



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL PRETRATAMIENTO Y SACARIFICACIÓN
DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS
PARA LA OPTIMIZACIÓN DE GENERACIÓN DE AZÚCARES
SUSCEPTIBLES DE FERMENTACIÓN A ETANOL**

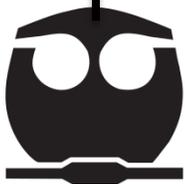
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

MIGUEL ANGEL FERRARI GÓMEZ



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: **Profesor:** Jesús Fernando Montiel Aguirre

Vocal: **Profesor:** Aida Gutiérrez Alejandre

Secretario: **Profesor:** Jorge Arturo Aburto Anell

1er Suplente: **Profesor:** Tatiana Eugenievna Klimova Berestneva

2° Suplente: **Profesor:** Oscar Hernández Meléndez

Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto Mexicano del Petróleo

Asesor del tema: Dr. Jorge Arturo Aburto Anell

Supervisor técnico: Dr. Ricardo Cerón Camacho

Sustentante: Miguel Angel Ferrari Gómez

Reconocimiento

La realización de esta investigación de tesis de licenciatura fue posible gracias al apoyo del Instituto Mexicano del Petróleo. Se agradece particularmente al

Proyecto Y.60013 "Desarrollo y adaptación de tecnología para la conversión de subproductos lignocelulósicos en etanol carburante". Así mismo al jefe de proyecto el Dr. Jorge Aburto Anell por su dirección y ayuda constante, en especial por su orientación metodológica y por su continuo estímulo durante todo el proceso hasta al final del mismo.

Igualmente se agradece a CONACYT / SENER por el apoyo económico brindado que fue de suma importancia para que la realización esta investigación.

Contenido

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Bioetanol en el mundo.	2
Material lignocelulósico.....	3
Composición de la madera.	4
Pretratamiento de materiales lignocelulósicos.....	8
Tipos de pre-tratamiento según su clasificación.	10
Proceso Kraft o al sulfato.	13
Nixtamalización	14
Hidrólisis enzimática	14
Hidrólisis enzimática de la celulosa.....	15
Hidrólisis enzimática de la hemicelulosa.	16
OBJETIVO.	18
Objetivos particulares.	18
HIPÓTESIS.	18
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	19
Caracterización del material lignocelulósico.	20
Determinación de humedad.....	20
Determinación de cenizas.....	20

Digestión ácida.	20
Lignina insoluble en ácido.....	21
Lignina soluble en ácido.	22
Lignina total.	24
Azúcares totales.	24
Azúcares reductores.....	25
Determinación de carbohidratos estructurales mediante HPLC.	26
Pretratamiento alcalino en reactor Parr.	27
Diseño de experimentos.....	27
Preparación del reactor y software.....	29
Sacarificación enzimática	35
Sacarificación enzimática sin pretratamiento de hule y apapaxco con cocteles enzimáticos E7.....	35
Sacarificación enzimática con pretratamiento de hule y apapaxco.	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	38
Caracterización del material.	38
Barrido para perfil de lignina soluble.....	38
Determinación de HPLC	40
Pretratamiento	40
Sacarificación enzimática	51

CONCLUSIONES.....	59
REFERENCIAS.....	62
ANEXO A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO FACTORIAL COMPLETO DEL PRETRATAMIENTO BÁSICO DE LA MADERA DE APAPAXCO.	65
ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO FACTORIAL COMPLETO DEL PRETRATAMIENTO BÁSICO DE LA MADERA DE HULE.	93
ANEXO C. SACARIFICACIÓN.....	121
ANEXO D. CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA HPLC	123
ANEXO E. ESPECIFICACIONES DE SISTEMAS DE REACTOR A PRESIÓN SERIE 5500	126

Índice de figuras

<i>Figura 1. Estructura del material lignocelulósico (DeAngelis & Allgaier, 2010).</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2. Polímeros que conforman la estructura de la biomasa lignocelulósica (Gnansounou, 2010).</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3. Estructura de la cadena de celulosa.</i>	<i>6</i>
<i>Figura 4. Estructura de precursores de la lignina.</i>	<i>6</i>
<i>Figura 5. Estructura química de la lignina de coníferas formada por diferentes tipos de sub estructuras. 1-4 son estructuras diméricas; siendo (1) éter guayacilglicerol-β-arílico, (2) fenilcumarano, (3) pinoresinol y (4) éter difenílico; y (5) es una estructura trimérica de dibenzodioxocina (García, 2003).</i>	<i>7</i>
<i>Figura 6. Mecanismo de acción de hidrólisis de enzimas de la celulosa.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 7. Vaso de PTFE utilizado y reactor Parr de acero inoxidable con sistema controlador remoto (Parr, 2013).</i>	<i>30</i>
<i>Figura 8. Perfil de temperatura durante el pretratamiento alcalino.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 9. Perfil de presión autógena dentro del reactor.</i>	<i>33</i>

<i>Figura 10. Representación gráfica del esquema del reactor en donde se muestra el porcentaje de apertura para el Cooling Output y el Heater Output y las condiciones de temperatura y presión...</i>	<i>34</i>
<i>Figura 11. Esquema de la hidrólisis enzimática sin pretratamiento.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12. Espectro de UV-vis de lignina soluble a diferente longitud de onda para diferentes materiales lignocelulósicos.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 13 Espectro UV-vis a para LSA de hule y Apapaxco después de la digestión ácida.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 14. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares totales para madera de Apapaxco.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 15. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares totales para madera de Hule.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 16. Diagrama de flujo de proceso para el pretratamiento y sacarificación de residuos de hule que representa las mejores condiciones de operación.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 17. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares totales en el pretratamiento de madera de Apapaxco.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 18. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para lignina soluble en el pretratamiento de madera de Apapaxco.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 19. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares totales en la sacarificación enzimática después del pretratamiento de madera de Apapaxco.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 20. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares reductores en la sacarificación enzimática después del pretratamiento de madera de Apapaxco..</i>	<i>66</i>
<i>Figura 21. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares totales en el pretratamiento de madera de Hule.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 22. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para lignina en el pretratamiento de madera de Hule.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 23. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares totales en la sacarificación enzimática después del pretratamiento de madera de Hule.....</i>	<i>94</i>

Figura 24. Representación esquemática del modelo 2^3 con triple interacción para azúcares reductores en la sacarificación enzimática después del pretratamiento de madera de Hule. 94

Índice de tablas

Tabla 1. Composición de varios tipos de biomasa lignocelulósica (% peso seco).	8
Tabla 2. Ventajas y desventajas de varios pretratamientos para materiales lignocelulósicos (Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009).	12
Tabla 3. Coeficientes de absortividad y longitud de onda recomendada para diferentes materiales lignocelulósicos (Barrera, Aburto, & Gualo, 2013).	23
Tabla 4. Método de trabajo para la columna de HPLC y detección de azúcares.	26
Tabla 5. Condiciones de reacción para los procesos de nixtamalización y el proceso Kraft 27	27
Tabla 6. Codificación del dominio experimental para el diseño de experimentos.	28
Tabla 7. Dominio experimental del pretratamiento básico.	29
Tabla 8. Secuencia de condiciones de operación del reactor para el pretratamiento básico para el diseño de experimentos.	32
Tabla 9. Resultados de los residuos de hule y Apapaxco después de la caracterización mediante digestión ácida.	38
Tabla 10. Perfil de azúcares de la caracterización de los residuos de maderas forestales mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados muestran los azúcares formados luego de la caracterización de los materiales.	40
Tabla 11. Dominio experimental del pretratamiento básico y resultados de concentración de azúcares totales y lignina soluble obtenidos después del pretratamiento de las maderas de Apapaxco y Hule.	41
Tabla 12. Coeficientes de correlación del modelo $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{123}x_1x_2x_3$ con un 95% de confianza para azúcares totales generados en el pretratamiento. En color rojo se encuentran los factores que tienen un efecto significativo sobre la respuesta.	45

<i>Tabla 13. Condiciones experimentales del pretratamiento básico que favorecen la solubilización de lignina y generación de azúcares totales de los residuos forestales.</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 14. Grado de polimerización (DP) después de la aplicación de la hidrólisis enzimática.</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 15. ANOVA; Variable: Azúcares Totales generados en la sacarificación posterior al pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 16. ANOVA; Variable: Azúcares Reductores generados en la sacarificación posterior al pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 17. ANOVA; Variable: Azúcares Totales generados en el pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).</i>	<i>90</i>
<i>Tabla 18. ANOVA; Variable: Lignina soluble en el pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).</i>	<i>90</i>
<i>Tabla 19. Coeficientes de regresión para azúcares totales del pretratamiento básico de Apapaxco. Factores en rojo presentan diferencia significativa. Var.: ATp (%); R-sqr=0,99904.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 20. Coeficientes de regresión para lignina soluble del pretratamiento básico de Apapaxco. Factores en rojo presentan diferencia significativa. Var.: LS (%); R-sqr=0,97828.</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 21. Coeficientes de regresión para azúcares totales de la sacarificación posterior al pretratamiento básico de Apapaxco. Factores en rojo presentan diferencia significativa. Var.: ATs (%); R-sqr=0,99982.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabla 22. Coeficientes de regresión para azúcares reductores de la sacarificación posterior al pretratamiento básico de Apapaxco. Factores en rojo presentan diferencia significativa. Var.: ARs (%); R-sqr=0,99975.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabla 23. ANOVA; Variable: Azúcares Totales generados en el pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).</i>	<i>95</i>

<i>Tabla 24. ANOVA; Variable: Lignina soluble en el pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).</i>	95
<i>Tabla 25. ANOVA; Variable: Azúcares Totales generados en la sacarificación posterior al pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).</i>	96
<i>Tabla 26. ANOVA; Variable: Azúcares Reductores generados en la sacarificación posterior al pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).</i>	96
<i>Tabla 27. Coeficientes de regresión para azúcares totales del pretratamiento básico de Hule. Factores en rojo presentan diferencia significativa.</i>	97
<i>Tabla 28. Coeficientes de regresión para lignina soluble del pretratamiento básico de Hule. Factores en rojo presentan diferencia significativa.</i>	97
<i>Tabla 29. Coeficientes de regresión para azúcares totales de la sacarificación posterior al pretratamiento básico de Hule. Factores en rojo presentan diferencia significativa.</i>	98
<i>Tabla 30. Coeficientes de regresión para azúcares reductores de la sacarificación posterior al pretratamiento básico de Hule. Factores en rojo presentan diferencia significativa.</i>	98
<i>Tabla 31. Condiciones de la sacarificación enzimática sin pretratamiento para los materiales lignocelulósicos.</i>	121
<i>Tabla 32. Resultados sacarificación con pretratamiento alcalino con coctel enzimático E7 Apapaxco.</i>	122
<i>Tabla 33. Resultados sacarificación con pretratamiento alcalino con coctel enzimático E7 para madera de hule.</i>	122
<i>Tabla 34. Tiempos de retención (minutos) de los estándares de glucosa, fructosa, sacarosa, xilosa y celobiosa</i>	123
<i>Tabla 35. Especificaciones de Sistemas de Reactor a Presión Serie 5500</i>	126

Índice de gráficos

Gráfico 1. Efecto del pretratamiento básico de la madera de Apapaxco sobre el contenido de azúcares totales (% p/p) a una concentración de 5% de CaO	46
Gráfico 2. Efecto del pretratamiento básico de la madera de Apapaxco sobre el contenido de lignina soluble (% p/p) a una concentración de 5% de CaO.....	47
Gráfico 3. Efecto del pretratamiento básico de la madera de Hule sobre el contenido de azúcares totales (% p/p) a un tiempo de reacción de 1 hora.	48
Gráfico 4. Efecto del pretratamiento básico de la madera de Hule sobre el contenido de lignina soluble (% p/p) a un tiempo de reacción de 1 hora.....	49
Gráfico 5. Azúcares totales obtenidos después de la hidrólisis enzimática con coctel E7.....	53
Gráfico 6. Azúcares reductores obtenidos después de la hidrólisis enzimática con coctel E7.	53
Gráfico 7. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 93°C.....	54
Gráfico 8. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 1 h de tiempo de reacción.	55
Gráfico 9. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.	56
Gráfico 10. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 1% de CaO.....	57
Gráfico 11. Valores predichos contra valores observados de azúcares totales generados en el pretratamiento de residuos de apapaxco.	67
Gráfico 12. Valores predichos contra valores observados de lignina soluble en el pretratamiento de residuos de apapaxco.	67
Gráfico 13. Valores predichos contra valores observados de azúcares totales generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento de residuos de apapaxco.....	68
Gráfico 14. Valores predichos contra valores observados de azúcares reductores generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento de residuos de apapaxco.....	68

Gráfico 15. Gráfica de probabilidad normal para azúcares totales generados en el pretratamiento básico de residuos de apapaxco.....	69
Gráfico 16. Gráfica de probabilidad normal para lignina soluble en el pretratamiento básico de residuos de apapaxco.	69
Gráfico 17. Gráfica de probabilidad normal para azúcares totales generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento básico de residuos de apapaxco.	70
Gráfico 18. Gráfica de probabilidad normal para azúcares reductores generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento básico de residuos de apapaxco.	70
Gráfico 19. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 1% de CaO.....	71
Gráfico 20. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 5% de CaO.....	71
Gráfico 21. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 10% de CaO.....	72
Gráfico 22. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 1 h de tiempo de reacción.....	72
Gráfico 23. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.....	73
Gráfico 24. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 3 h de tiempo de reacción.....	73
Gráfico 25. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 93°C.....	74
Gráfico 26. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 117°C.....	74
Gráfico 27. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 140°C.....	75
Gráfico 28. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 1% de CaO.....	75

