la concentración de ácido, con lo que se toma la decisión de trabajar a una concentración cercana al punto central. Con el análisis anterior se proponen como condiciones de pretratamiento para esta variable una temperatura de 120 °C, concentración de ácido sulfúrico de 1.2% p/p y un tiempo de reacción de 60 minutos.

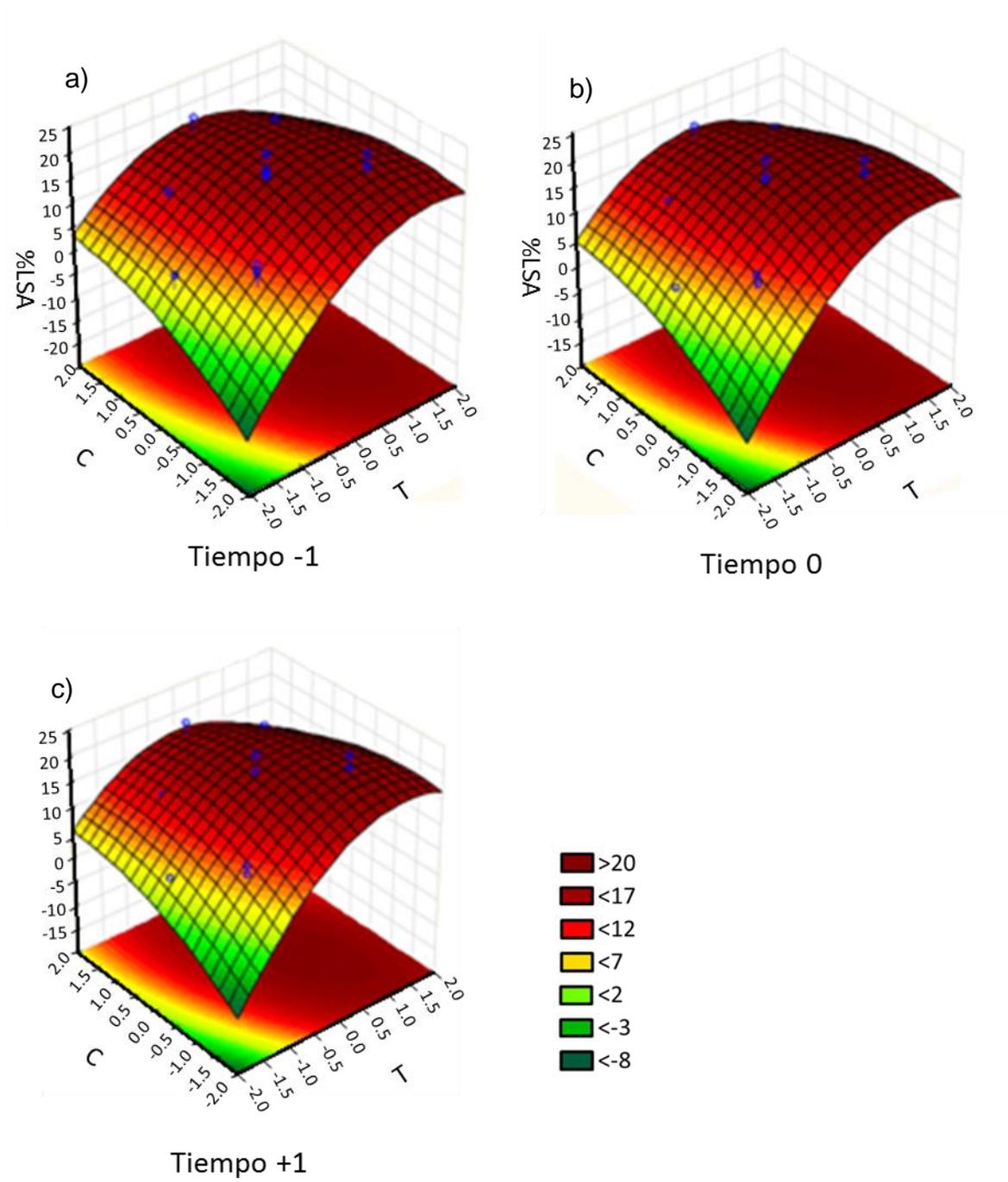


Figura 21. Superficies de respuesta para la obtención de azúcares totales (AT) en función de la temperatura (T) y concentración de ácido sulfúrico (C) para los tiempos en variables codificadas de a)-1, b) 0 y c)+1.

Con base en el análisis individual de las variables de respuesta, se encontró que las condiciones óptimas de pretratamiento son una temperatura de 120 °C, concentración de ácido de 1.2% p/p y tiempo de reacción de 60 minutos.

Efecto de los Pretratamientos

Pretratamientos Básicos

La segunda parte experimental consistió en elegir un pretratamiento adecuado para maximizar la obtención de azúcares susceptibles de ser fermentados para la producción de etanol. Se propusieron tres pretratamientos básicos, ya que se sabe que en general estos pretratamientos tienen efecto sobre la fracción lignina de los materiales lignocelulósicos, también se evaluó el efecto que estos pretratamientos básicos ejercen sobre el pretratamiento ácido diluido.

De igual forma se evaluó el efecto de los pretratamientos básicos, se cuantificaron los contenidos de AR, AT y %LSA en el licor pretratado, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Azúcares Reductores, Azúcares Totales y Lignina Soluble en Ácido presentes en el licor de los pretratamientos básicos.

Pretratamiento	%AR (mg AR/mg biomasa)	Desv. Estándar AR (±)	%AT (mg AT/mg biomasa)	Desv. Estándar AT (±)	% LSA
Básico con NaOH	0.95	0.02	14.82	0.64	21.18
Básico con CaO	0.48	0.01	5.90	0.33	11.39
Básico Oxidante	1.21	0.01	6.15	0.04	5.01

En general, los resultados muestran que los pretratamientos básicos no promueven la formación de azúcares reductores (Figura 22), pero sí la obtención de azúcares totales (Figura 23) y LSA (Figura 24), lo cual se debe a que estos pretratamientos sólo modifican la estructura, tanto física como químicamente, de la lignina y en menor grado las estructuras de hemicelulosa y celulosa.

En el caso del pretratamiento con NaOH, se observa que es muy efectivo sobre la fracción lignina, debido a que prácticamente solubiliza el contenido total de lignina en un 94.2%, físicamente se puede observar en la coloración rojiza que presenta el licor pretratado y en la consistencia pastosa de la biomasa pretratada que se obtuvo. Además, debido a la solubilización de la lignina, ésta permitió la liberación y solubilización de una parte de la fracción hemicelulósica, que se puede observar en un contenido significativo de AT en el licor pretratado (14.8%) y que podría afectar en el contenido de AR en la etapa siguiente de pretratamiento ácido diluido, debido a la disminución de los azúcares hidrolizados provenientes de la fracción de hemicelulosa.

Por otro lado, el pretratamiento básico con CaO también podría considerarse un pretratamiento efectivo sobre la fracción lignina ya que elimina el 50.6% del contenido total, mientras tanto el contenido de AT en licor pretratado nos muestra que existe una estrecha relación entre esta y el contenido de lignina, a mayor cantidad de lignina solubilizada obtendremos mayor cantidad de AT en licor. Este pretratamiento podría ofrecer altos rendimientos de AR en las etapas siguientes (pretratamiento ácido diluido e hidrólisis enzimática) debido a la eliminación de una cantidad significativa de lignina y el aumento del área superficial de las fracciones de hemicelulosa y celulosa para la hidrólisis de la biomasa.

Por último, el pretratamiento básico oxidante no es un pretratamiento tan efectivo sobre la fracción de lignina como los pretratamientos anteriores, ya que sólo solubiliza el 22.3% del contenido total, pero a pesar de esto se tiene un contenido de AT comparable con el básico con CaO. Según la literatura este pretratamiento es muy efectivo para la solubilización de lignina (mayor al 50% del contenido total) debido a la producción de radicales como HO^- y O^{2-} que se encargan de la degradación de la lignina. Aunque para este material lignocelulósico no lo fue, esto podría deberse a la pérdida de contacto entre la biomasa y el peróxido durante la reacción debido a la formación de burbujas en la mezcla de reacción por la descomposición del peróxido de hidrógeno.

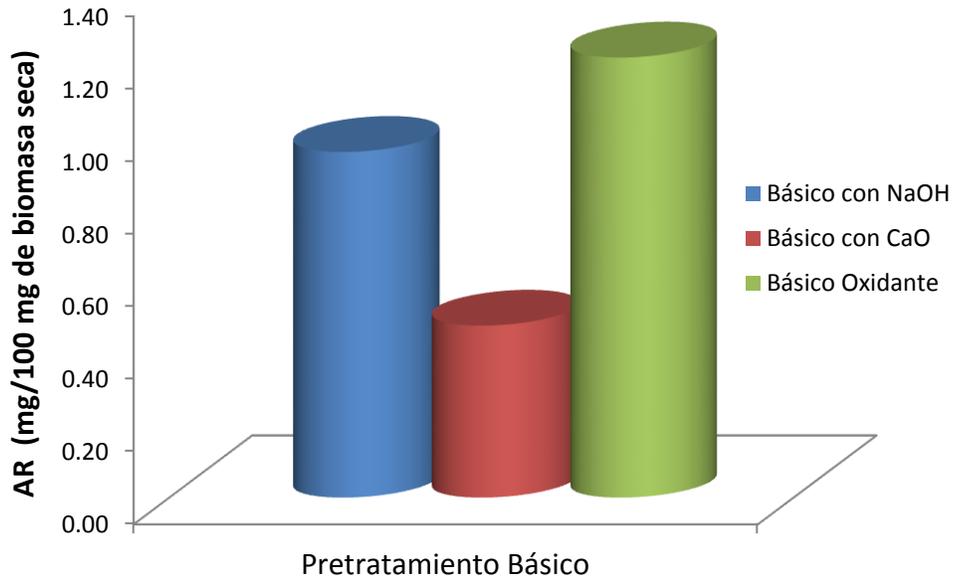


Figura 22. Azúcares Reductores obtenidos en los diferentes pretratamientos básicos del pasto