Gráfico 29. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 5% de CaO.	76
Gráfico 30. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 10% de CaO.	76
Gráfico 31. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 1 h de tiempo de reacción.	77
Gráfico 32. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.	77
Gráfico 33. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 3 h de tiempo de reacción.	78
Gráfico 34. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 93°C.	78
Gráfico 35. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 117°C.	79
Gráfico 36. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 140°.	79
Gráfico 37. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 1% de CaO.	80
Gráfico 38. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 5% de CaO.	80
Gráfico 39. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 10% de CaO.	81
Gráfico 40. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 1 h de tiempo de reacción.	81
Gráfico 41. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 2 h de tiempo de reacción.	82
Gráfico 42. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 3 h de tiempo de reacción.	82

Gráfico 43. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 93°C.....	83
Gráfico 44. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 117°C.....	83
Gráfico 45. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 140°C.....	84
Gráfico 46. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 1% de CaO.....	84
Gráfico 47. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 5% de CaO.....	85
Gráfico 48. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 10% de CaO.....	85
Gráfico 49. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) 1 h de tiempo de reacción.	86
Gráfico 50. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.	86
Gráfico 51. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) 3 h de tiempo de reacción.	87
Gráfico 52. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) a 93 °C.	87
Gráfico 53. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) a 117°C.	88
Gráfico 54. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) a 140°C.	88
Gráfico 55. Valores predichos contra valores observados de azúcares totales generados en el pretratamiento de residuos de Hule.	99
Gráfico 56. Valores predichos contra valores observados de lignina soluble en el pretratamiento de residuos de Hule.	99

Gráfico 57. Valores predichos contra valores observados de azúcares totales generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento de residuos de Hule.	100
Gráfico 58. Valores predichos contra valores observados de azúcares reductores generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento de residuos de Hule.	100
Gráfico 59. Gráfica de probabilidad normal para azúcares totales generados en el pretratamiento básico de residuos de Hule.	101
Gráfico 60. Gráfica de probabilidad normal para lignina soluble en el pretratamiento básico de residuos de Hule.	101
Gráfico 61. Gráfica de probabilidad normal para azúcares totales generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento básico de residuos de Hule.	102
Gráfico 62. Gráfica de probabilidad normal para azúcares reductores generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento básico de residuos de Hule.	102
Gráfico 63. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 1% de CaO.	103
Gráfico 64. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 5% de CaO.	103
Gráfico 65. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 10% de CaO.	104
Gráfico 66. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 1 h de tiempo de reacción.	104
Gráfico 67. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.	105
Gráfico 68. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 3 h de tiempo de reacción.	105
Gráfico 69. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 93°C.	106
Gráfico 70. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 117°C.	106

Gráfico 71. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 140°C.....	107
Gráfico 72. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 1% de CaO.....	107
Gráfico 73. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 5% de CaO.....	108
Gráfico 74. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 10% de CaO.....	108
Gráfico 75. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 1 h de tiempo de reacción.....	109
Gráfico 76. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.....	109
Gráfico 77. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 3 h de tiempo de reacción.....	110
Gráfico 78. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 93°C.	110
Gráfico 79. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 117°C.	111
Gráfico 80. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 140°C.	111
Gráfico 81. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 1% de CaO.	112
Gráfico 82. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 5% de CaO.	112
Gráfico 83. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 10% de CaO.	113
Gráfico 84. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 1 h de tiempo de reacción.	113

Gráfico 85. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 2 h de tiempo de reacción.	114
Gráfico 86. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 3 h de tiempo de reacción.	114
Gráfico 87. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 93°C.....	115
Gráfico 88. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 117°C.....	115
Gráfico 89. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 140°C.....	116
Gráfico 90. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 1% de CaO.....	116
Gráfico 91. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 5% de CaO.....	117
Gráfico 92. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 10% de CaO.....	117
Gráfico 93. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación 1 h de tiempo de reacción.....	118
Gráfico 94. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación 2 h de tiempo de reacción.....	118
Gráfico 95. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación 3 h de tiempo de reacción.....	119
Gráfico 96. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 93°C.	119
Gráfico 97. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 117°C.	120
Gráfico 98. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 140°C.	120

<i>Gráfico 99</i>	<i>Curva de calibración de glucosa en HPLC.....</i>	<i>123</i>
<i>Gráfico 100.</i>	<i>Curva de calibración de glucosa en HPLC.</i>	<i>124</i>
<i>Gráfico 101.</i>	<i>Curva de calibración de xilosa en HPLC.....</i>	<i>124</i>
<i>Gráfico 102.</i>	<i>Curva de calibración de xilosa en HPLC.....</i>	<i>125</i>

Resumen.

Los biocombustibles líquidos producidos actualmente a partir de cultivos de azúcar o almidón y de cultivos de semillas oleaginosas se denominan biocombustibles de primera generación. Sin embargo, este tipo de combustibles tiene como desventaja el desvío de recursos alimenticios hacia la producción de energéticos y no cubre las demandas proyectadas de producción de bioetanol o biodiesel.

Por otro lado, el bioetanol de segunda generación es producido a partir de materia lignocelulósica, como residuos agrícolas y forestales, que no son considerados alimentos sino como residuos. Estos materiales (o residuos) son fuentes renovables y abundantes. Su generación no compite con tierras de uso agrícola ni con fuentes alimentarias, por ello se hace atractivo su aprovechamiento para el desarrollo de biocombustibles.

El objetivo del presente trabajo es obtener y determinar azúcares potencialmente empleados para generación de etanol a partir de residuos forestales de madera. Primeramente se realizó la caracterización del material, seguida de la cuantificación de azúcares totales, reductores y perfil de carbohidratos por la técnica de HPLC. Posteriormente se usó un pretratamiento básico utilizando cal comercial (agente básico, de alta disponibilidad y bajo coste), en base al procesos de nixtamalización, con el propósito de incrementar el rendimiento de la sacarificación enzimática. Para así, medir los carbohidratos que componen el jarabe final obtenido por sacarificación enzimática.

Introducción.

Bioetanol en el mundo.

Durante las más recientes décadas se ha incrementado el interés en combustibles producidos a partir de materias renovables. El bioetanol es por mucho el biocombustible más usado en el mundo. La producción de bioetanol a partir de biomasa es uno de los caminos para reducir el consumo de petróleo crudo y la contaminación ambiental. El bioetanol puede ser producido a partir de diferentes tipos de materia prima. Estos materiales están clasificados en tres categorías: azúcares simples, bagazos y lignocelulósicos (Balat, 2010). Dependiendo de la fuente de la materia prima la producción de bioetanol se puede clasificar como:

Primera generación: Algunos de los insumos son de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas, las cuales tienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites.

Segunda generación: Los insumos son residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. Ejemplos de ellos son el bagazo de la caña de azúcar, el rastrojo de maíz (tallos, hojas y olote), paja de trigo, aserrín, hojas y ramas secas de árboles, etcétera.

Tercera generación: Los insumos son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que, se les denomina “cultivos energéticos”. Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verde-azules.

Cuarta generación: Los biocombustibles son producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean anhídrido carbónico (CO₂) o alguna otra fuente de carbono para la obtención de los biocombustibles. A diferencia de las generaciones anteriores, en las que también se pueden emplear bacterias y organismos genéticamente modificados como insumo o para realizar

alguna parte de los procesos, en la cuarta generación, la bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de los biocombustibles.

La biomasa derivada del maíz se ha convertido en uno de las materias primas más usadas para la producción de bioetanol recientemente. Sin embargo, el uso de alimentos como biocombustibles ha llevado a buscar fuentes no alimentarias. Como consecuencia las investigaciones se han enfocado en procesos a gran escala y bajo costo, usando materiales lignocelulósicos originados principalmente por residuos agrícolas y forestales, además de materiales herbáceos y residuos municipales. (Limayem & C. Ricke, 2011)

El precio de las materias primas es altamente volátil, los cuales pueden afectar los costos de producción del biocombustible. La biomasa lignocelulósica es la más prometedora materia prima considerando su amplia disponibilidad y bajo costo, pero la producción a gran escala de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos aún no ha sido implementada (Balat, 2010).

Material lignocelulósico.

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía. El principal impedimento tecnológico para la utilización de la biomasa vegetal es, en general, la ausencia de una tecnología de bajo costo dirigida a la recalcitrancia de la lignocelulosa. La biomasa lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) es la principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (AJ, y otros, 2006).

Composición de la madera.

La biomasa lignocelulósica consiste principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina; estos componentes comprenden el 90% de la materia seca de la lignocelulosa, el resto consiste en compuestos orgánicos como aceites o resinas y cenizas (Figura 1).

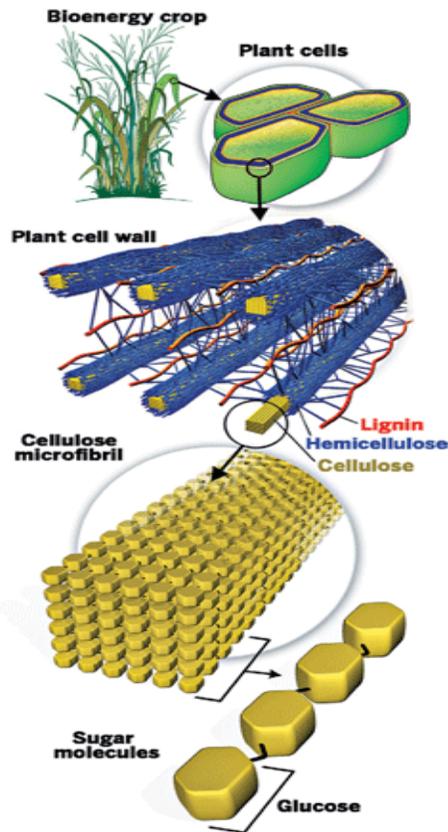


Figura 1. Estructura del material lignocelulósico (DeAngelis & Allgaier, 2010).

La estructura básica de toda la madera consiste básicamente de tres polímeros: celulosa ($C_6H_{10}O_5$)_x, hemicelulosa ($C_5H_8O_4$)_m, y lignina [$C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0.9-1.7}$]_n, en el tronco, follaje y la corteza (Figura 2). La proporción de estos constituyentes varía entre especies, y existen claras diferencias entre maderas suaves y duras. Celulosa + hemicelulosa tienen contenidos de 78.8% en maderas duras mientras que presentan un 70.3% en maderas suaves, existe un mayor contenido de lignina en maderas suaves (29.2%) que en maderas duras (21.7%) (Balat, 2010). La

composición estructural de varios tipos de biomasa lignocelulósica esta mostrada en la Tabla 1.

La celulosa y hemicelulosa, típicamente constituye dos tercios de la pared celular, son polisacáridos que pueden ser hidrolizados a azúcares reductores y después fermentados a bioetanol. El rendimiento del proceso está directamente relacionado con la celulosa, hemicelulosa en la materia prima. La lignina no puede ser usada para la producción de bioetanol.

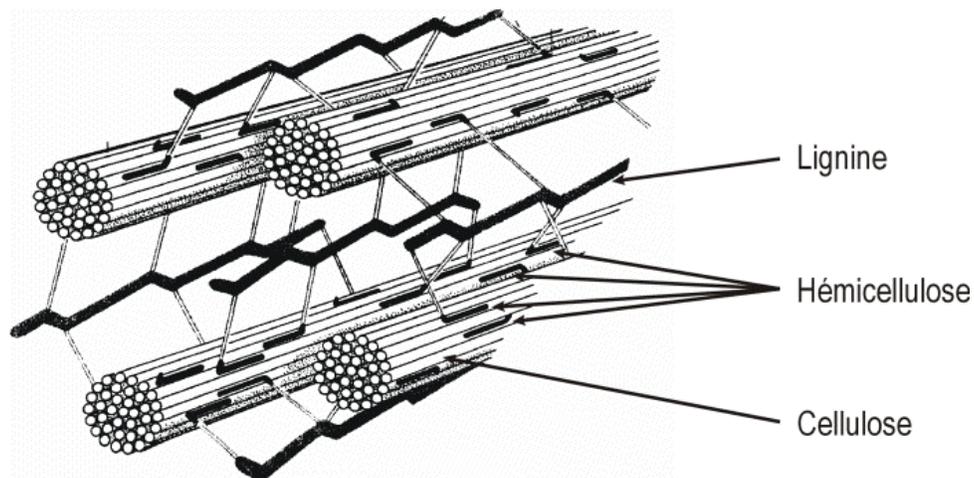


Figura 2. Polímeros que conforman la estructura de la biomasa lignocelulósica (Gnansounou, 2010).

La celulosa es un polímero lineal de glucosa, la orientación de los enlaces y los puentes intra e intermoleculares de hidrógeno hace el polímero rígido y difícil de romper (Figura 3). En la hidrólisis el polisacárido se rompe liberando moléculas de glucosa y agua. Este proceso es conocido como sacarificación. La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Osvando-Chacón & Waliszewski, 2005).

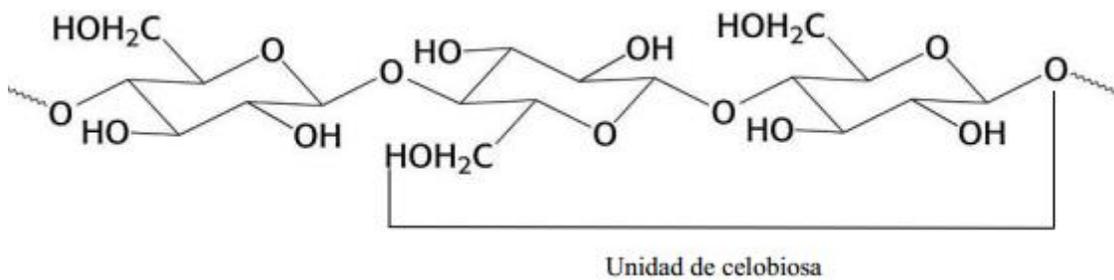


Figura 3. Estructura de la cadena de celulosa.

La hemicelulosa (20 -40 % de material seco) es un polímero altamente ramificado azúcares de cinco carbonos (pentosas) y seis carbonos (hexosas). Específicamente la hemicelulosa contiene xilosa y arabinosa (azúcares de 5 carbonos) y galactosa, glucosa y manosa (azúcares de 6 carbonos). La hemicelulosa es más hidrolizable comparado con la celulosa debido a que es ramificada, de naturaleza amorfa (Lee, Owens, Boe, & Jeranyama, 2007). Los azúcares dominantes en la hemicelulosa para maderas suaves es la manosa y xilosa en maderas duras y residuos agrícolas (Tahezadeh & Karimi, 2008).

La lignina (15- 25% del peso seco del material) es un polímero aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides. Los componentes básicos de las unidades de lignina (principalmente alcoholes p-cumarílico, coniferílico, sinapílico) (figura 4) están unidos por un conjunto de enlaces en una matriz compleja (Demirbas, 2008).

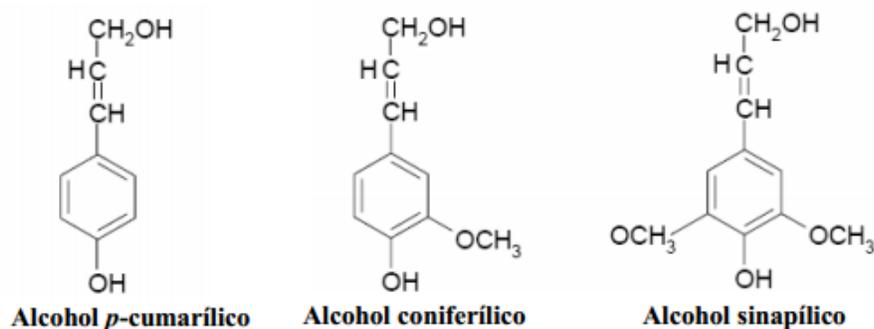


Figura 4. Estructura de precursores de la lignina.

Esta matriz comprende una variedad de grupos funcionales, como hidroxilo, metoxilo y carbonilo los cuales imparten una alta polaridad a la macromolécula de la lignina (Figura 5) (Feldman, y otros, 2006).

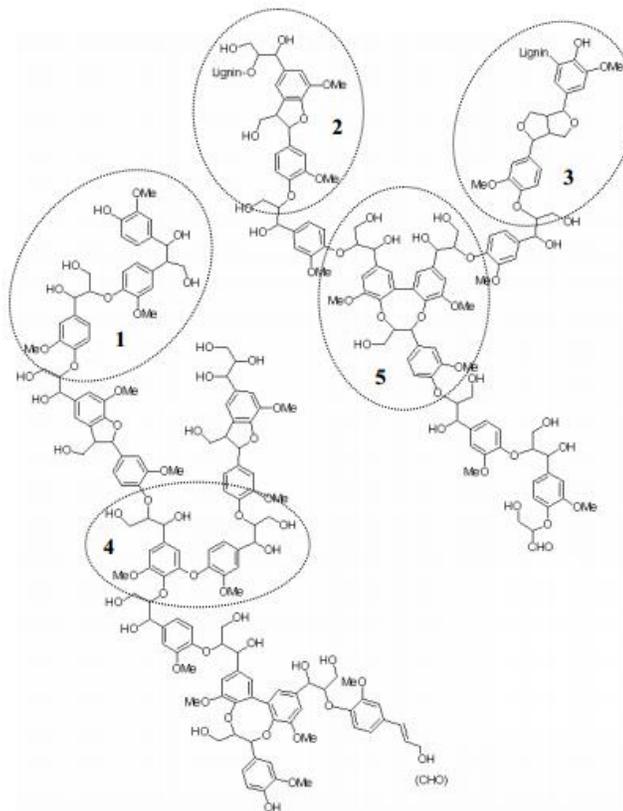


Figura 5. Estructura química de la lignina de coníferas formada por diferentes tipos de subestructuras. 1-4 son estructuras diméricas; siendo (1) éter guayacilglicerol-β-arílico, (2) fenilcumarano, (3) pinoresinol y (4) éter difenílico; y (5) es una estructura trimérica de dibenzodioxocina (García, 2003).

La lignina es uno de los inconvenientes de usar lignocelulósicos en la fermentación, ya que hace que ésta sea resistente a la degradación química y biológica (Taherzadeh & Karimi, 2008).

Tabla 1. Composición de varios tipos de biomasa lignocelulósica (% peso seco).

Material	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Cenizas	Otros
Algas (verdes)	20-40	20-50	-	-	-
Algodón	80-95	5-20	-	-	-
Pastos	25-40	25-50	10-30	-	-
Maderas suaves	42 ± 2	30 ± 5	20 ± 4	0.6 ± 0.2	5 ± 3
Maderas Duras	42 ± 2	27 ± 2	28 ± 3	0.5 ± 0.1	3 ± 2
Rastrojo de maíz	39-47	26-31	3-5	12-16	1-3
Fibra de trigo	37-41	27-32	13-15	11-14	7 ± 2
Papel	40-55	25-40	18-30	-	-
Pulpas químicas	60-80	20-30	2-10	-	-

Pretratamiento de materiales lignocelulósicos.

La conversión bioquímica de los materiales lignocelulósicos a través de la sacarificación y fermentación es el mejor camino para la producción de bioetanol.

La bioconversión es difícil debido a:

- 1) La resistencia natural de la biomasa a la ruptura.
- 2) La variedad de azúcares los cuales son liberados cuando los polímeros de hemicelulosa y celulosa son hidrolizados, y la necesidad de encontrar organismos genéticamente modificados para fermentar eficientemente estos azúcares.
- 3) Costos de recolección y almacenamiento debido a la baja densidad de los lignocelulósicos.

La recalcitrancia de la lignocelulosa es una de las mayores barreras para la producción económica de bioetanol. Para vencer la recalcitrancia, es necesario hacer un pretratamiento de la biomasa para remover esta barrera haciendo a la celulosa más accesible a la acción enzimática para la conversión a glucosa (Zhu, Wang, Pan , & Gleisner, 2008). Si el pretratamiento no es lo suficientemente eficaz, el resultado será una hidrólisis difícil por parte de la enzima celulasa y aún más severo, si el resultado es la producción de compuestos tóxicos los cuales inhiban el metabolismo de los microorganismos fermentadores (Kodali & Pogaku, 2006).

El pretratamiento es visto como uno de los pasos más costosos en el proceso de conversión de la biomasa a azúcares fermentables (Zhang, Pan, & Zhang , 2009). El pretratamiento de la biomasa lignocelulósica en un manera efectiva y a bajo costo, es el mayor reto en el desarrollo e investigación de tecnología para convertir la celulosa a bioetanol (Chandel, Rudravaram, Narasu, Rao, & Ravindra, 2007).

Los prerequisites para un pretratamiento ideal fueron resumidos por Taherzader y Karimi (Taherzadeh & Karimi, 2008); estos deberían de ser los siguientes:

- Producción de fibras celulósicas reactivas al ataque enzimático.
- Evitar la destrucción de la hemicelulosa y celulosa.
- Evitar la formación de posibles inhibidores para la hidrólisis enzimática y los microorganismos fermentadores.
- Minimizar el costo energético.
- Reducir el costo de los materiales para la construcción de los reactores de pretratamiento.
- Producir la menor cantidad de residuo.
- Consumo mínimo de químicos y usar reactivos baratos.

Tipos de pre-tratamiento según su clasificación.

- **Pretratamientos biológicos.**

Los pretratamientos biológicos emplean microorganismos, en su mayoría aquellos que degradan la lignina, la hemicelulosa y una pequeña parte de celulosa. Se utilizan principalmente hongos de putrefacción café, blanca y blanda. Las ventajas de los pretratamientos biológicos son los bajos requerimientos de energía y el bajo impacto ambiental. Sin embargo, la desventaja radica en la baja velocidad de hidrólisis del material lignocelulósico (Zheng, 2009).

- **Pretratamientos físicos.**

Mecánico: El objetivo del pretratamiento mecánico es la reducción de la cristalinidad lignocelulósica y del grado de polimerización, además de incrementar la superficie de contacto de la biomasa celulósica por su rompimiento en partículas más pequeñas, haciendo un sustrato más accesible a la hidrólisis enzimática. Las desventajas del proceso, es que consume mucho tiempo, energía y dinero, además de ser menos efectivo ante los pretratamientos químicos ya que no remueve la lignina (Zheng, 2009).

- **Pretratamientos físico-químicos**

Explosión de vapor: La explosión de vapor o auto hidrólisis, es uno de los métodos más comúnmente utilizados. En este método la biomasa es tratada con vapor saturado a alta presión y después la presión es reducida rápidamente, lo cual ocasiona una descompresión explosiva. El proceso causa la degradación de hemicelulosa y lignina, lo cual incrementa la hidrólisis enzimática. Entre las ventajas de este método, se encuentra el requerimiento bajo de energía, y entre sus desventajas, la destrucción de una porción de la fracción de xilano y la generación de compuestos inhibitorios en la hidrólisis.

Explosión de fibra de amonio: AFEX, es otro tipo de pretratamiento físico-químico, en el cual el material lignocelulósico es expuesto en amonio líquido a alta presión y temperatura durante cierto tiempo, posteriormente se reduce rápidamente la temperatura. Esta reducción súbita de presión abre la estructura lignocelulósica provocando el incremento en la digestibilidad de la biomasa. Algunas de las ventajas son, que no se requiere reducir el tamaño de partícula de la muestra y produce compuestos inhibitorios despreciables, por lo tanto, no es necesario lavar el sólido con agua. Sin embargo, el costo del pretratamiento es muy alto.

Explosión con CO₂: El método es similar al AFEX o a la explosión de vapor. Se piensa que el CO₂ forma ácido carbónico e incrementa el grado de hidrólisis. Este método resulta más eficaz que el anterior y no causa la formación de compuestos inhibitorios.

- **Pretratamientos químicos:**

Ozonólisis: El ozono puede ser utilizado para degradar lignina y hemicelulosa en diversos materiales lignocelulósicos como trigo y bagazo. La degradación está esencialmente limitada al ligero ataque a la lignina y hemicelulosa, mientras que la celulosa es fuertemente afectada. Este pretratamiento tiene la ventaja de remover efectivamente la lignina, no producir residuos tóxicos, y la presión y temperatura son a condiciones ambientales. Sin embargo, el gran requerimiento de ozono hace el proceso demasiado caro.

Hidrólisis ácida: La hidrólisis con ácido diluido ha sido desarrollada para el pretratamiento de material lignocelulósico derivado de la hidrólisis con ácido sulfúrico y ácido clorhídrico. El modo de acción del ácido diluido es solubilizar la hemicelulosa y dejar a la celulosa intacta para la subsecuente hidrólisis enzimática. Una de las ventajas es que, los oligómeros lignocelulósicos pueden ser completamente hidrolizados a monosacáridos, pero la principal desventaja recae en la degradación de azúcares que produce productos inhibitorios de la fermentación

Pretratamiento alcalino: Este tipo de pretratamiento emplea varias bases, incluyendo hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, amonio acuoso e hidróxido de amonio. Son utilizadas para el pretratamiento de biomasa y su efecto sobre el material depende del contenido de lignina. Se cree que el mecanismo de acción consiste en la saponificación de los enlaces éster intermolecular rompiéndose en xilano, hemicelulosa y otros compuestos como lignina. El hidróxido de sodio diluido causa el hinchamiento del material lignocelulósico provocando un aumento en el área interna de la superficie, también provoca la disminución de la cristalinidad, la separación de la estructura entre la lignina y los carbohidratos, y la desorganización de la estructura de lignina. Este pretratamiento es efectivo para materiales con un contenido de lignina relativamente bajo del 10-18 %. Este pretratamiento requiere bajas temperaturas y presiones. Sin embargo, su principal desventaja es la conversión de base en sales irre recuperables o la incorporación de sales en la biomasa (Zheng, 2009). Las ventajas y desventajas de los diferentes tipos de pretratamiento se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de varios pretratamientos para materiales lignocelulósicos (Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009).

Pretratamiento	Ventajas	Limitaciones y desventajas
Trituración mecánica	Reduce la cristalinidad de la celulosa.	Consumo de energía usado es mayor que la energía que proporciona la biomasa.
Steam explosión	Causa la degradación de hemicelulosa y lignina.	Destrucción de una porción de xilano; ruptura incompleta de la matriz lignina carbohidrato; generación de compuestos inhibitorios.
AFEX	Incrementa el área superficial, remueve lignina y hemicelulosa, no produce inhibidores.	No es eficiente para biomasa con altos contenidos de lignina.
CO₂ explosión	Incrementa el área superficial; no causa la formación de	No modifica lignina o hemicelulosa.

	compuestos inhibidores.	
Ozonólisis	Reduce el contenido de lignina; no produce residuos tóxicos.	Gran cantidad de ozono es requerido.
Hidrólisis ácida	Hidroliza hemicelulosa a xilosa y otros azúcares; altera la estructura de la lignina.	Altos costos; corrosión de equipos.
Hidrólisis alcalina	Remueve hemicelulosa y lignina; incrementa el área de superficie accesible.	Altos tiempos de residencia; formación de sales irre recuperables e incorporación en la biomasa.
Pirólisis	Produce productos gaseosos y líquidos.	Altas temperaturas; producción de cenizas.
Biológico	Degrada lignina y hemicelulosa; bajo requerimiento energético.	La tasa de hidrólisis es demasiado baja.

Proceso Kraft o al sulfato.