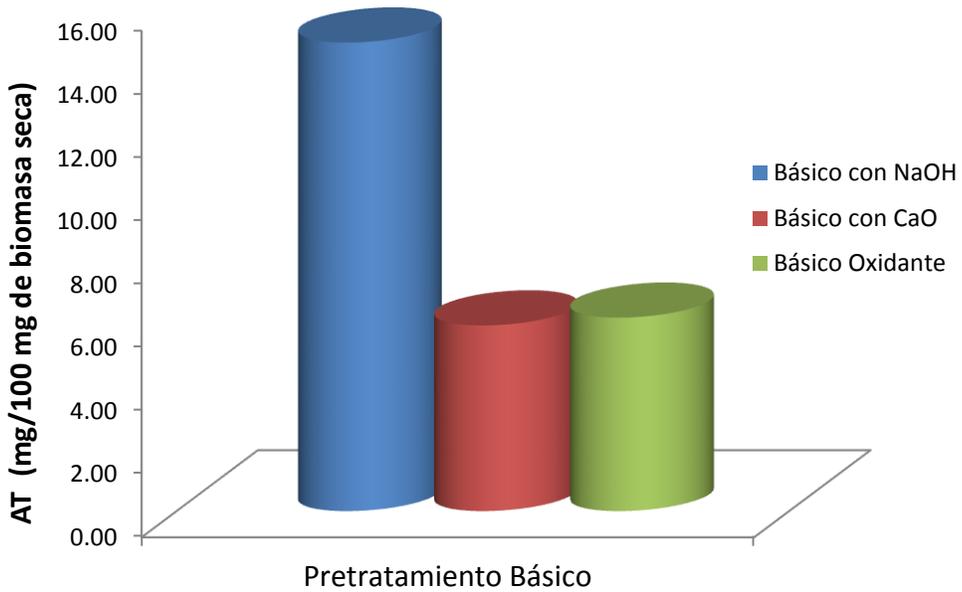


Figura 23. Azúcares Totales obtenidos en los diferentes pretratamientos básicos del pasto

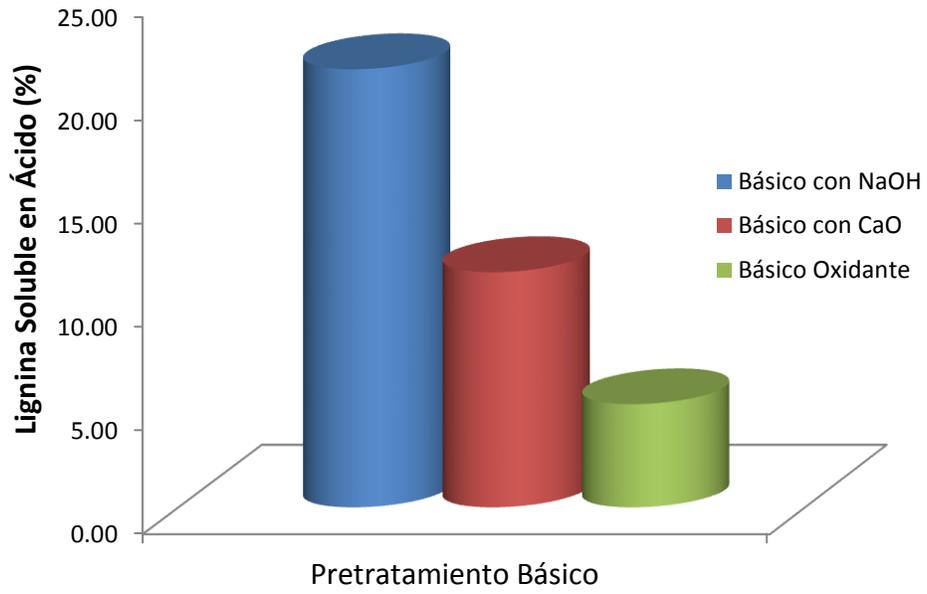


Figura 24. Lignina Soluble en Ácido obtenida en los diferentes pretratamientos básicos del pasto

Pretratamiento Ácido Diluido

Ahora, a cada biomasa que sufrió un pretratamiento básico fue sometida posteriormente al pretratamiento ácido diluido, con el fin de determinar el efecto que estos causan sobre los rendimientos de AR y AT principalmente, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Balance de azúcares Reductores, Azúcares Totales y Lignina Soluble en Ácido obtenidos en la combinación de pretratamiento básicos y ácido diluido.

Pretratamiento	%AR (mg AR/ mg biomasa)	Desv. Estándar AR	%AT (mg AT/ mg biomasa)	Desv. Estándar AT	% LSA
Ácido Diluido	13.69	0.78	17.98	0.44	7.05
Básico con NaOH + Ácido Dil.	13.01	1.22	16.12	0.23	1.86
Básico con CaO + Ácido Dil.	26.14	0.14	26.05	0.40	3.46
Básico Oxidante + Ácido Dil.	16.12	0.41	22.04	0.39	7.38

En general, podemos afirmar que los pretratamientos básicos mejoran los rendimientos de AR (Figura 25) y AT (Figura 26) obtenidos después de la aplicación del pretratamiento ácido diluido, esto se debe al aumento en la disponibilidad de las fibras de hemicelulosa y celulosa, generado por la solubilización de la lignina durante los pretratamientos básicos.

Entonces, durante el pretratamiento ácido diluido, la disminución del contenido de lignina de la biomasa (Figura 27) mejora la hidrólisis ácida de la hemicelulosa y en menor fracción de celulosa, aumentando los rendimientos de AR y AT. Aunque en el caso del pretratamiento ácido proveniente del pretratamiento básico con NaOH parece no haber una diferencia con respecto al pretratamiento ácido diluido solo. Como se observó, la aplicación de este pretratamiento básico solubiliza una cantidad considerable de AT, por lo cual disminuye los rendimientos de AR del pretratamiento ácido. Por otro lado, tenemos que después del pretratamiento ácido, en comparación con los otros pretratamientos se solubilizó la menor cantidad de lignina, lo cual se debe a la gran efectividad del pretratamiento básico

anterior; la combinación de estos pretratamientos (básico con NaOH y ácido diluido) elimina el contenido total de lignina del Pasto Privilegio.

En el caso del pretratamiento ácido proveniente del pretratamiento básico con CaO, muestra la mayor obtención de AR y AT de todos los pretratamientos; mejorando en un 100% el rendimiento de AR y en casi el 50% el rendimiento de AT obtenidos después de la aplicación del pretratamiento ácido diluido solo. Otro punto muy importante que se obtiene con la combinación de estos pretratamientos es un Grado de Polimerización, $GP = 1$, lo cual nos indica que la hidrólisis ácida de los polisacáridos ha sido muy efectiva, es decir, los polisacáridos (hemicelulosa y/o celulosa) han sido hidrolizados hasta monómeros simples, como por ejemplo glucosa y xilosa, principalmente. Con respecto a la fracción lignina después de la aplicación del pretratamiento básico más ácido, ha disminuido la solubilización de lignina en un 51% a lo obtenido solo con la aplicación del pretratamiento ácido, esto se debe a la recalcitrancia de la lignina restante al ataque del ácido sulfúrico.

Por último, el pretratamiento ácido proveniente del pretratamiento básico oxidante mejora solo un poco la obtención de AR y AT (18% y 23% respectivamente) en comparación a lo obtenido solo con el pretratamiento ácido, esta pequeña mejora está asociada a una mayor solubilización de lignina acumulada (12.39%).

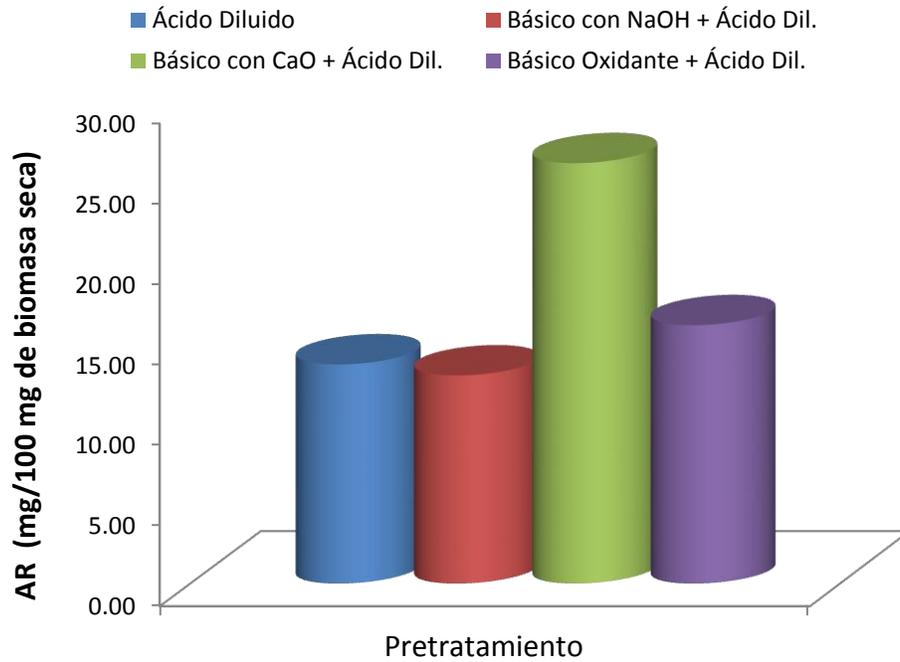


Figura 25. Azúcares Reductores obtenidos en la combinación de pretratamiento básicos y ácido diluido del pasto.