El proceso Kraft para la obtención de pasta de papel es un proceso químico alcalino en el que se usa hidróxido de sodio u óxido de calcio y además, se utiliza el sulfuro sódico, siendo estos agentes de cocción conocidos como lejías blancas. El proceso se lleva a cabo en digestores que pueden ser tanto discontinuos como continuos, en los que se introducen las astillas junto a las lejías blancas llevándose a cabo la cocción a elevada temperatura (140-170°C) y presión (García & Colom, 1992). De un modo general el proceso tiene lugar con una concentración de reactivos del 16-20% (expresados como peso de Na₂O, en relación al peso de la madera) y sus rendimientos varían entre un 40 y 60%. La ventaja de este proceso es que requiere tiempos de cocción relativamente bajos pues el sulfuro acelera la deslignificación reduciendo la degradación del material celulósico y produciendo así, pastas de mejor calidad (Stevens & Kocurek, 1983). La resistencia es su principal característica de donde deriva su nombre "kraft", del alemán resistencia.

Nixtamalización

Actualmente en México, el maíz representa el componente más importante de la producción agrícola, para consumo humano se somete al maíz al proceso de cocimiento en una solución alcalina de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, debido a que los componentes de la membrana celular de los granos del maíz, entre los cuales se incluyen hemicelulosa y pectina, son altamente solubles en soluciones alcalinas, los granos se suavizan y sus pericarpios (cáscaras) se aflojan. El grano se hidrata y absorbe calcio a lo largo de todo el proceso. Los almidones se disuelven y gelatinizan, algunos almidones se dispersan en el líquido. Se liberan ciertos productos químicos del germen que permiten que el grano cocido sea más fácil de triturar.

La cocción produce cambios en la proteína principal del maíz, haciendo que las proteínas y nutrientes del endospermo del núcleo sean más asimilables para el cuerpo humano. En el proceso de nixtamalización, se varía el contenido de CaO (cal) en 1, 2, y 4 %, con respecto al peso de maíz utilizado. En la nixtamalización se utiliza una proporción de 3:1 de peso de agua y maíz. La temperatura final de cocido varía de entre los 76 °C a la temperatura de ebullición del agua durante 60 minutos. Posteriormente, los granos de maíz permanecen en reposo en el nejayote durante 12 horas, y a continuación el maíz es lavado. Inmediatamente después de este proceso se desprende el pericarpio de los granos de maíz (Maya, Figueroa, Garnica, & Veles, 2010).

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis ácida tiene una desventaja en la cual los azúcares son convertidos a productos de degradación como furfurales y alquitranes. Esta degradación puede ser prevenida usando enzimas que favorezcan 100% de conversión selectiva de celulosa a glucosa. Cuando la hidrólisis es catalizada por estas enzimas, el proceso es conocido como hidrólisis enzimática (Pike, Segupta , & Hertwig, 2008).

La hidrólisis enzimática es un proceso muy lento porque la hidrólisis de la celulosa está limitado por parámetros estructurales del substrato, como el contenido de

lignina y hemicelulosa, el área superficial y la cristalinidad de la celulosa (Pan, Gilkes, & Saddler, 2006). La hidrólisis enzimática involucra el uso de enzimas (celulasas y hemicelulasas) para hidrolizar la lignocelulosa en azúcares fermentables.

Hidrólisis enzimática de la celulosa.

La celulosa es hidrolizada por la enzima celulasa que hidroliza los enlaces glucosídicos de los polímeros de celulosa. El mecanismo para la hidrólisis enzimática de celulosa (Figura 6) involucra la acción sinérgica de endoglucanasas (EG, endo-1,4- β -D-glucanasas, o EC 3.2.1.3.), exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH, 1,4- β - D-glucan celobiosa hidrolasas, o EC 3.2.1.91.), y β -glucosídadas (BGL, celobiasas o EC 3.2.1.21). EG hidroliza el enlace intramolecular de β -1,4-glucosídico de las cadenas de celulosa aleatoriamente y produce nuevas cadenas más cortas con un extremo reductor; CHB progresivamente hidroliza las cadenas de celulosa en el extremo reductor para liberar celobiosa o glucosa; y BGL hidroliza celobiosa para formar glucosa (Zhang, Himmel, & Mielenz, 2006).

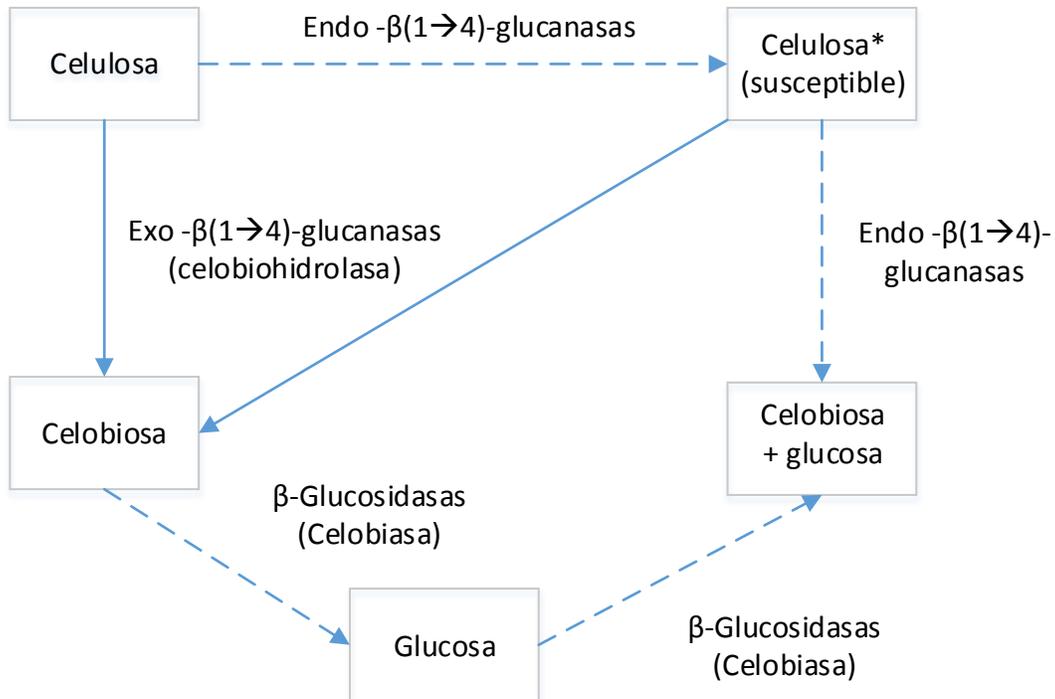


Figura 6. Mecanismo de acción de hidrólisis de enzimas de la celulosa.

Existen diferentes factores que afectan la hidrólisis enzimática de la celulosa, como los sustratos, la actividad de la celulasa y las condiciones de reacción (pH, temperatura), y productos de inhibición. Los factores que se conocen afectan el rendimiento de la hidrólisis incluyen (Detroy & Julian, 1982):

- Estructura molecular de la celulosa.
- Cristalinidad de la celulosa.
- Área de contacto de las fibras de celulosa.
- Grado de hinchazón de las fibras.
- Grados de polimerización.

Hidrólisis enzimática de la hemicelulosa.

A diferencia de la celulosa, los xilanos son químicamente más complejos y su degradación requiere múltiples enzimas. La hidrólisis enzimática de la

hemicelulosa involucra a las endoxilanasas, exoxilanasas, β -xilosidasas , α -arabinofuranosidasas, α -glucuronosidasa, acetil xilan estereasa, y ácido ferúlico esterasa (Szulcyk, McCarl, & Cornforth, 2010)

La endoxilanasas ataca la cadena principal de xilano y la β xilosidasa hidroliza los oligosacáridos de xilosa. Mientras que el número de enzimas requeridas para la hidrólisis de la hemicelulosa es mayor que para la hidrólisis de la celulosa, la accesibilidad es más fácil en el xilano ya que no presenta estructuras cristalinas (Keshwani & Cheng, 2009).

Objetivo.

Evaluar el efecto del pretratamiento alcalino basado en el principio de la nixtamalización para la deslignificación de residuos forestales de árbol Apapaxco y Hule; con la finalidad de generar azúcares reductores durante una sacarificación enzimática posterior.

Objetivos particulares.

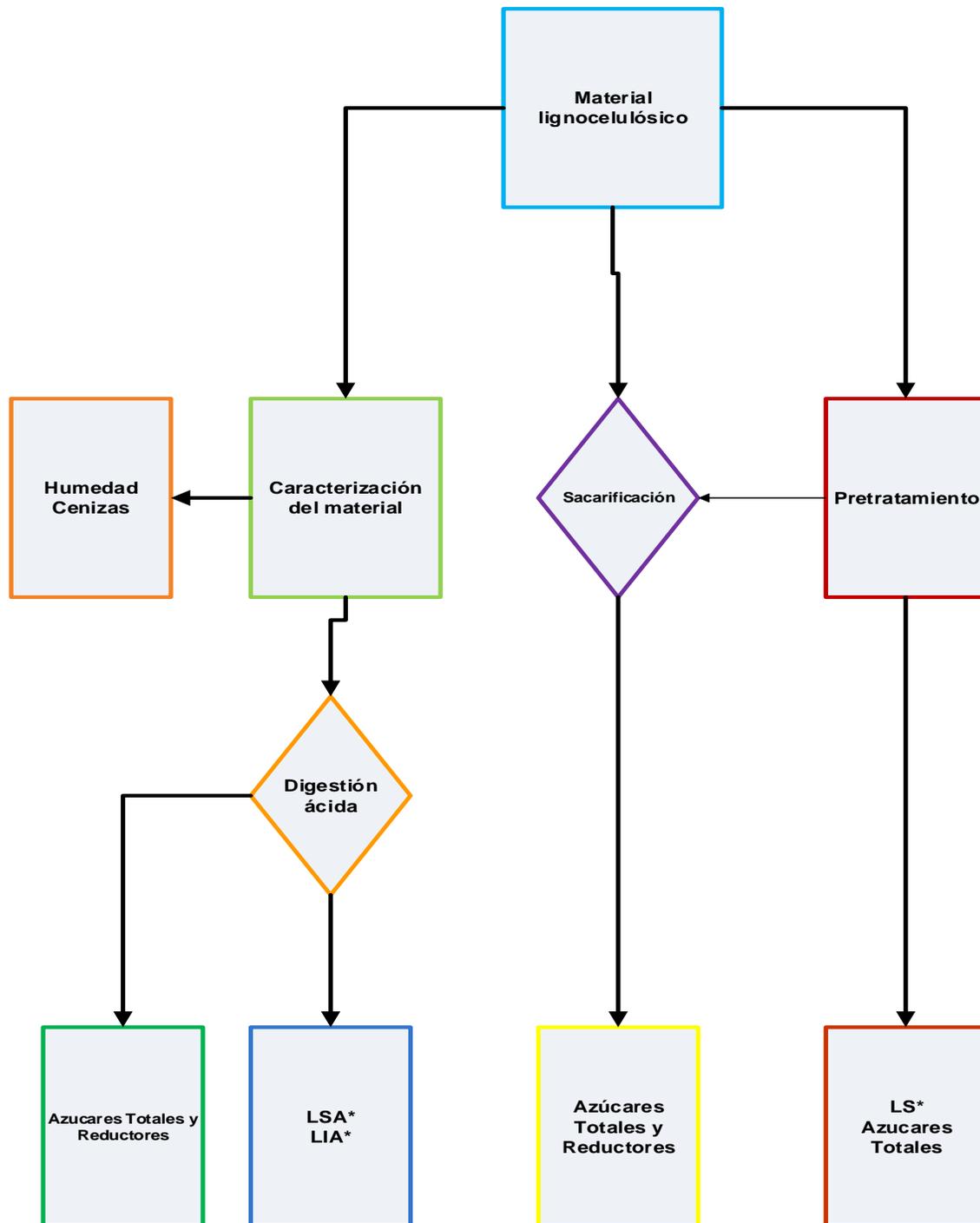
- 1) Evaluar el efecto de la sacarificación enzimática sobre los materiales sin pretratamiento con el coctel enzimático E7.
- 2) Evaluar el efecto del pretratamiento en la sacarificación de la biomasa utilizando una preparación enzimática comercial E7. Cuantificar la concentración de azúcares reductores y azúcares totales después del pretratamiento básico.
- 3) Evaluar el pretratamiento básico basado en la nixtamalización para residuos forestales de maderas de árbol de Hule y pino Apapaxco.
- 4) Diseñar una estrategia de pretratamiento básico en un reactor Parr de los residuos forestales antes mencionados y su posterior sacarificación.

Hipótesis.

La aplicación del pretratamiento utilizando cal comercial facilitará la deslignificación de los residuos forestales, lo que permitirá aumentar la disponibilidad de la celulosa y hemicelulosa a la sacarificación enzimática, por lo que la producción de azúcares reductores susceptibles a la fermentación será alta.

Metodología experimental.

Esquema experimental



*LSA: Lignina soluble en ácido *LIA: Lignina insoluble en ácido *LS: Lignina soluble

Caracterización del material lignocelulósico.

Para caracterizar los residuos lignocelulósicos se realizó una digestión ácida de la biomasa. Así, se determinó el contenido de azúcares totales (AT) y reductores (AR), lignina soluble en ácido (LSA), lignina insoluble en ácido (LIA) y se cuantificó la concentración de azúcares (glucosa, fructosa, celobiosa) presentes en el material mediante HPLC.

Determinación de humedad.

Las muestras de biomasa de residuos forestales de maderas son materiales higroscópicos que contienen grandes y variantes cantidades de humedad. El contenido de sólidos totales en la biomasa es la cantidad de sólidos remanentes después de que toda la materia volátil ha sido removida por calentamiento de la muestra a 105°C hasta alcanzar peso constante. Para ello se utilizó una termo balanza OHAIUS modelo MB45 en donde, en la charola de aluminio se colocó un mínimo 500 mg del material, distribuyendo de manera uniforme la muestra sobre la charola. Se inició el análisis y una vez que la muestra alcanzó peso constante, la determinación de humedad se obtiene automáticamente en el equipo.

Determinación de cenizas.

Para determinar cenizas de la biomasa, en un crisol a peso constante se agregaron de 3 a 5 g de muestra por analizar y se quemó lentamente hasta que ya no desprendió humos evitando que se proyecte fuera del crisol. Se tomó el crisol con pinzas para llevarlo a una mufla a 550°C durante 24h y efectuar la calcinación completa. Una vez frío se transfirió el crisol a un desecador para su completo enfriamiento y determinar el peso del crisol con cenizas.

Digestión ácida.

La cuantificación de lignina presente en la biomasa se determina indirectamente con el peso del residuo sólido remanente después de la hidrólisis completa de los

polisacáridos de dicho material. El material insoluble se forma por condensación de la lignina original en condiciones fuertemente ácidas utilizadas en la hidrólisis, mientras en el hidrolizado líquido se solubiliza una pequeña porción de lignina (lignano), la cual es determinada midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS. La lignina total está representada por la lignina soluble y la insoluble en ácido

Se colocaron tres filtros de crisol en una mufla a $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. Posteriormente se sacaron los filtros de la mufla e inmediatamente se colocaron en un desecador y se dejaron enfriar por aproximadamente 1 hora. A continuación se pesaron los filtros y se anotaron los valores. Posteriormente se pesaron aproximadamente 300 mg de muestra por triplicado en un matraz Erlenmeyer con tapón de rosca y se adicionó 3 ml de ácido sulfúrico al 72% a cada matraz. Se agitó hasta que el contenido del matraz estuvo completamente mezclado. Después se incubó el matraz en un baño de agua a 30°C por 60 minutos, asegurando de que el baño estuviera en agitación, ya que es necesario agitar cada 5 minutos los matraces sin remover del baño.

En seguida se sacaron los matraces del baño de agua y se diluyó el ácido al 4% adicionando 51 mL de agua destilada y se colocaron en una autoclave marca Yamato modelo SE510 a 121°C durante 1 hora. Una vez terminado el proceso en la autoclave, se permitió que los matraces alcanzaran la temperatura ambiente para posteriormente ser analizados.

Lignina insoluble en ácido.

Para determinar la lignina insoluble en ácido (LIA) se filtró con ayuda de vacío el contenido de los matraces con la muestras en filtros de crisol previamente pesados y se recuperó el filtrado en un matraz apropiado y se midió el volumen del mismo.

Luego se transfirió el filtrado a un recipiente para almacenar. Esta muestra se utilizó para determinar la LSA (en no más de 6 horas), así como azúcares totales, reductores y los carbohidratos estructurales.

A continuación se recuperaron todos los sólidos del matraz enjuagando con agua destilada, filtrando este contenido en el mismo filtro usado anteriormente (tomando precauciones de que el líquido filtrado no debe mezclarse con el obtenido en el paso anterior). Se enjuagaron los sólidos con un mínimo de 50 mL de agua destilada fresca y se colocó los filtros en una estufa a 105 °C hasta alcanzar peso constante (aproximadamente 4 horas). Se pasaron los filtros a un desecador para que se enfriaran a temperatura ambiente. Una vez fríos se pesaron y se registró este valor.

Con cuidado se sacaron los filtros de la mufla y se pasaron directamente a un desecador, dejando enfriar por el mismo periodo de tiempo utilizado para este propósito anteriormente. Se pesaron los filtros y se mantuvieron en la mufla hasta alcanzar peso constante. Este peso corresponde al residuo insoluble al ácido (RIA) de la biomasa original.

Lignina soluble en ácido.

La lignina soluble en ácido (LSA) debe determinarse en no más de 6 horas después de la digestión ácida (ya que puede existir un reacomodo en la estructura de la lignina). En un espectrofotómetro UV-vis marca Thermo Spectronic modelo Helios, empleando celdas de cuarzo, determinándose la absorbancia de la alícuota recuperada del filtrado proveniente de la caracterización usando agua destilada como blanco. A continuación se midió la absorbancia de la muestra a la longitud de onda recomendada de 240nm de acuerdo a los valores sugeridos para madera de *Pinus Radiata* de acuerdo a la técnica reportada en el NREL, ver Tabla 3 (Sluiter & B. Hames, 2008)

Tabla 3. Coeficientes de absorptividad y longitud de onda recomendada para diferentes materiales lignocelulósicos (Barrera, Aburto, & Gualo, 2013).

Biomasa	Lambda máx. (nm)	Absortividad a lambda máx. (L/gcm)	Longitud de onda recomendada (nm)	Absortividad a la longitud de onda recomendada (L/gcm)
<i>Pinus radiata</i>	198	25	240	12
Bagazo	198	40	240	25
Rastrojo de maíz	198	55	320	30
<i>Populus deltoides</i>	197	60	240	25

Para el cálculo de la LSA se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% LSA = \frac{UVabs * Volumen del filtrado * Dilución}{\epsilon * Peso de la biomasa sin humedad * Ancho de la celda} * 100$$

Donde,

UVabs = valor de la absorbancia de la muestra a 240 nm

Volumen del filtrado [=] L

ϵ = Absortividad de la biomasa a la longitud de onda específica = L/g * cm

Peso de la biomasa sin humedad [=] g

Ancho de la celda [=] cm

$$Dilución = \frac{Volumen de la muestra + Volumen de disolvente}{Volumen de la muestra}$$

Para el cálculo de la LIA se usó esta otra ecuación:

$$\% LIA = \frac{((\text{Peso del filtro con muestra} - \text{Peso del filtro sin muestra}) - (\text{Peso del filtro con cenizas} - \text{Peso del filtro}))}{(\text{Peso de la biomasa sin humedad})} * 100$$

$$\% RIA = \frac{\text{Peso del filtro con muestra} - \text{Peso del filtro sin muestra}}{\text{Peso de la biomasa sin humedad}} * 100$$

Lignina total.

Para determinar el contenido total de lignina, se sumó la lignina soluble y la lignina insoluble en ácido de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lignina total} = \% LSA + \% LIA$$

Azúcares totales.

Para la cuantificación de azúcares totales se utilizó el método de Fenol/Sulfúrico fundamentado en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas.

Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos (Sluiter & B. Hames, 2008). Los carbohidratos en presencia de un medio ácido, se hidrolizan y se deshidratan dando lugar a la formación de furfural y 5-hidroximetilfurfural que al reaccionar con el fenol forman los compuestos coloridos que pueden ser leídos en una longitud óptica específica. En el caso de las hexosas, el color de la reacción debe ser leído a una longitud de onda 490 nm.

En caso de ser necesario, se tomó el volumen pertinente de la muestra y se llevó a un volumen final de 1 mL con agua destilada, para diluir la muestra original y lograr que la absorbancia detectada se encuentre en el intervalo de la curva patrón previamente realizada. Se adicionó 1 mL de una solución de fenol al 5% (p/v), directamente en la muestra. Se mezcló y se adicionó en el centro del tubo 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, tapando el tubo y homogenizando cuidadosamente con un vortex. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 490 nm frente al blanco. Se calculó la concentración de azúcares presentes en la muestra a partir de una curva patrón preparado con anterioridad.

Azúcares reductores.

Para la cuantificación de azúcares reductores de acuerdo al método descrito en 1951 por Bernfeld, 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. El reactivo DNS reacciona para producir un compuesto de tonalidad amarilla y el ácido correspondiente al carbohidrato que actúo como agente reductor.

En caso de ser necesario tomar el volumen pertinente de la muestra y llevar a un volumen final de 1 mL con agua destilada, para diluir la muestra original y lograr que la absorbancia detectada se encuentre en el intervalo de la curva patrón. De no ser necesario se tomó 1 mL de la muestra acuosa y se adicionó 1 mL del reactivo de DNS y se calentó por 5 minutos en un baño de agua a ebullición, se dejó enfriar y se diluyó con 8 mL de agua destilada, homogenizando con el vortex.

Se midió la absorbancia a 540 nm frente a un blanco. Se cuantificó los azúcares reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva patrón.

Determinación de carbohidratos estructurales mediante HPLC.

Para la determinación de carbohidratos estructurales mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés) se utilizó el equipo marca Hewlett-Packard modelo 1100 con detector evaporativo de dispersión de luz marca Agilent Technologies modelo ELSD y equipado con una columna Pinnacle II Amino Column marca RESTEK con partículas esféricas de 5 micras. Tamaño de poro 100 Å, rango de pH 2.5-7.5 y límite de temperatura de 80 °C.

Tabla 4. Método de trabajo para la columna de HPLC y detección de azúcares.

Tipo de columna	Columna amino
Temperatura de la columna	30° C
Flujo	1.0 mL/min
Inyección	10µL
Temperatura del detector	80°C
Detector	Índice refractivo / Dispersión de luz
Proporción de disolventes	84% H ₂ O y 16% ACN
Presión máxima HPLC	200.0 bar
Presión detector	3.5 bar
Tiempo de corrida	35 min

Para un análisis se transfirió aproximadamente 20 mL de la alícuota recuperada de la hidrólisis ácida a un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Posteriormente se neutralizó la muestra con carbonato de calcio hasta alcanzar un pH entre 5-6. Una vez alcanzado éste, se permitió que la muestra sedimentara y se procedió a decantar el sobrenadante. El valor de pH que registró de aproximadamente fue 7.

Después se filtró la muestra con un filtro de 0.2 μm y se recuperó el filtrado en un vial para HPLC. Las condiciones de trabajo utilizadas en el laboratorio de Biocatálisis del IMP se enlistan en la Tabla 4. Se construyó una curva de calibración para cada analito (SRS y estándares de calibración) mediante una regresión lineal encontrar una la ecuación de la recta (Ver anexo D). Usando esta recta, se determinó la concentración en mg/mL de cada componente presente en la muestra.

Pretratamiento alcalino en reactor Parr.

Diseño de experimentos

Para el pretratamiento se consideraron modificaciones a las condiciones de reacción del proceso Kraft de producción de papel y la nixtamalización del maíz, las cuales se utilizaron para desarrollar el diseño de experimentos. Las condiciones de reacción que se utilizan en cada proceso se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de reacción para los procesos de nixtamalización y el proceso Kraft

Condición	Nixtamalización	Kraft
Cal (%)	1-3	10
Tiempo (h)	1	1-3
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$\approx 100^{\circ}\text{C}$	140-160
Presión (atm)	1	7
% solidos	≈ 50	$\approx 20-25$
Na_2S (%)	0	15-20

Se identificaron 3 variables independientes para el diseño del experimento (tiempo, temperatura y % cal) en relación a los procesos de nixtamalización y proceso Kraft. Se omitió el uso de Na_2S ya que es un compuesto altamente tóxico y contaminante, además de que representa un problema el separar las sales insolubles de sulfatos producidos durante el pretratamiento de la madera. El dominio experimental se propuso de acuerdo a las condiciones de reacción de la nixtamalización y el proceso Kraft utilizando únicamente cal viva y con un porcentaje de sólidos del 10%. Las condiciones de reacción utilizadas en el dominio experimental para el pretratamiento básico se muestran en la Tabla 6. Como variables de respuesta se medirán los azúcares totales y la lignina soluble.

Tabla 6. Codificación del dominio experimental para el diseño de experimentos.

Variable independiente	1	0	-1
Temperatura [°C]	140	117	93
Tiempo [h]	3	2	1
CaO [%]	10	5	1

Se utilizó el software STATISTICA V.10 para obtener un diseño de experimentos factorial (2^n) con tres niveles donde arrojó 8 experimento únicos (sin repeticiones) con 3 puntos centrales, para determinar el error experimental, dando así un total de 11 experimentos (Tabla 7).

Tabla 7. Dominio experimental del pretratamiento básico.

Experimento	Temperatura(°C)	Tiempo (h)	[CaO] (%)
8	1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
10 ©	0	0	0
11 ©	0	0	0
4	-1	1	1
3	-1	1	-1
9 ©	0	0	0
1	-1	-1	-1
7	1	1	-1
2	-1	-1	1

Preparación del reactor y software

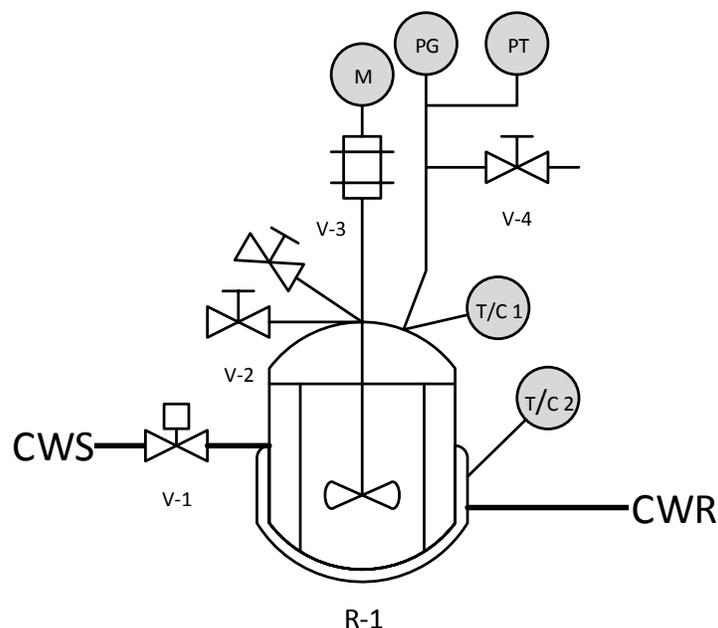
Para llevar a cabo el pretratamiento de la biomasa se utilizó un reactor Parr de acero inoxidable tipo 316 de 100 mL de capacidad, diseñados para una presión máxima de trabajo de 3000 psi. La temperatura máxima de operación hasta 350°C; equipados con válvulas de entrada y salida de gas, una válvula de muestreo de líquido, manómetro, disco de ruptura de seguridad, y termopar

interno, además del agitador interno (ver anexo E). Este tipo de reactor cuenta con un contenedor de teflón de 70mL de volumen útil (Figura 7). Para este trabajo, se manejó a un volumen disponible de 50 mL.