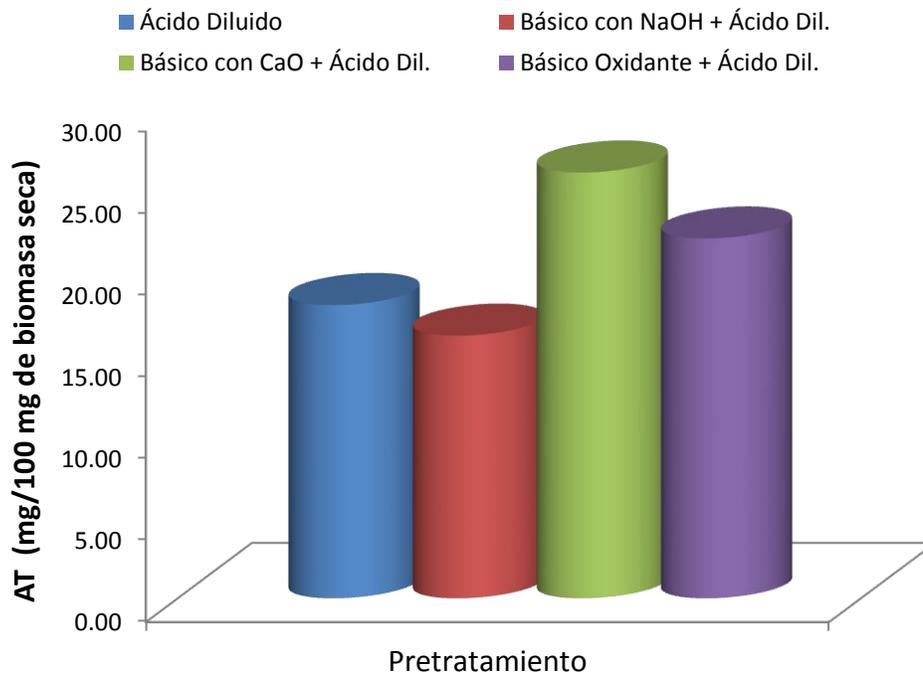


Figura 26. Azúcares Totales obtenidos en la combinación de pretratamiento básicos y ácido diluido del pasto.

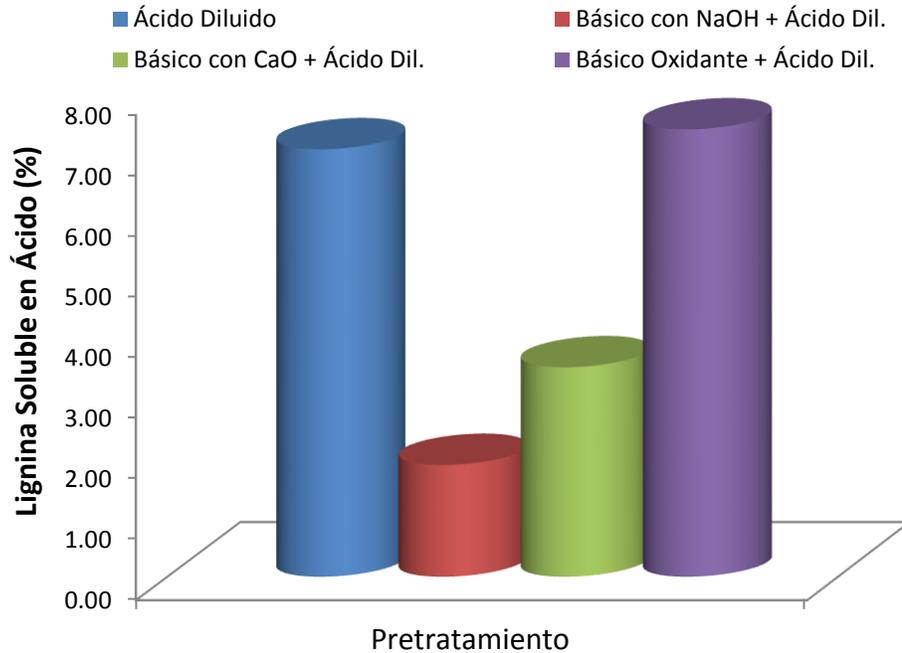


Figura 27. Lignina Soluble en Ácido obtenida en la combinación de pretratamientos básicos y ácido diluido del pasto.

Realizando un balance de AR, AT (Figura 28) y %LSA (Figura 29) obtenidos durante la aplicación de los pretratamientos básicos y ácido diluido, como habíamos visto anteriormente, en general todos los pretratamientos básicos mejoran los rendimientos de AR y AT. Podemos afirmar que el mejor pretratamiento que aumenta la obtención de azúcares susceptibles a ser fermentados (AR) es el pretratamiento básico con CaO seguido del pretratamiento ácido diluido, además de ser el pretratamiento que ofrece un GP cercano a uno (1.20), lo cual nos habla de la efectividad del pretratamiento ácido para hidrolizar casi completamente el polisacárido de hemicelulosa y una fracción del polisacárido de celulosa.

Por otro lado, el pretratamiento básico con NaOH seguido del pretratamiento ácido diluido ofrece rendimientos similares de AT obtenidos con los pretratamientos básico y ácido mencionados anteriormente, pero con un rendimiento pobre de AR debido a la solubilización de una fracción importante de polisacáridos durante el pretratamiento básico. Una alternativa para aumentar el rendimiento de AR sería

la aplicación de una etapa adicional de hidrólisis ácida de los polisacáridos presentes en el licor del pretratamiento básico con NaOH, aunque esta alternativa podría no ser factible a una escala mayor de operación. De igual forma, el pretratamiento básico oxidante seguido del pretratamiento ácido diluido presenta resultados similares, rendimientos altos de AT pero no así de AR, además de presentar el menor porcentaje de lignina solubilizada, por lo cual podríamos afirmar que este pretratamiento no es conveniente para tratar de aumentar la obtención de azúcares fermentables provenientes del Pasto Privilegio.

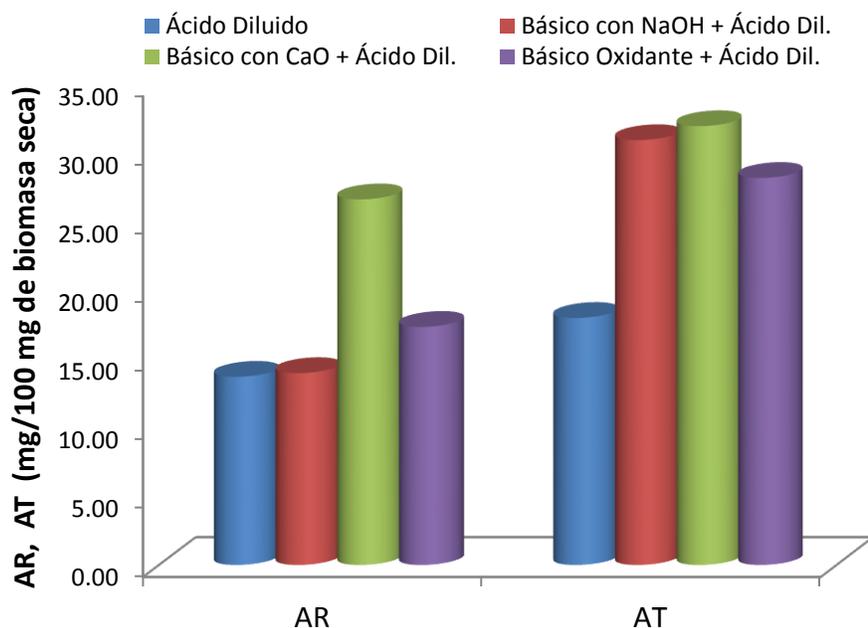


Figura 28. Balance de Azúcares Reductores y Totales obtenidos después de la aplicación de los pretratamientos básicos y ácido en el pasto Privilegio.

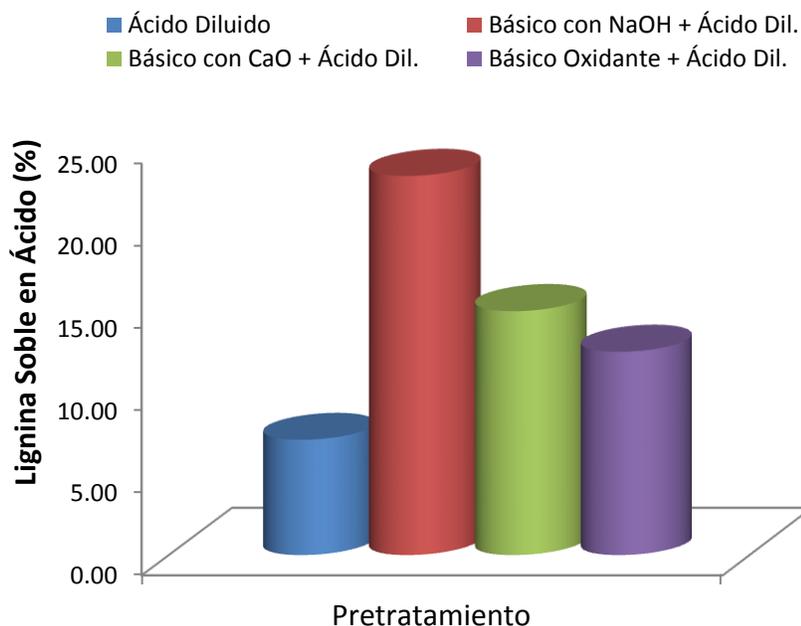


Figura 29. Lignina Soluble en Ácido total eliminada después de la aplicación de los pretratamientos básicos y ácido del pasto Privilegio.

Hidrólisis enzimática

La tercera parte experimental consistió en llevar a cabo la hidrólisis enzimática de las biomásas provenientes del tren de pretratamientos básico-ácido, del pretratamiento ácido diluido y del material sin pretratar, utilizando dos complejos enzimáticos comerciales, E-6 y E-7. Para determinar la eficiencia de la hidrólisis enzimática se cuantificó el contenido de AR y AT, además de identificar y cuantificar los azúcares obtenidos por HPLC, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados de la sacarificación enzimática del material lignocelulósico sin pretratar y pretratado.

Pretratamiento	CE	%AR (mg/100mg biomasa)	Desv. Estándar AR	%AT (mg/100mg biomasa)	Desv. Estándar AT
Sin Pretratar	E6	5.66	0.18	5.72	0.50
	E7	6.70	0.49	8.51	0.30
Ácido Diluido	E6	4.92	0.01	5.04	0.01
	E7	5.28	0.23	7.02	3.09
Básico con NaOH + Ácido Dil	E6	12.21	0.35	12.82	1.23
	E7	8.64	0.14	12.18	1.47
Básico con CaO + Ácido Dil	E6	8.98	0.72	15.05	3.78
	E7	11.31	0.18	16.39	0.93
Básico Oxidante + Ácido Dil	E6	7.62	0.78	30.66	4.05
	E7	6.98	0.95	27.70	2.92

CE: Complejo Enzimático

La hidrólisis enzimática en la actualidad es la etapa limitante para la obtención de azúcares susceptibles a ser fermentados para la producción de bioetanol lignocelulósico. Esto se debe a la baja especificidad de las enzimas disponibles sobre la biomasa lignocelulósica, lo cual puede solucionarse de alguna forma con el empleo de altas dosis de enzima, lo que conlleva incrementos significativos de costos de producción. Como se mostró anteriormente, los pretratamientos son una solución eficiente para mejorar esta etapa. En el presente caso de estudio, los resultados muestran que en general los pretratamientos mejoran la producción de AR y AT (Figura 30 y Figura 31).

En el caso del pretratamiento ácido diluido, este no ejerce un efecto positivo en la obtención de AR y AT durante la hidrólisis enzimática, esto podría deberse a la desactivación de las enzimas por la presencia de compuestos tóxicos, derivados de la descomposición de los azúcares y/o compuestos fenólicos provenientes de la solubilización de la lignina.

Por otro lado, la combinación de pretratamientos básico-ácido ofrece mayores rendimientos de AR y AT sin importar el complejo enzimático empleado, además

los resultados muestran que la eficiencia de las enzimas para la producción de AR depende de los pretratamientos empleados.

Aunque el pretratamiento con NaOH más ácido fue muy efectivo en la eliminación de lignina, presenta la menor obtención de AT, esto puede deberse a la ineffectividad de éste para disminuir las zonas cristalinas de la celulosa lo cual impide la accesibilidad de las enzimas hacia el sustrato. Asimismo, el complejo E-6 ofrece mayores rendimientos de AR que el complejo E-7, lo cual se debe a la mayor actividad de β -glucosidasas para la producción de glucosa.

Siguiendo con el pretratamiento con CaO más ácido, éste presenta mayores rendimientos de AT que el anterior, pero menores rendimientos de AR y un grado de polimerización mucho mayor a uno, lo cual nos habla de una hidrólisis incompleta. Por último, el pretratamiento básico oxidante más ácido, presenta los rendimientos más altos de AT pero no de AR. La mayor producción de AT obtenidos después de la hidrólisis enzimática se debe principalmente a la actividad de las enzimas endocelulasas que generan cadenas de polisacáridos de menor longitud de celulosa. Mientras los bajos rendimientos de AR se deben a la baja actividad enzimática principalmente de exocelulasas para la obtención de celobiosa que da origen a la obtención de glucosa por actividad de β -glucosidasas. Una solución para aumentar los rendimientos de AR sería el aumento del tiempo de reacción que compensaría la baja actividad de las exocelulasas y β -glucosidasas.

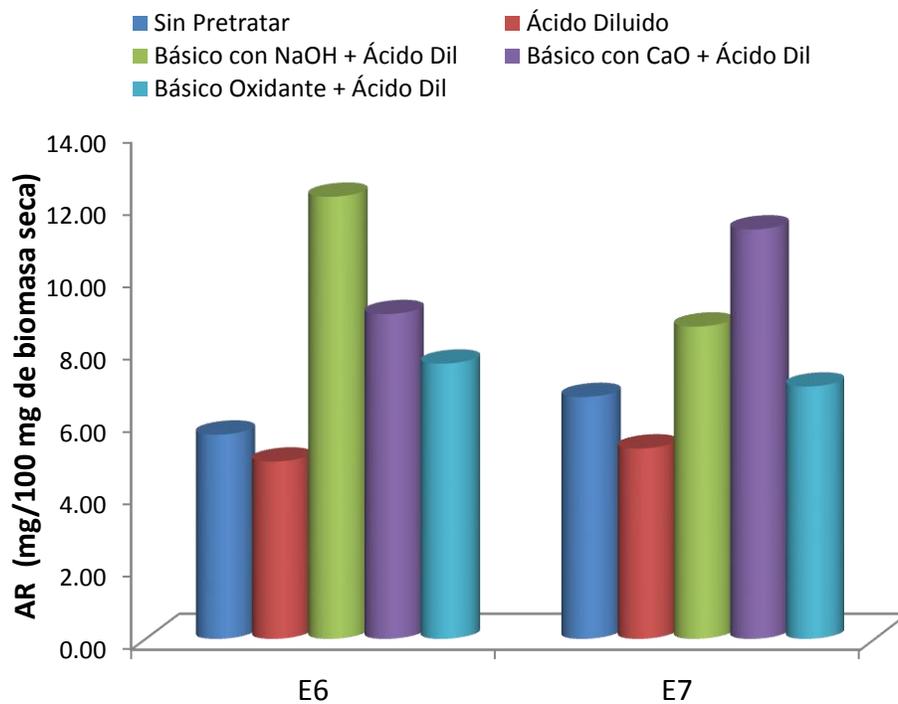


Figura 30. Azúcares Reductores obtenidos en la etapa de hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado.

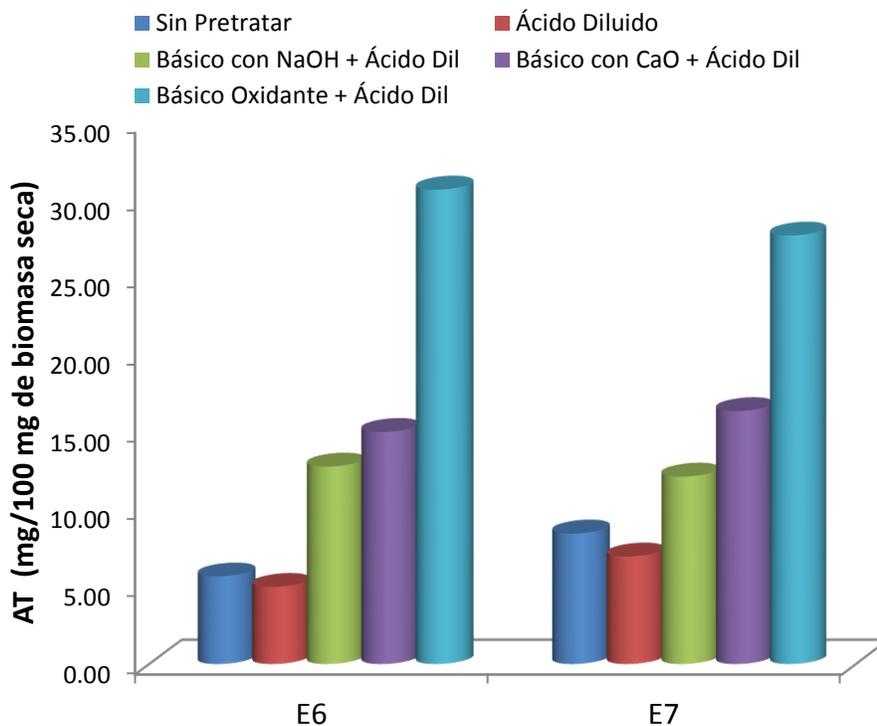


Figura 31. Azúcares Totales obtenidos en la etapa de hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado.

Además de la cuantificación de AR y AT, se llevó a cabo la cuantificación e identificación de los azúcares por HPLC obtenidos después de la etapa de hidrólisis enzimática, los monosacáridos encontrados fueron glucosa, manosa y xilosa mientras como disacáridos se encontraron celobiosa y maltosa. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 21. Azúcares identificados por HPLC en la etapa de hidrólisis.

Pretratamiento	CE	% Azúcares (mg/100mg biomasa seca)				
		Xilosa	Manosa	Glucosa	Maltosa	Celobiosa
Sin Pretratar	E-6	-	0.76	1.93	0.51	1.92
	E-7	-	2.48	0.69	-	4.92
Ácido Dil.	E-6	0.31	2.96	0.34	-	1.35
	E-7	0.35	5.32	-	1.94	1.11
Básico con NaOH + Ácido Dil.	E-6	2.33	2.68	0.61	-	6.30
	E-7	0.58	2.53	1.03	-	6.57
Básico con CaO + Ácido Dil.	E-6	1.20	-	6.45	-	-
	E-7	0.91	1.84	6.18	3.21	2.61
Básico Oxidante + Ácido Dil.	E-6	1.47	3.74	6.33	13.34	7.88
	E-7	1.42	3.21	9.72	6.30	4.87

La efectividad de la hidrólisis enzimática recae en la producción de monosacáridos principalmente de glucosa, aunque la presencia de hemicelulosa nos proporciona otros monosacáridos como xilosa y manosa. Por otro lado, la presencia de concentraciones altas de disacáridos como maltosa y celobiosa nos habla de una hidrólisis incompleta, lo cual puede observarse principalmente en los pretratamientos con NaOH más ácido y básico oxidante más ácido, con concentraciones de celobiosa mayores de 4 mg/100mg biomasa seca. La hidrólisis incompleta como anteriormente habíamos discutido podría deberse a la baja actividad de las enzimas β -glucosidasas para degradar celobiosa en glucosa.

En la biomasa proveniente de los pretratamientos ácido diluido y básico con NaOH más ácido, la presencia de xilosa y manosa nos sugiere que la hidrólisis se dio principalmente sobre la estructura de hemicelulosa lo cual justifica la baja obtención de AT y por lo tanto de AR, debido a la baja especificidad de las enzimas sobre la hemicelulosa, la cual no es su sustrato natural.

La biomasa pretratada con CaO más ácido, nos proporciona los rendimientos más altos de glucosa, 84 y 42% del total de azúcares obtenidos con los complejos E-6 y E-7, respectivamente. Además, el empleo del complejo E-6 proporciona una hidrólisis completa, ya que no se detectaron concentraciones de los disacáridos estudiados.

Para terminar, se realizó un balance total de AR y AT (Figura 32 y Figura 33) obtenidos durante las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática. Se encontró que los pretratamientos mejoran la obtención de AR y AT durante la etapa de hidrólisis enzimática, pero la mayor obtención de éstos se da durante las etapas de pretratamiento, en particular, el pretratamiento básico con CaO más ácido diluido nos ofrece altos rendimientos de AR y AT con más del 59% y 61% del contenido total de azúcares, respectivamente.