Figura 7. Vaso de PTFE utilizado y reactor Parr de acero inoxidable con sistema controlador remoto (Parr, 2013).

En cada pretratamiento se decidió utilizar una cantidad significativa de biomasa con el propósito de tener biomasa suficiente para la etapa subsecuente de sacarificación enzimática, limitándose a las dimensiones del vaso del reactor, además de que aumenta la cantidad de la solución alcalina permitiendo alcanzar mayores presiones autógenas al interior del reactor. El esquema de los componentes del reactor Parr se muestra a continuación:



M: Motor.

V1: Válvula Solenoide.

V2: Válvula de alimentación.

V3: Válvula de escape.

V4: Válvula de seguridad.

PG: Manómetro.

PT: Transmisor de presión.

TC1: Termopar interior.

TC2: Termopar chaqueta de calentamiento.

CWS: Entrada agua fría.

CWR: Retorno agua fría.

Se pesó 0.5 g de biomasa para obtener una relación de sólidos al 10% con un volumen de 4.5 mL de agua destilada y se introdujo en un contenedor de teflón. El vaso de PTFE se utilizó con el fin de evitar problemas de corrosión en el vaso de acero inoxidable pero éste no evita que los vapores corrosivos lleguen a la superficie del cilindro y la cabeza, pero hace que sea mucho más fácil agregar y retirar los reactivos líquidos, y da una cierta protección al cilindro cuando se trabaja con soluciones corrosivas. Cabe señalar, sin embargo, que la adición de un revestimiento de PTFE retrasará la velocidad de transferencia de calor dentro y fuera del recipiente, y puede ser necesario ajustar el método de control de temperatura para evitar el sobrecalentamiento.

Posteriormente se le agregó el peso en cal correspondiente al experimento, verificando que la mezcla sea homogénea. Inmediatamente se introdujo en el vaso de acero inoxidable del reactor y se selló herméticamente, a continuación se prosiguió a programar la secuencia de reacción en el software Hybrid Control Desing para determinar la temperatura de calentamiento y el tiempo de reacción como se muestra en la Tabla 8. Para todos los experimentos se programó una agitación de 200 rpm.

Tabla 8. Secuencia de condiciones de operación del reactor para el pretratamiento básico para el diseño de experimentos.

Perfil de calentamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Rampa	93-117-140	30-45
Meseta	93-117-140	60-120-180
Rampa	25	30-45
Meseta	25	0.1

Se monitoreó el progreso de la reacción (temperatura, presión y tiempo) para todos los experimentos y se controló la temperatura de la chaqueta de calentamiento con el PDI integrado en el software Spec View 2.0. Con los datos recopilados por el software se realizó el perfil de temperatura y presión como se muestra en las Figuras 8 y 9.

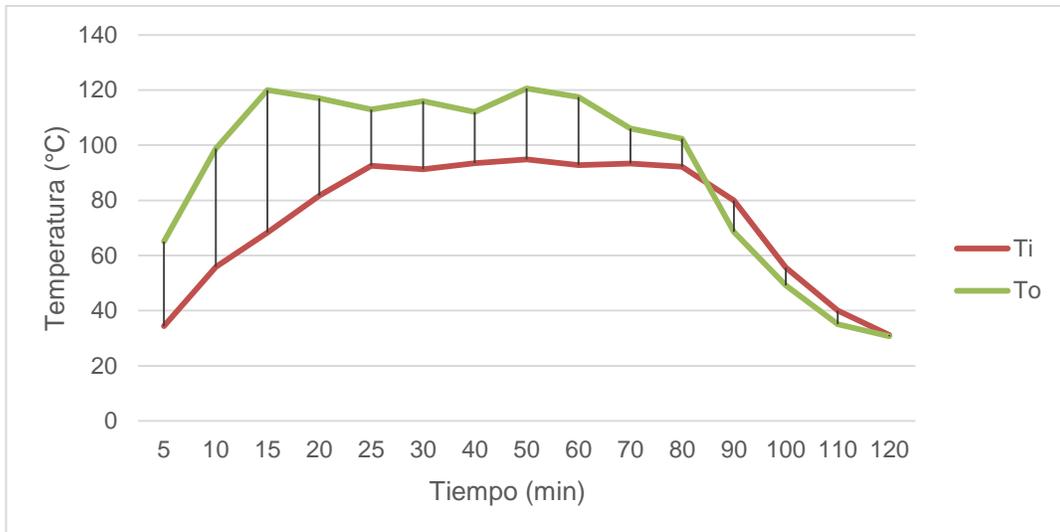


Figura 8. Perfil de temperatura durante el pretratamiento alcalino.

*Ti: temperatura dentro del reactor

*To: temperatura de la pared de la chaqueta de calentamiento.

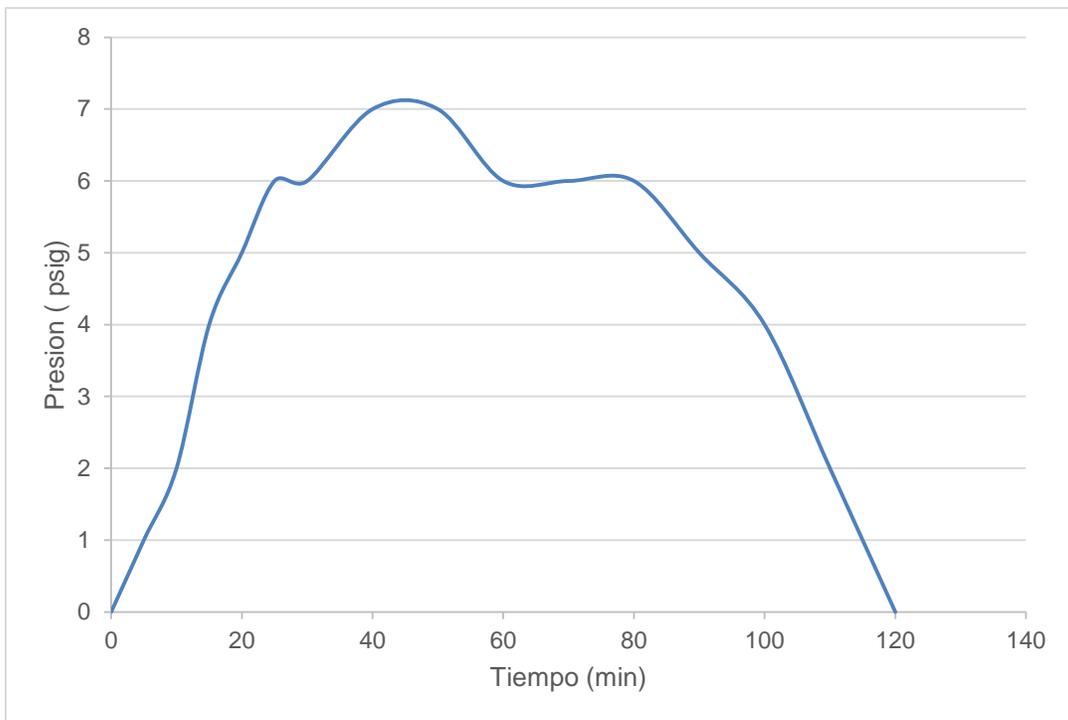


Figura 9. Perfil de presión autógena dentro del reactor.

El porcentaje de apertura de la válvula solenoide para el agua de enfriamiento y el porcentaje de calentamiento para la chaqueta (Figura 10) fueron controlados automáticamente por el software del equipo fijando como objetivo el set point de temperatura con una desviación de 1°C para amortiguar el cambio de temperatura de acuerdo a las condiciones de cada experimento del pretratamiento alcalino y de acuerdo al patrón de calentamiento anteriormente programado.

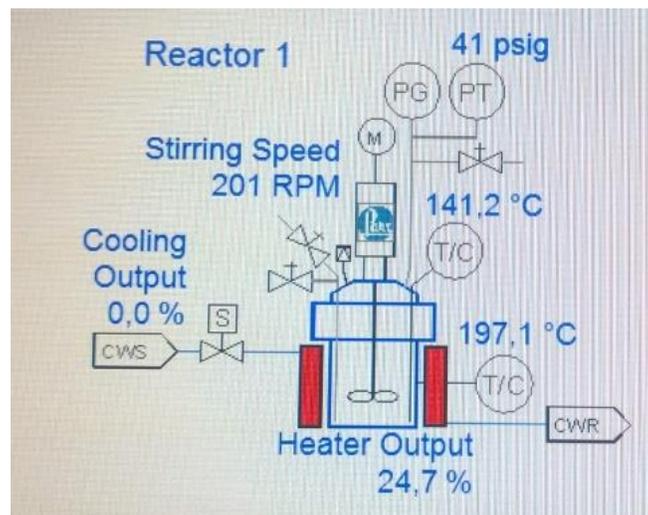


Figura 10. Representación gráfica del esquema del reactor en donde se muestra el porcentaje de apertura para el Cooling Output y el Heater Output y las condiciones de temperatura y presión.

Al finalizar la reacción se retiró el material pretratado en viales de vidrio. Posteriormente se separó el líquido mediante filtración al vacío para determinación de lignina soluble y determinación de azúcares totales. A la biomasa recuperada se le determinó humedad y se lavó con buffer de citratos 1M para ajustar el pH a 4.8 para su posterior hidrólisis enzimática.

Sacarificación enzimática

Sacarificación enzimática sin pretratamiento de hule y apapaxco con cocteles enzimáticos E7

Para la etapa de hidrólisis enzimática, se utilizó el cóctel enzimático comercial denominado E7. Este coctel enzimático contiene principalmente enzimas xilanasas, celulasas, endo y exo glucanasas y así como, β -glucosidasas, que trabajan sinérgicamente para desdoblar la celulosa y hemicelulosa contenida en el material lignocelulósico.

En 3 viales de 4 mL, se pesaron por separado alrededor 25 mg de biomasa sin pretratar. Posteriormente, se agregó una solución de buffer de citratos (50 mM, pH 4.8) correspondiente a un volumen del 95% en peso (base seca del 5%) de la biomasa con el propósito de asegurar el pH adecuado para la acción de las enzimas. Una vez agregada la solución buffer, el vial cerrado se colocó en un equipo de agitación Marca Buchi modelo Syncore Q-101 y se dejó reposar durante 5 minutos a una temperatura de 50°C para ambientar la mezcla a las condiciones adecuadas para la posterior adición de la enzima.

Posteriormente, se agregó la enzima E7 en cada vial con una relación del 0.9mL/g de biomasa. La reacción se mantuvo durante 1 hora a 50°C y 180 rpm. Finalmente y transcurrido el tiempo de reacción, cada vial se colocó en un baño de agua a ebullición por 5 min con el propósito de inactivar la enzima. El proceso de sacarificación se observa en el diagrama de la Figura 11.

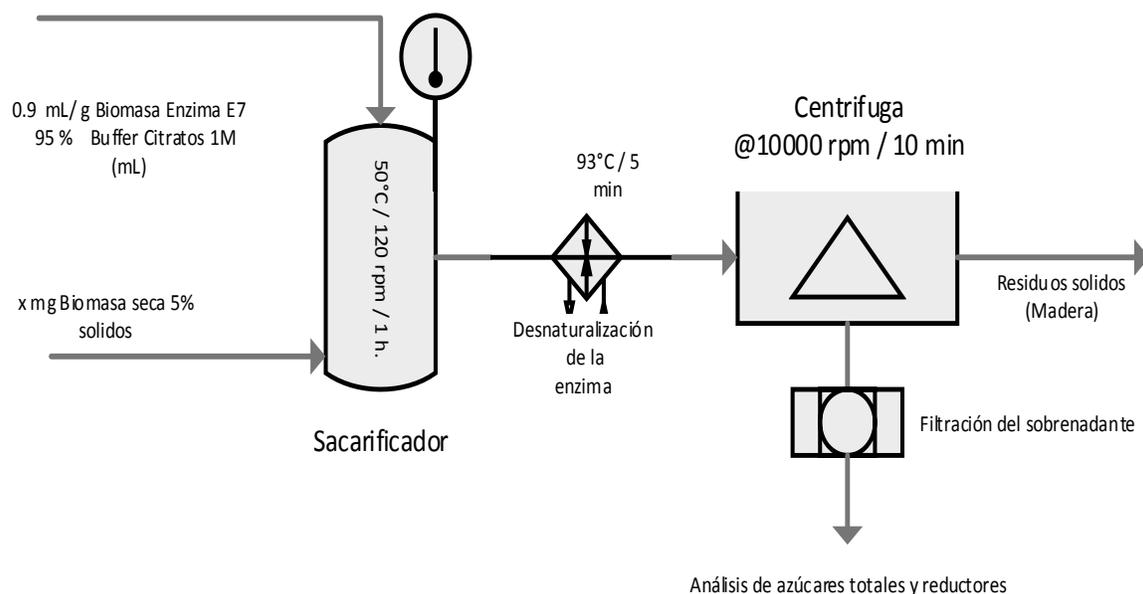


Figura 11. Esquema de la hidrólisis enzimática sin pretratamiento.

Una vez efectuada la hidrólisis enzimática y desactivadas las enzimas, la mezcla de reacción se lavó con 2 mL de agua destilada y se trasladaron a tubos Eppendorf para centrifugarlas, y así poder recuperar el sobrenadante de la hidrólisis enzimática. De esta manera, al jarabe obtenido se le determinó azúcares totales, reductores y se realizó la identificación de azúcares mediante HPLC

Sacarificación enzimática con pretratamiento de hule y apapaxco.