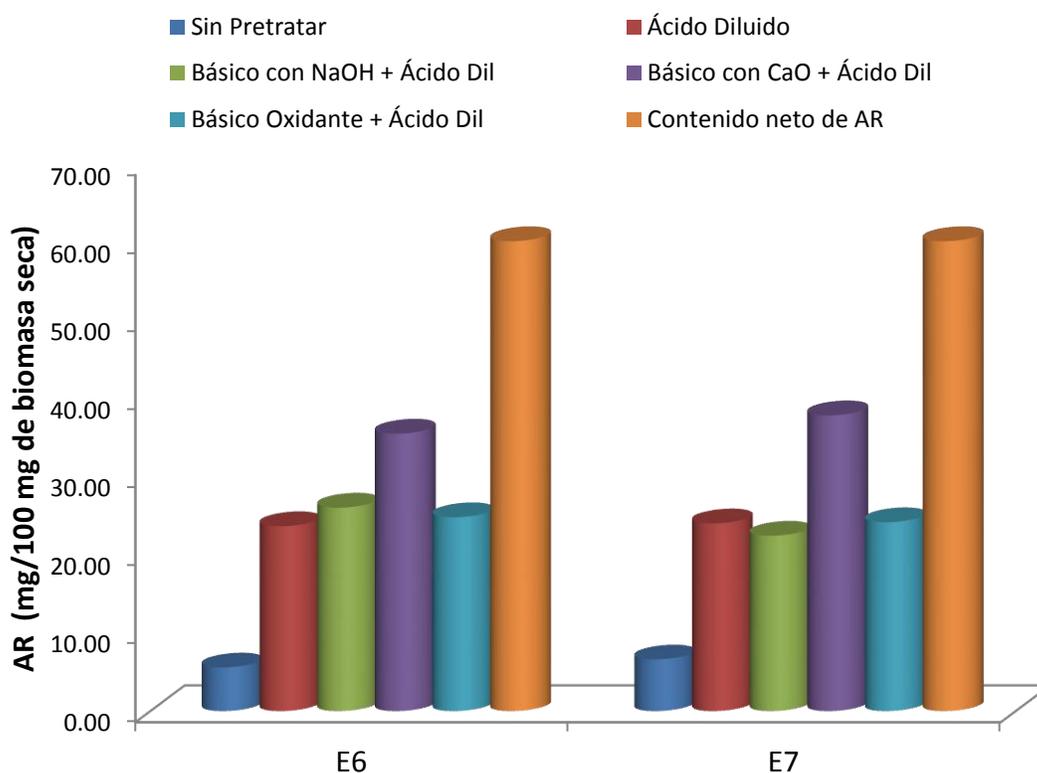


Figura 32. Comparación de los Azúcares Reductores netos obtenidos con los diferentes pretratamientos e hidrólisis enzimática para los dos complejos enzimáticos empleados (E6 y E7) del pasto Privilegio.

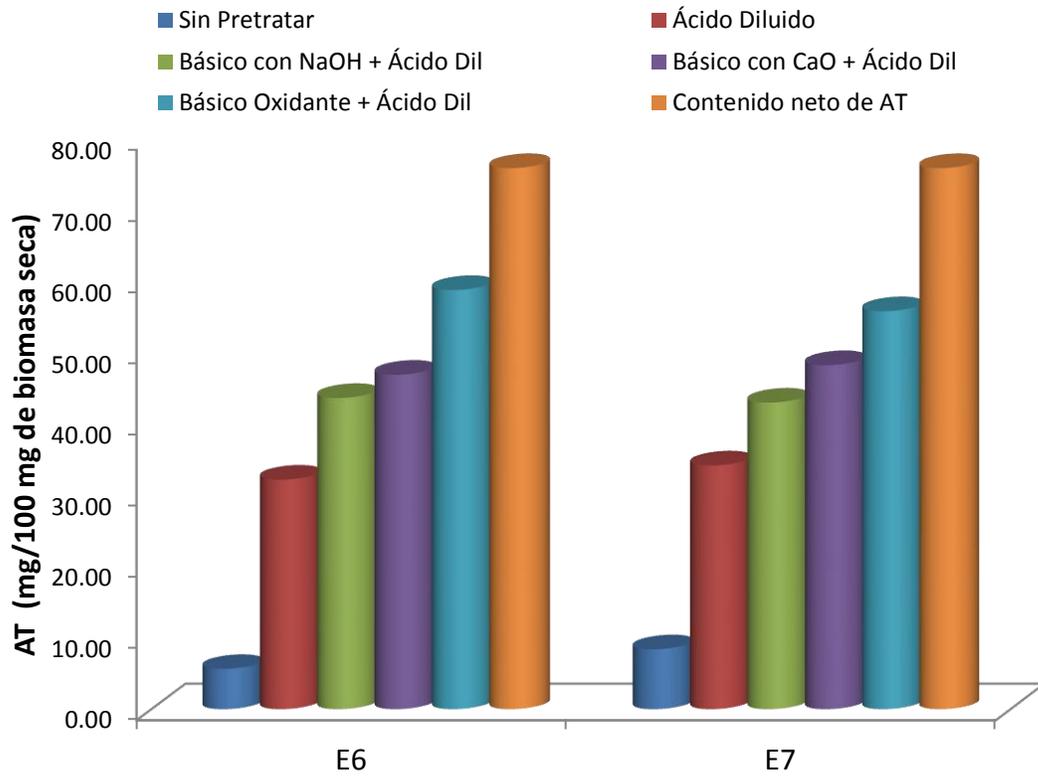


Figura 33. Comparación de los Azúcares Totales netos obtenidos con los diferentes pretratamientos e hidrólisis enzimática para los dos complejos enzimáticos empleados (E6 y E7) del pasto Privilegio.

Conclusiones

El análisis de ANOVA nos permitió identificar cuáles de las variables independientes propuestas para el pretratamiento ácido diluido ejercen alguna influencia sobre las variables de respuesta elegidas, encontrando que la temperatura es la única variable que ejerce cambios significativos sobre estas; aunque se debe resaltar que para cada variable de respuesta la temperatura exhibe comportamientos diferentes sobre estas; para el caso de remoción de lignina el aumento de temperatura favorece la solubilización de esta, mientras para el caso de AR y AT a temperaturas bajas y altas no favorecen la obtención de estos. Por otro lado el análisis de varianza, demuestra que no existen combinaciones entre las variables independientes (temperatura, concentración y tiempo) que ejerzan efectos significativos sobre cada una de las variables de respuesta.

Se establecieron como condiciones óptimas de pretratamiento los valores centrales para temperatura, concentración de ácido sulfúrico y tiempo de reacción (120°C, 1.2%p/v ácido sulfúrico y 60 min respectivamente) principalmente para favorecer la obtención de azúcares reductores.

Para los pretratamientos básicos realizados resultaron efectivos en la remoción de lignina; lo cual mejoro los rendimientos de AR y AT después del pretratamiento ácido diluido debido a la disponibilidad de las fibras de hemicelulosa y celulosa.

El tren de pretratamiento básico con CaO más ácido diluido presentó los mejores rendimientos de AR y AT, mejorando en un 100% el rendimiento de AR y en casi el 50% el rendimiento de AT obtenidos solo con la aplicación del pretratamiento ácido diluido.

En general los pretratamientos mejoran los rendimientos de AR y AT después de la etapa de hidrólisis comparados con el rendimiento de la biomasa sin pretratar

El análisis de azúcares por HPLC mostró que el pretratamiento con CaO más ácido se lleva a cabo una hidrólisis casi completa al no detectarse concentraciones de los disacáridos estudiados.

Realizando un balance de los AR y AT netos obtenidos con el tren de pretratamiento básico con CaO más ácido diluido y la etapa de hidrólisis enzimática se puede considerar al Pasto Privilegio como una fuente de biomasa lignocelulósica renovable para la producción de azúcares susceptibles a ser fermentados para la obtención de bioetanol.

Bibliografía

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. & Negro, M., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, p. 4851–4861.

Guzmán Barrera, N. I., 2012. Pretratamiento de Bagazo de Gramíneas para el incremento de Azúcares Reductores Fermentables a Etanol., s.l.: Tesis para obtener el título de Química en Alimentos, UNAM, Facultad de Química..

Kumar, S. G. L. Y. Y. G. R. B., 2010. Cellulose pretreatment in subcritical water: Effect of temperature. *Bioresource technology*, Volumen 101, p. 1337 – 1347.

P. Redding, A., Wang, Z., R. Keshwani, D. & J. Jay, C., 2011. High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, Volumen 102, p. 1415–1424.

Raveendran, S. y otros, 2011. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol producción. *Bioresource Technology*, Volumen 102, p. 10915–10921.

Run Cang Sun, J.M. Fang & J. Tomkinson, 2000. Delignification of rye straw using hydrogen peroxide. *Industrial Crops and Products*, Volumen 12, pp. 71-83.

SAGARPA, 2010. Bases técnicas para el fomento a la producción de biocombustibles en el país a partir de caña de azúcar. Etapa 1º. Simulación del sistema productivo y su exploración financiera. [En línea]

SENER, Bioenergéticos, 2012. Secretaria de Energía. [En línea]

Available at: <http://www.renovables.gob.mx>.

[Último acceso: 19 Noviembre 2012].

SENER, Planeación Energética, 2012. Secretaria de Energía. [En línea]

Available at: <http://www.sener.gob.mx>

[Último acceso: 19 Noviembre 2012].

SENER, S. d. E., 2010. Recomendaciones de especificaciones técnicas para el etanol y sus mezclas (E6) y la infraestructura para su manejo en México, México, D.F.: s.n.

Vázquez Bolaños, T. R., 2012. Evaluación de la Hidrólisis Enzimática de Bagazo de Sorgo para la obtención de Azúcares Fermentables a Etanol y efecto de diferentes pretratamientos., s.l.: Tesis para obtener el título de Química en Alimentos, UNAM, Facultad de Química.

Xu, J., Wang, Z. & Jay J., C., 2011. Bermuda grass as feedstock for biofuel production: A review. *Bioresource Technology*, Volumen 102, p. 7613–7620.

Ziyu, W., R. Keshwani, D. & P. Reddi, A., 2011. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresource Technology*, Volumen 101, p. 3583–3585.

Análisis de Varianza del Diseño Experimental

Tabla 22. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable de respuesta lignina soluble en ácido.

Factor	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada	P
T (°C)	53.98	1	53.98	38.1600	0.0002
T ² (°C)	2.18	1	2.18	1.5424	0.2456
C (%p/p)	0.84	1	0.84	0.5933	0.4609
C ² (%p/p)	1.16	1	1.16	0.8232	0.3879
t (min)	2.31	1	2.31	1.6312	0.2335
t ² (min)	0.70	1	0.70	0.4948	0.4996
T x C	0.51	1	0.51	0.3620	0.5622
T x t	0.00	1	0.00	0.0001	0.9934
C x t	0.53	1	0.53	0.3728	0.5566
Error	12.73	9	1.41		
Total SS	75.62	18			
R	0.9119				
R ²	0.8316				

Tabla 23. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable de respuesta AR.

Factor	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada	P
T (°C)	143.80	1	143.80	20.9971	0.0013
T ² (°C)	46.84	1	46.84	6.8392	0.0280
C (%p/p)	21.44	1	21.44	3.1310	0.1106
C ² (%p/p)	2.72	1	2.72	0.3976	0.5440
t (min)	9.82	1	9.82	1.4344	0.2616
t ² (min)	0.21	1	0.21	0.0304	0.8655
T x C	15.54	1	15.54	2.2697	0.1662
T x t	0.53	1	0.53	0.0768	0.7879
C x t	2.07	1	2.07	0.3021	0.5960
Error	61.64	9	6.85		
Total SS	308.94	18			
R	0.8947				
R ²	0.8005				

Tabla 24. Análisis de Varianza (ANOVA) para la variable de respuesta AT.

Factor	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F calculada	P
T (°C)	204.43	1	204.43	30.5573	0.0004
T ² (°C)	89.02	1	89.02	13.3058	0.0053
C (%p/p)	10.00	1	10.00	1.4953	0.2524
C ² (%p/p)	11.99	1	11.99	1.7917	0.2135
t (min)	7.93	1	7.93	1.1858	0.3045
t ² (min)	4.86	1	4.86	0.7272	0.4159
T x C	17.44	1	17.44	2.6075	0.1408
T x t	1.85	1	1.85	0.2759	0.6121
C x t	0.74	1	0.74	0.1106	0.7471
Error	60.21	9	6.69		
Total SS	396.35	18			
R	0.9209				
R ²	0.8481				

Curvas de Calibración para la determinación de AR y AT

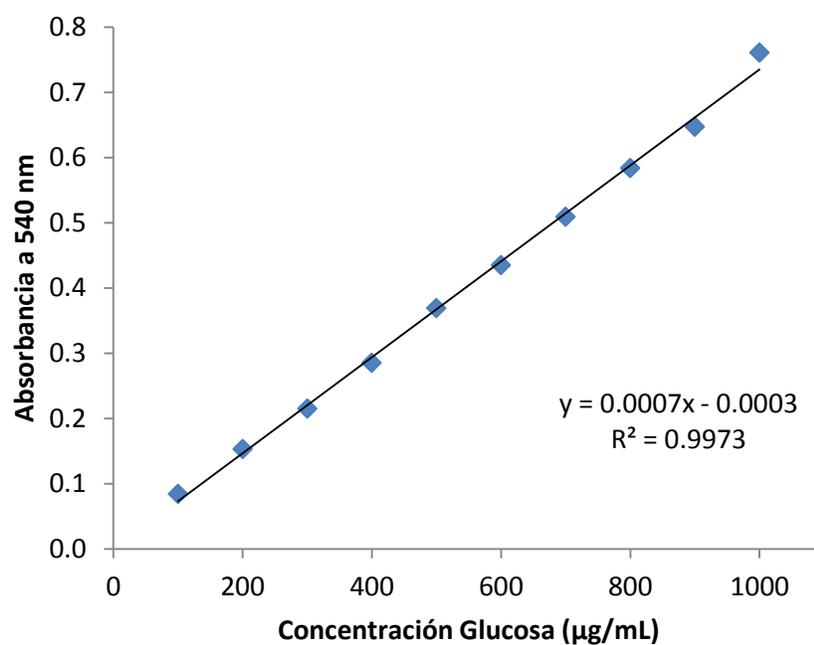


Figura 34. Curva patrón DNS para la determinación de AR

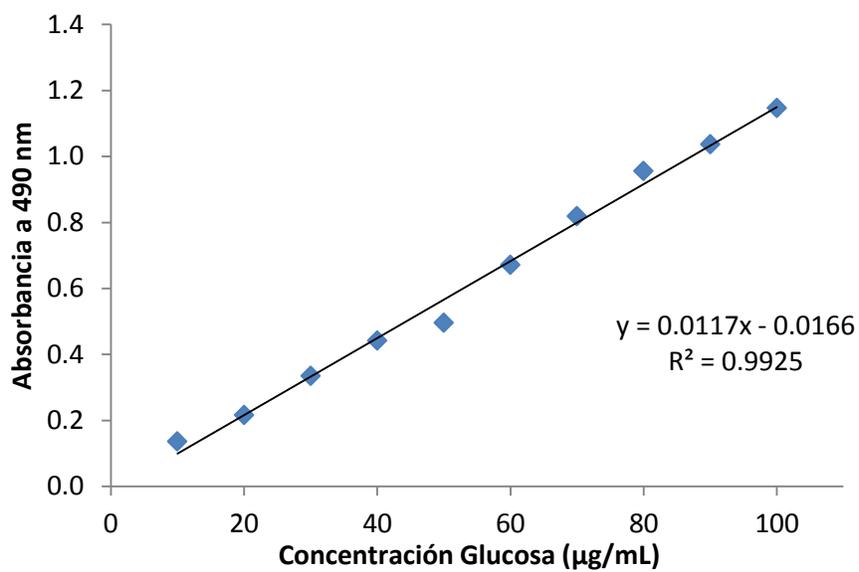


Figura 35. Curva patrón Fenol-Sulfúrico para la determinación de AT

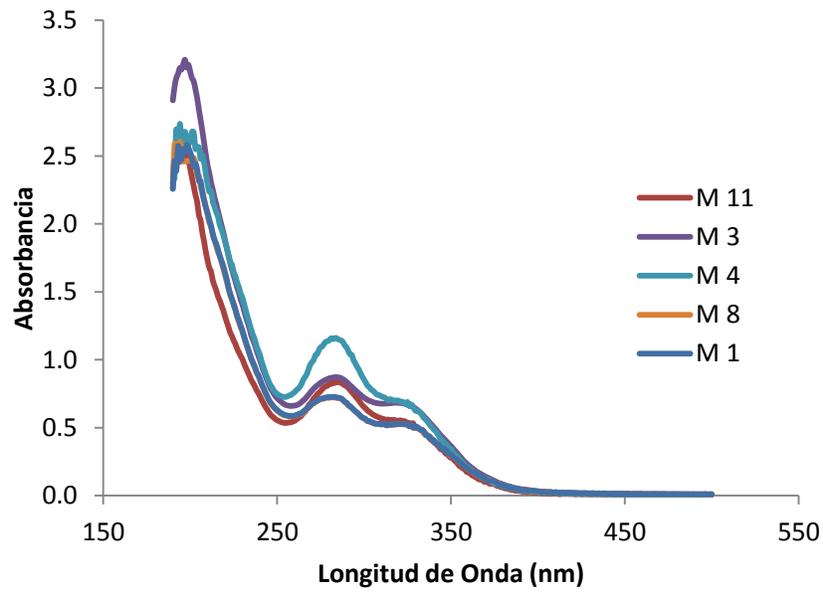


Figura 36. Perfil de Lignina Soluble en Ácido de algunos pretratamientos ácido

Curvas de Calibración para la cuantificación de los azúcares estudiados por HPLC

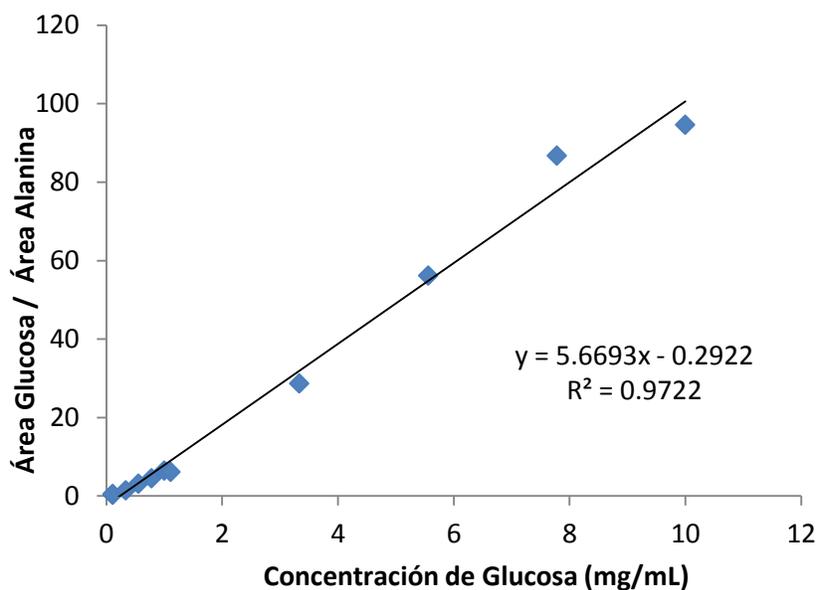


Figura 37. Curva patrón de Glucosa para la determinación de su concentración por HPLC