Una vez realizado el pretratamiento cada madera se acondicionó para la hidrólisis enzimática, se utilizó buffer de citratos 1 M para ajustar el pH a 4.8 debido a que el pH del material después del pretratamiento alcalino de cada experimento resultó aproximadamente de 10-13 ya que existían restos de cal embebidos en la madera. Después se midió el contenido de humedad en cada una de las muestras para adecuar las condiciones de reacción.

En viales de vidrio, se pesaron por separado la cantidad del material correspondiente al peso seco al utilizado en la sacarificación enzimática sin pretratamiento. Posteriormente, se agregó una disolución de buffer de citratos (1M, pH 4.8) correspondiente a un volumen del 95% en peso (base seca del 5%) de la biomasa con el propósito de asegurar el pH adecuado para la acción de las enzimas. Una vez agregada la solución buffer, el vial cerrado se colocó en un equipo de agitación constante Marca Buchi modelo Syncore Q-101 y se dejó reposar durante 5 minutos a una temperatura de 50°C para ambientar la mezcla a las condiciones adecuadas para la posterior adición de la enzima.

Posteriormente, se agregó la enzima E7 en cada vial con una dosificación de 0.9 mL/g biomasa con respecto al peso seco de la biomasa. La reacción se mantuvo durante 1 hora a 50°C. Finalmente y transcurrido el tiempo de reacción, a cada vial se inactivó el cóctel enzimático como se describió anteriormente. Posteriormente la mezcla de reacción se lavó con 2 mL de agua destilada y se trasvasaron a tubos Eppendorf para centrifugarlas a 12000 rpm durante 10 minutos, y así poder recuperar el líquido sobrenadante. De esta manera, al líquido obtenido se le determinó azúcares totales, reductores.

Resultados y discusión.

Caracterización del material.

Con anterioridad se realizó un lavado de los materiales para detectar si existían azúcares presentes antes de la digestión ácida, debido al proceso de trituración que recibieron. Los resultados nos indican que no se detectaron azúcares en las aguas de lavado para ninguna de las dos maderas utilizadas. Posteriormente se le determinó el contenido de humedad y cenizas, para después realizar la digestión ácida. Los resultados mostrados en la tabla 9 para los residuos forestales concuerdan con lo esperado para maderas suaves debido al alto contenido de lignina y azúcares.

Tabla 9. Resultados de los residuos de hule y Apapaxco después de la caracterización mediante digestión ácida.

Material	AT (%)	AR (%)	LSA (%)	LIA (%)	Lignina total (%)	Cenizas (%)	Humedad (%)	Relación AT/LT
Hule	58.84 ± 0.15	58.68 ± 0.01	7.49 ± 0.02	28.64 ± 0.28	36.13	0.61 ± 0.34	6.37 ± 0.08	1.63
Apapaxco	66.00 ± 0.01	43 ± 0.01	1.80 ± 0.01	44.60 ± 0.338	46.40	0.72 ± 0.64	6.70 ± 0.14	1.42

Barrido para perfil de lignina soluble.

Para determinar la cantidad de lignina soluble se comparó el perfil de absorbancia de la madera de hule y Apapaxco, con el estándar de pino Ixtlan (conocido por el grupo de investigación), ello para seleccionar la longitud de onda adecuada para cuantificar la lignina soluble. Se observó que los perfiles del espectro son similares (Figura 12 y 13) debido a que la madera de hule y Apapaxco se catalogan con maderas blandas al igual que el pino Ixtlán porque presentan un contenido similar

en la composición de lignina total, celulosa, hemicelulosa. Así, la concentración de lignina soluble se determinó a una longitud de onda de 240 nm, valor recomendado para el pino Ixtlán y NREL para maderas blandas (Barrera, Aburto, & Gualo, 2013).

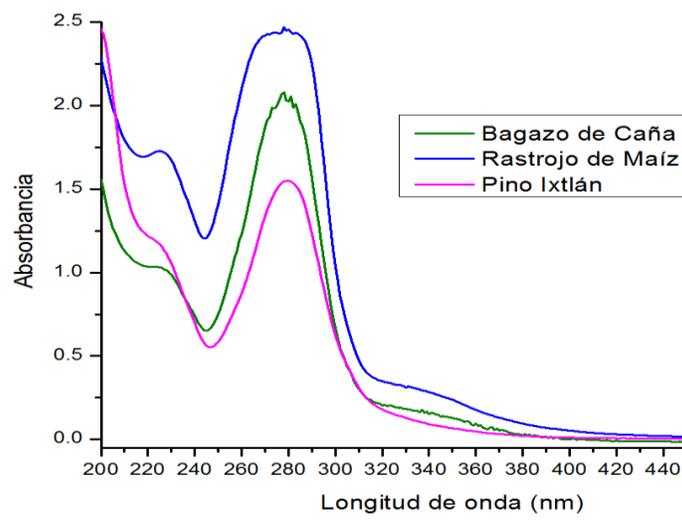


Figura 12. Espectro de UV-vis de lignina soluble a diferente longitud de onda para diferentes materiales lignocelulósicos.

Se puede observar en la Figura 13, que los espectros de UV-vis para los residuos de hule y Apapaxco presentan bandas de absorción similares a una longitud de onda de 240 nm, correspondiente a compuestos provenientes de la lignina soluble y furfurales.

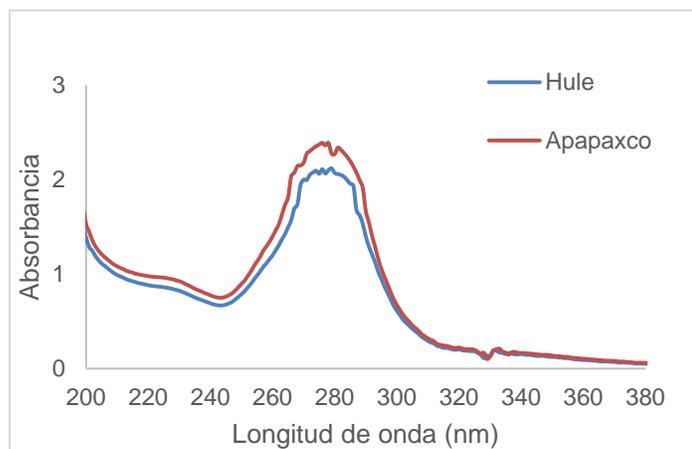


Figura 13 Espectro UV-vis a para LSA de hule y Apapaxco después de la digestión ácida.

Determinación de HPLC

La composición y contenido de azúcares en los jarabes resultantes de la digestión ácida se determinaron utilizando un Cromatógrafo de Líquidos de alta resolución (HPLC). En la madera de hule y Apapaxco se identificó la presencia de glucosa y xilosa (Tabla 10).

Tabla 10. Perfil de azúcares de la caracterización de los residuos de maderas forestales mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados muestran los azúcares formados luego de la caracterización de los materiales.

Analito	Glucosa (%)	Xilosa (%)	Glucosa + Xilosa (%)
Apapaxco	37.02	2.42	39.44
Hule	45.21	3.32	48.53

Se puede observar que se detecta una mayor cantidad de glucosa proveniente de la digestión ácida de los residuos forestales y no existen rastros de celobiosa, lo que indica que el polímero de celulosa fue completamente hidrolizado en el medio ácido. La cantidad de azúcares totales y reductores detectados mediante HPLC es menor que aquella determinada mediante la técnica de fenol-sulfúrico y DNS debido a la sensibilidad del equipo

Pretratamiento

Durante el pretratamiento alcalino las primeras reacciones que toman lugar son la solvatación (reacción de hidratación de la cal) y saponificación. Esto causa un estado de hinchamiento en la biomasa y la hace más accesible al ataque enzimático. El pretratamiento básico con CaO además puede causar la solubilización, redistribución y condensación de la lignina y modificar la cristalinidad de la celulosa.

El pretratamiento de los residuos de forestales de hule y Apapaxco resultó en la obtención de un líquido color amarillo transparente con un bajo contenido de lignina soluble y una pasta sólida blanca (residuos de cal) en la madera lo que dificultó la recuperación de la cal como material insoluble presentando problemas en la subsecuente etapa de sacarificación.

Con el propósito de determinar las condiciones adecuadas para el pretratamiento, se evaluó el diseño de experimentos factorial completo 2^3 , de 3 factores. 2 niveles y 3 puntos central para estimar el error experimental.

El dominio experimental se fijó variando los parámetros de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), tiempo (h) y concentración de CaO (%) usando como referencia los procesos de nixtamalización y el proceso Kraft, teniendo como variables de respuesta la concentración de azúcares totales (% p/p) y la concentración de lignina soluble (% p/p) después del pretratamiento (tabla 11), así como el efecto en la generación de azúcares totales y reductores en la sacarificación enzimática posterior.

Tabla 11. Dominio experimental del pretratamiento básico y resultados de concentración de azúcares totales y lignina soluble obtenidos después del pretratamiento de las maderas de Apapaxco y Hule.

Diseño de Experimentos				Pretratamiento			
Experimento	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (h)	[CaO] (%)	%ATp Apapaxco	% Atp Hule	%LS Apapaxco	% LS Hule
8	140	3	10	1,24	11,52	0,36	1,05
5	140	1	1	3,97	6,78	0,56	0,69
6	140	1	10	2,53	17,47	0,63	1,07
10 ©	117	2	5	4,61	5,72	0,82	0,56
11 ©	117	2	5	4,79	5,61	0,82	0,72
4	93	3	10	3,07	5,51	0,69	0,56
3	93	3	1	4,13	16,25	0,70	0,98
9 ©	117	2	5	4,68	5,41	0,71	0,77
1	93	1	1	2,76	13,62	0,68	1,20

7	140	3	1	1,87	9,74	0,24	0,44
2	93	1	10	1,63	4,89	0,28	0,79

Se analizaron los resultados obtenidos con el software STATISTICA v. 10 para evaluar el efecto de las variables independientes sobre las variables de respuesta con el propósito establecer las condiciones adecuadas del pretratamiento y determinar qué factores influyen positivamente en la generación de azúcares reductores durante la posterior sacarificación enzimática con E7. El dominio experimental se fijó variando los parámetros de temperatura (°C), tiempo (h) y concentración de CaO (%) teniendo como referencia los procesos de nixtamalización y el proceso Kraft.

En el análisis de resultados se realizó un modelo cúbico de triple interacción para cada variable de respuesta (ver Anexo A y B) los cuales pueden ser representados gráficamente por un cubo (Figura 14 y 15).

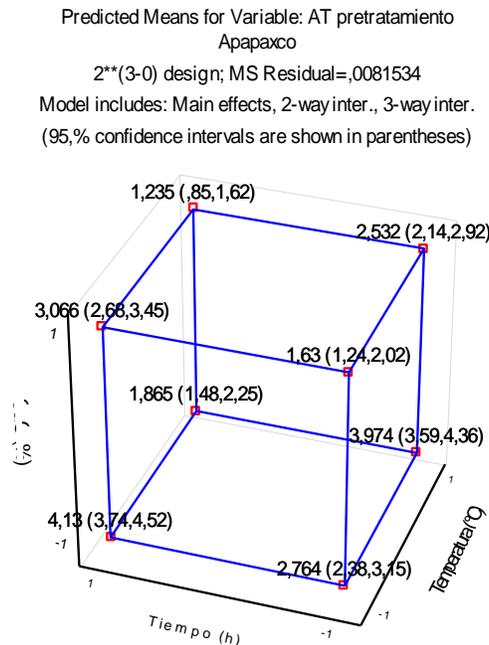


Figura 14. Representación esquemática del modelo 2^3 con triple interacción para azúcares totales para madera de Apapaxco.

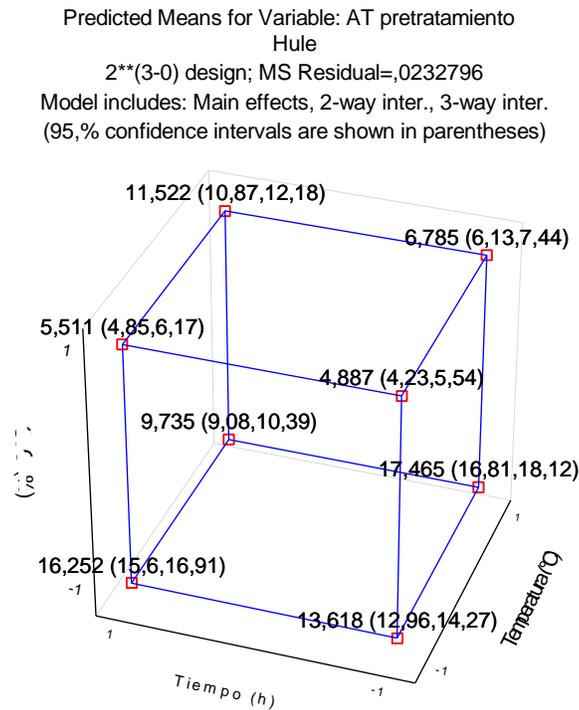


Figura 15. Representación esquemática del modelo 2^3 con triple interacción para azúcares totales para madera de Hule.

El diseño de experimentos solamente es válido dentro del dominio de las variables codificadas (-1,1) para la evaluación de los factores X_1 = temperatura (°C), X_2 = tiempo (h) y X_3 = CaO (%) sobre la generación de azúcares totales y en la solubilización de la lignina después del pretratamiento de los residuos de Hule y Apapaxco. Así, se generaron las gráficas correspondientes al modelo con triple interacción ($y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \beta_{123} \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3$) y se obtuvieron los coeficientes de regresión (Tabla 12).

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) del modelo de triple interacción de cada biomasa se encuentran en el anexo A y B. El efecto de las variables independientes sobre la concentración de azúcares totales se analizó con un intervalo de confianza del 95%.