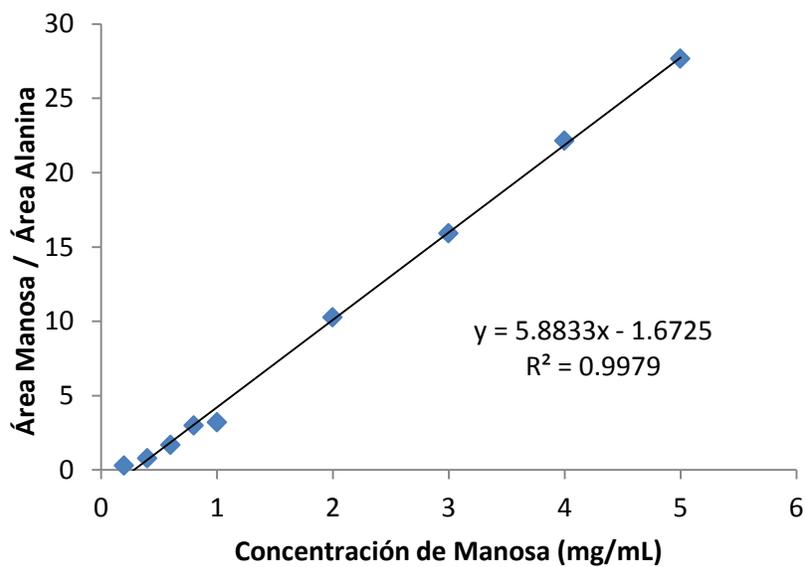


Figura 38. Curva patrón de Manosa para la determinación de su concentración por HPLC

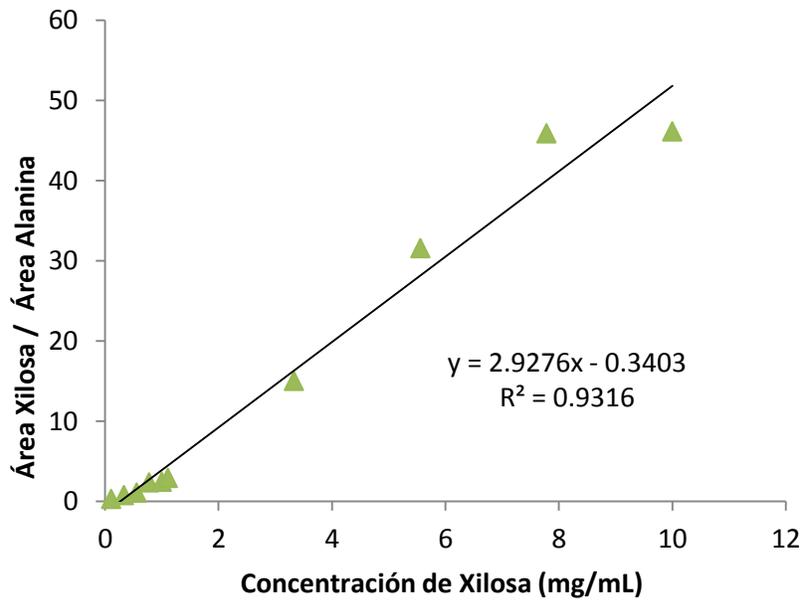


Figura 39. Curva patrón de Xilosa para la determinación de su concentración por HPLC

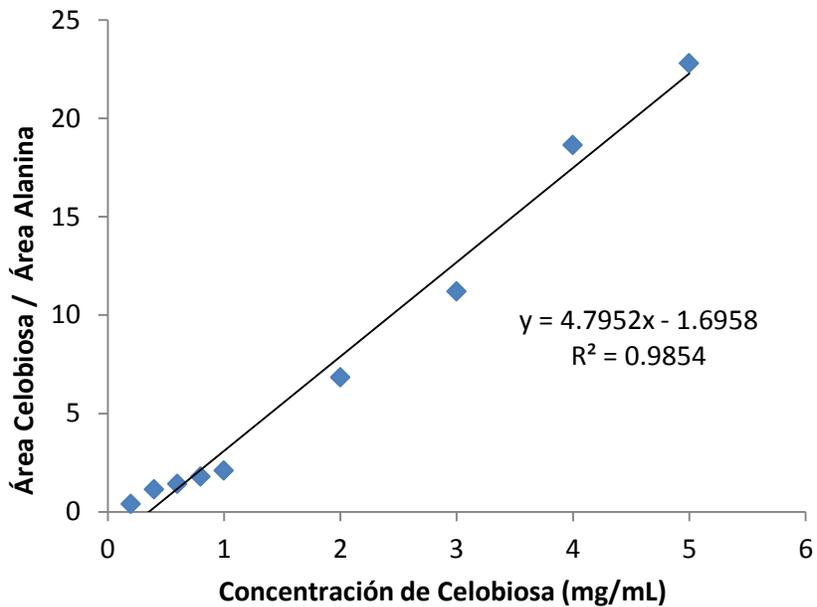


Figura 40. Curva patrón de Celobiosa para la determinación de su concentración por HPLC

Cromatogramas de HPLC para identificación y cuantificación de los azúcares estudiados

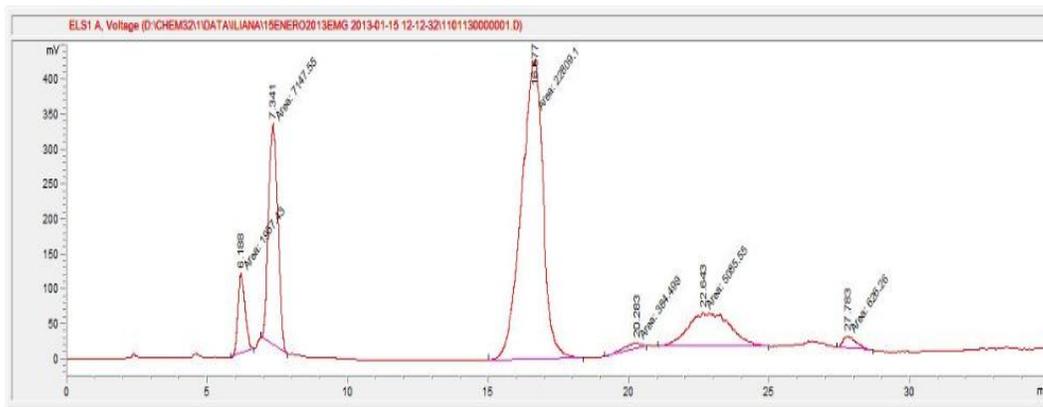


Figura 41. Cromatograma del Pasto Privilegio Sin Pretratar empleando el complejo enzimático E-6

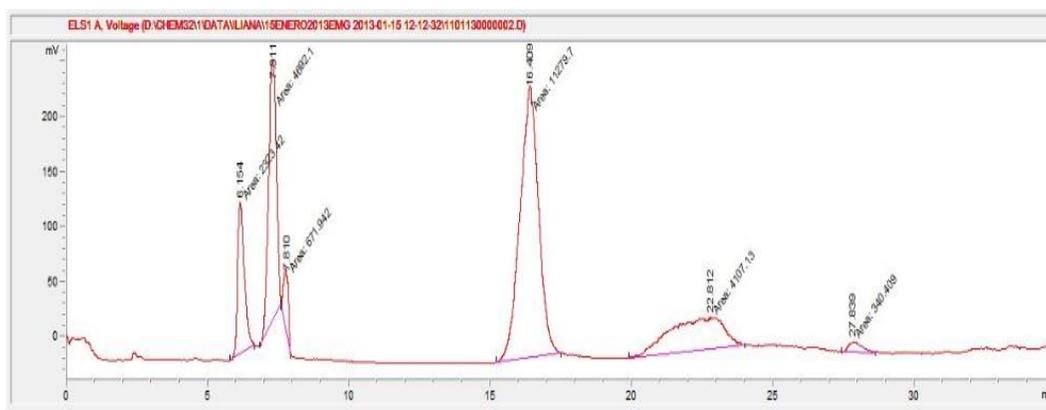


Figura 42. Cromatograma del Pasto Privilegio Sin Pretratar empleando el complejo enzimático E-7

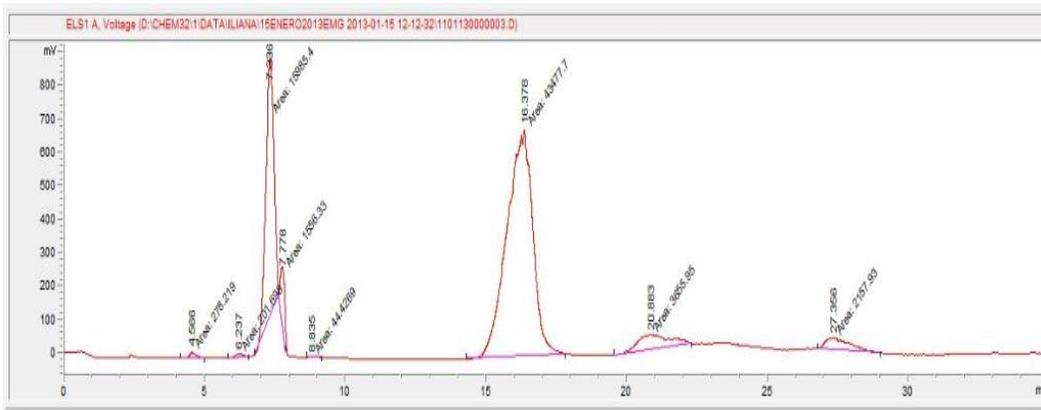


Figura 43. Cromatograma del Pasto Privilegio Pretratado con Ácido Diluido empleando el complejo enzimático E-6

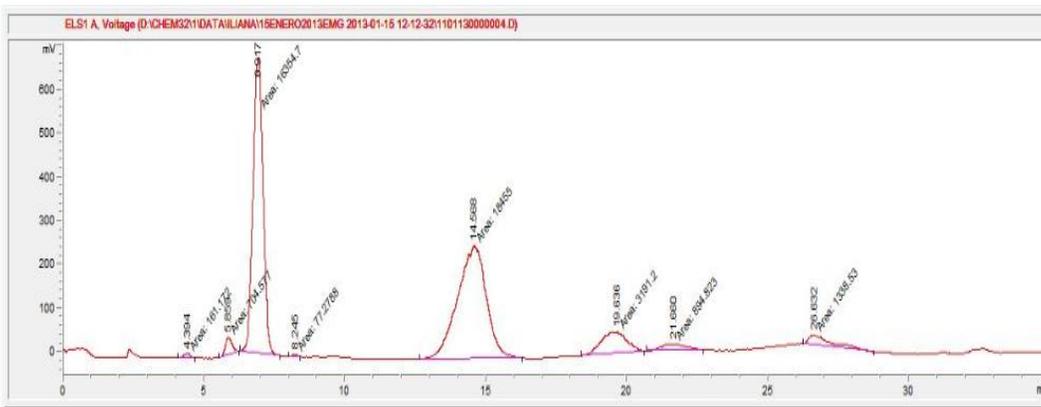


Figura 44. Cromatograma del Pasto Privilegio Pretratado con Ácido Diluido empleando el complejo enzimático E-7

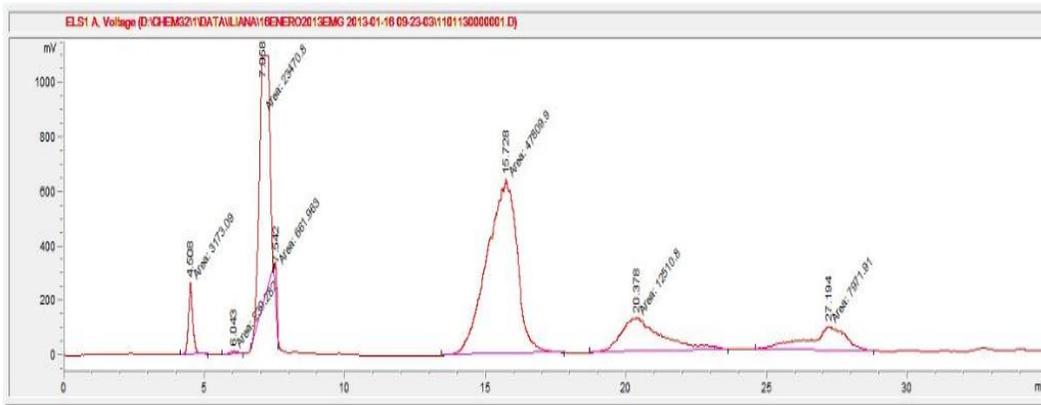


Figura 45. Cromatograma del Pasto Privilegio Pretratado con NaOH más Ácido Diluido empleando el complejo enzimático E-6

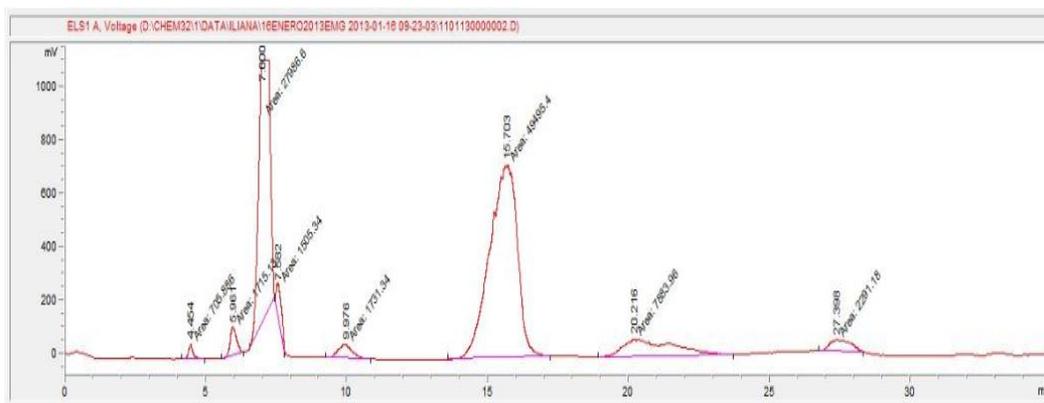


Figura 46. Cromatograma del Pasto Privilegio Pretratado con NaOH más Ácido Diluido empleando el complejo enzimático E-7

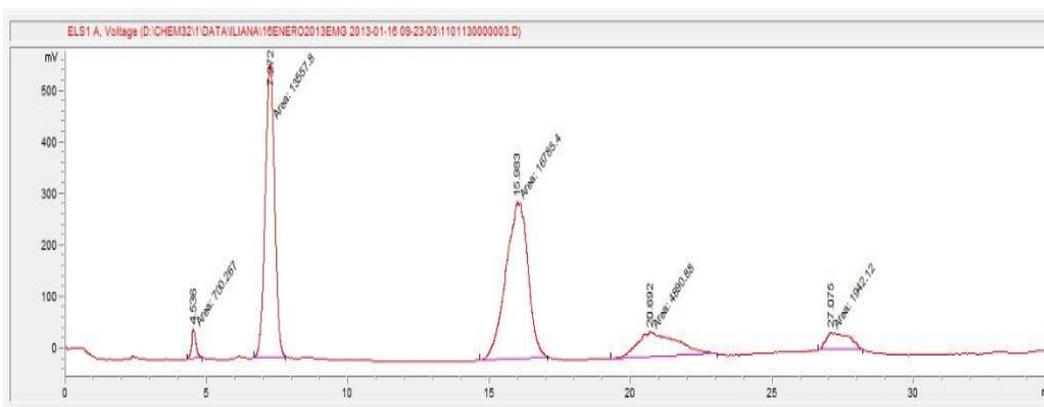


Figura 47. Cromatograma del Pasto Privilegio Pretratado con CaO más Ácido Diluido empleando el complejo enzimático E-6

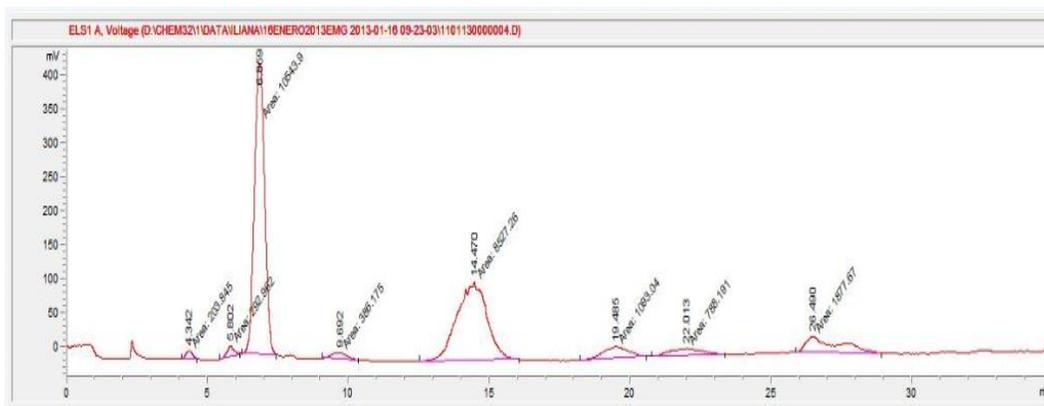


Figura 48. Cromatograma del Pasto Privilegio Pretratado con CaO más Ácido Diluido empleando el complejo enzimático E-7

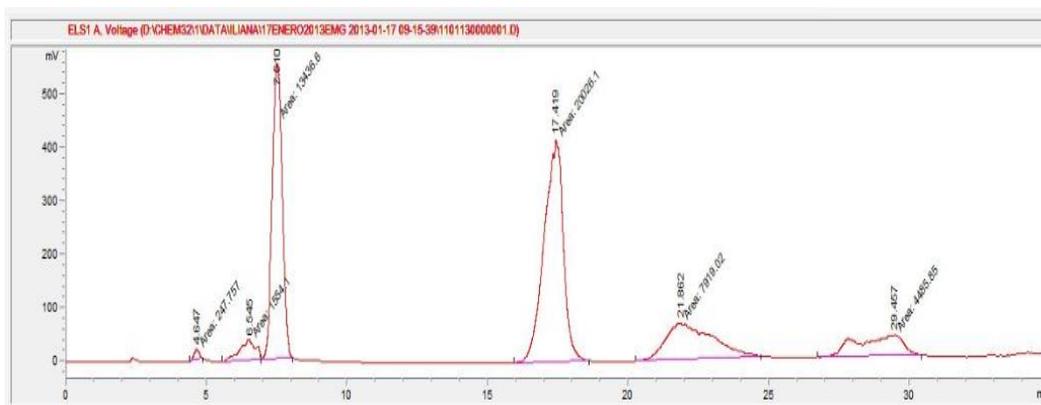


Figura 49. Cromatograma del Pasto Privilegio Pretratado con NaOH-H₂O₂ más Ácido Diluido empleando el complejo enzimático E-6

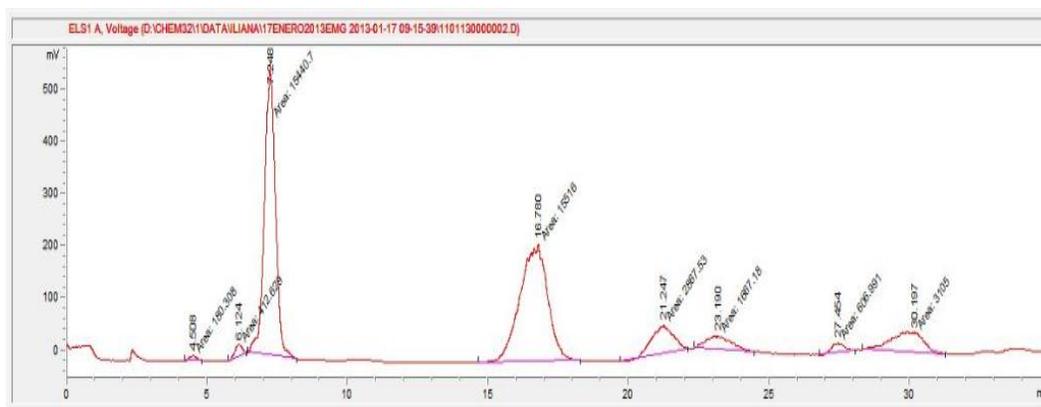


Figura 50. Cromatograma del Pasto Privilegio Pretratado con NaOH-H₂O₂ más Ácido Diluido empleando el complejo enzimático E-7