Con el diseño de experimentos se seleccionaron las mejores condiciones del pretratamiento, en donde se favoreció la formación de azúcares totales y la solubilización de lignina. La efectividad del pretratamiento fue determinada mediante la cuantificación de azúcares totales y la medición de lignina soluble después del pretratamiento, debido a que la remoción de lignina favorece la sacarificación. A su vez también se analizaron los resultados de la sacarificación enzimática con E7 posterior al pretratamiento para ambos materiales.

En la tabla 12, se muestran los coeficientes de regresión que indican el efecto de cada variable independiente sobre la concentración de azúcares totales, podemos observar que las variables independientes que tienen un efecto significativo sobre la cantidad de azúcares totales producidos después del pretratamiento son la temperatura, la concentración de CaO, la interacción de temperatura con el tiempo de reacción, la interacción de temperatura con la concentración de CaO, la interacción de tiempo de reacción con la concentración de CaO y finalmente la triple interacción de las 3 variables independientes. Sin embargo, se encuentra que la variable con mayor influencia sobre la generación de azúcares totales es la concentración de CaO ya que presenta un efecto negativo por sí sola, pero con la interacción entre temperatura y tiempo de reacción, así como, la triple interacción presenta un efecto positivo sobre la generación de azúcares para los dos materiales, pero tiene un impacto mayor sobre la madera de hule.

Tabla 12. Coeficientes de correlación del modelo $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{123}x_1x_2x_3$ con un 95% de confianza para azúcares totales generados en el pretratamiento. En color rojo se encuentran los factores que tienen un efecto significativo sobre la respuesta.

Coeficiente	[Apapaxco] (% p/p)	[Hule] (% p/p)
β_0	2.649455	10.72175
β_1	-0.248009	0.65493
β_2	-0.075339	0.03315
β_3	-0.533849	-3.54565
β_{12}	-0.775872	-0.78132
β_{13}	0.015743	1.32215
β_{23}	0.110342	1.30705
β_{123}	0.092581	1.80965
$X_1 = \text{Temperatura } (^{\circ}\text{C}), X_2 = \text{Tiempo (h)}, X_3 = [\text{CaO}] (\%)$		

En el pretratamiento básico de la madera de Apapaxco, las variables que tienen un efecto significativo sobre la concentración de azúcares totales son la temperatura, la concentración de CaO y la interacción de la temperatura con el tiempo de reacción, siendo la interacción temperatura-tiempo de reacción la que mayor influencia presenta sobre la variable de respuesta.

Para el caso de la madera de hule, las variables que presentan un efecto significativo sobre la concentración de azúcares totales son la temperatura, la concentración de CaO, la interacción entre las 3 variables independientes y

finalmente la triple interacción de los parámetros. La triple interacción tiene mayor influencia sobre la concentración de azúcares totales producidos (Tabla 12).

En el Gráfico 1, se observa que la concentración de azúcares totales del pretratamiento de la madera de Apapaxco aumenta al incrementar la temperatura y disminuir el tiempo o al incrementar el tiempo y disminuir la temperatura. La mayor cantidad de azúcares totales obtenidos fue de 4.79 % utilizando 5% (p /p) de concentración de CaO a 117 °C durante 2 horas de tiempo de reacción (Tabla 11).

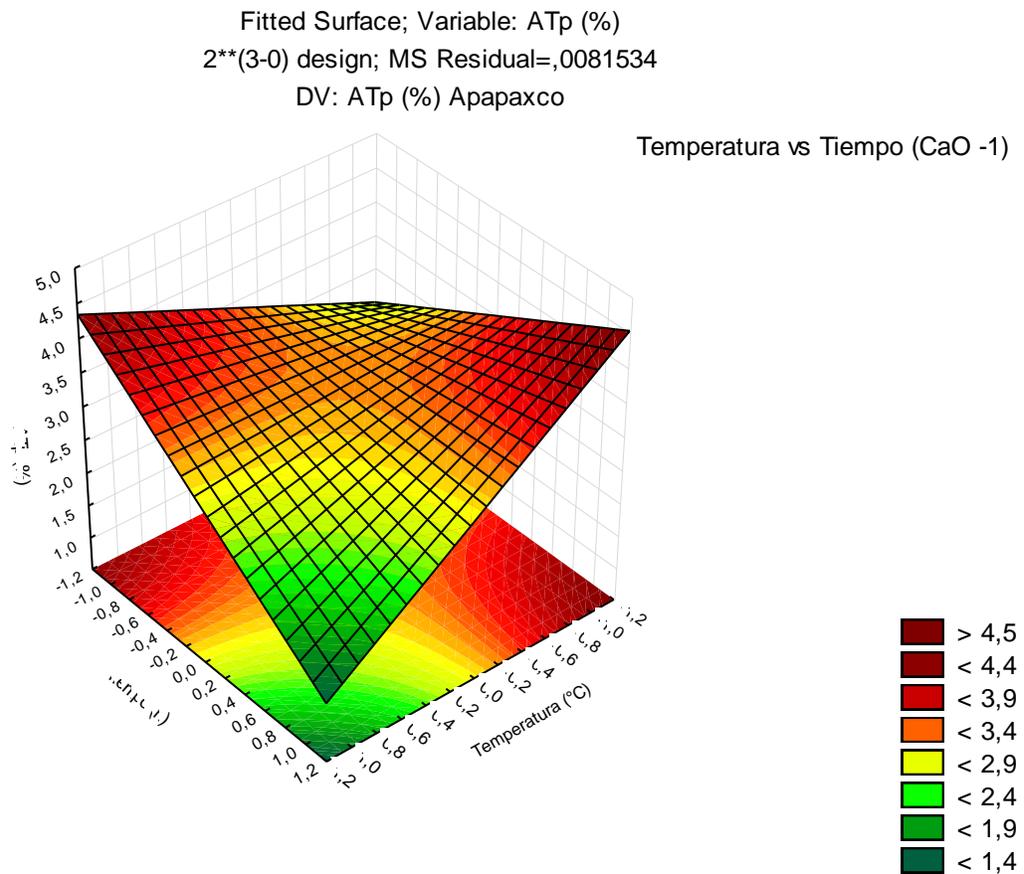


Gráfico 1. Efecto del pretratamiento básico de la madera de Apapaxco sobre el contenido de azúcares totales (% p/p) a una concentración de 5% de CaO

En el pretratamiento de la madera de Apapaxco, se observa la mayor solubilización de lignina soluble se incrementa conforme aumenta la temperatura la temperatura y disminuye el tiempo de reacción y viceversa. (Gráfico 2). La mayor concentración de lignina soluble obtenida después del pretratamiento fue de 0.82 % (p/p) ocurre a 117°C de temperatura durante un tiempo de reacción de 2 horas al 5% de CaO que corresponde a las condiciones en donde se obtuvo la mayor concentración de azúcares totales (Tabla 11).

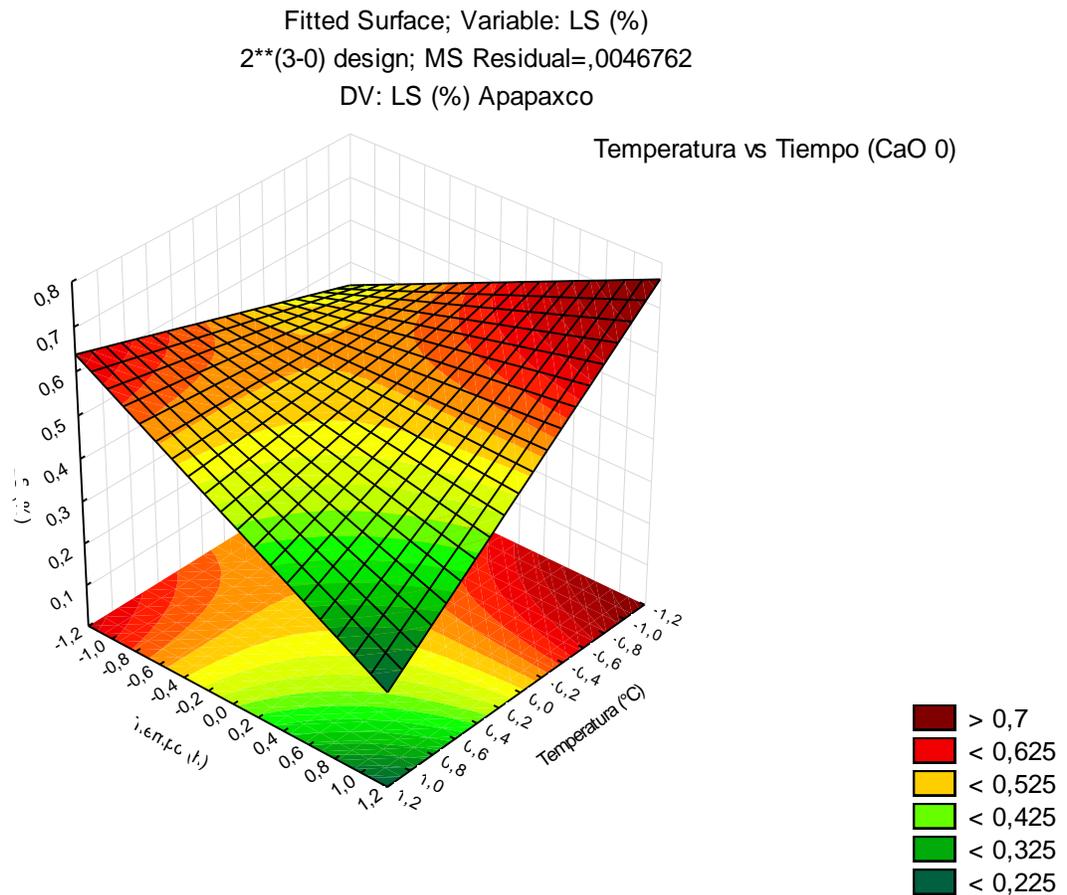


Gráfico 2. Efecto del pretratamiento básico de la madera de Apapaxco sobre el contenido de lignina soluble (% p/p) a una concentración de 5% de CaO.

Para el caso del pretratamiento de madera de Hule en el Gráfico 3, se observa que la concentración de azúcares totales del pretratamiento de la madera de Hule aumenta al incrementar la temperatura y disminuir la concentración de CaO. La mayor cantidad de azúcares totales obtenidos fue de 17.47 % utilizando 10 % (p/p) de concentración de CaO a 140 °C durante 1 horas de tiempo de reacción (Tabla 11).

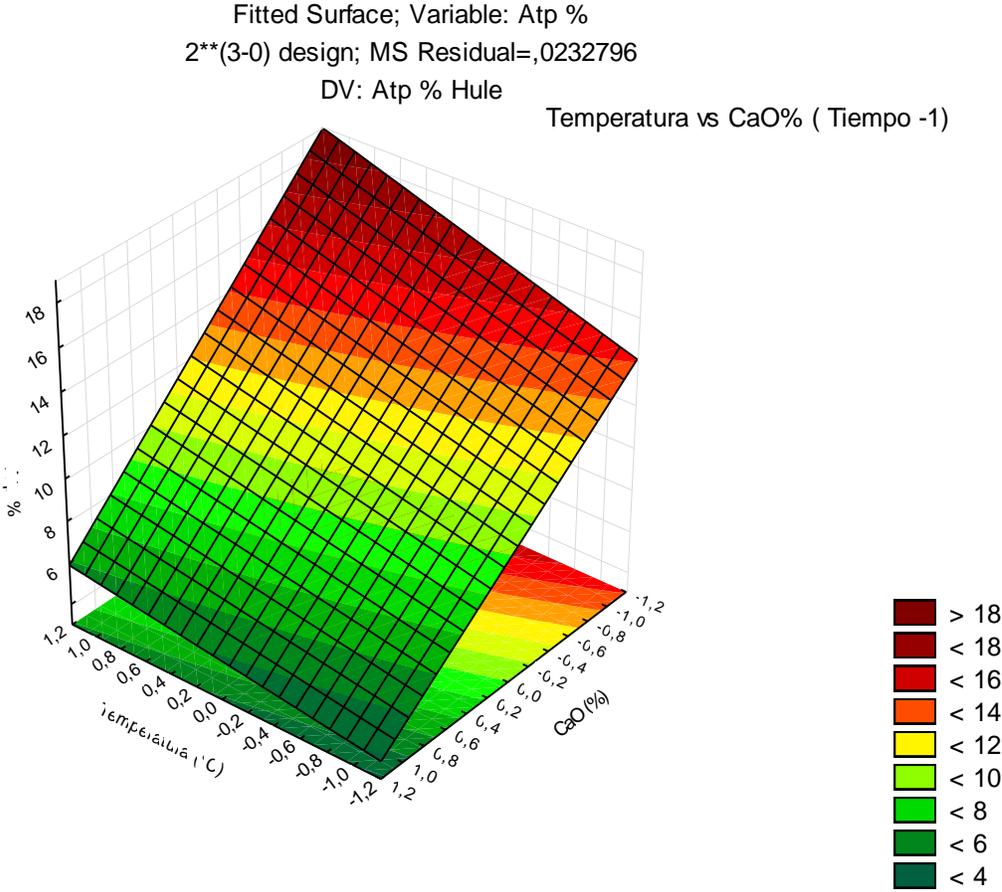


Gráfico 3. Efecto del pretratamiento básico de la madera de Hule sobre el contenido de azúcares totales (% p/p) a un tiempo de reacción de 1 hora.

En el pretratamiento de la madera de Hule, se observa que la mayor solubilización de lignina soluble se incrementa conforme disminuye la temperatura y disminuye el tiempo de reacción. (Gráfico 4). La mayor concentración de lignina soluble obtenida después del pretratamiento fue de 1.20 % (p/p) ocurre a 93°C de temperatura durante un tiempo de reacción de 1 hora al 1% de CaO que corresponde a las condiciones en donde se obtuvo la mayor concentración de azúcares totales (Tabla 11).

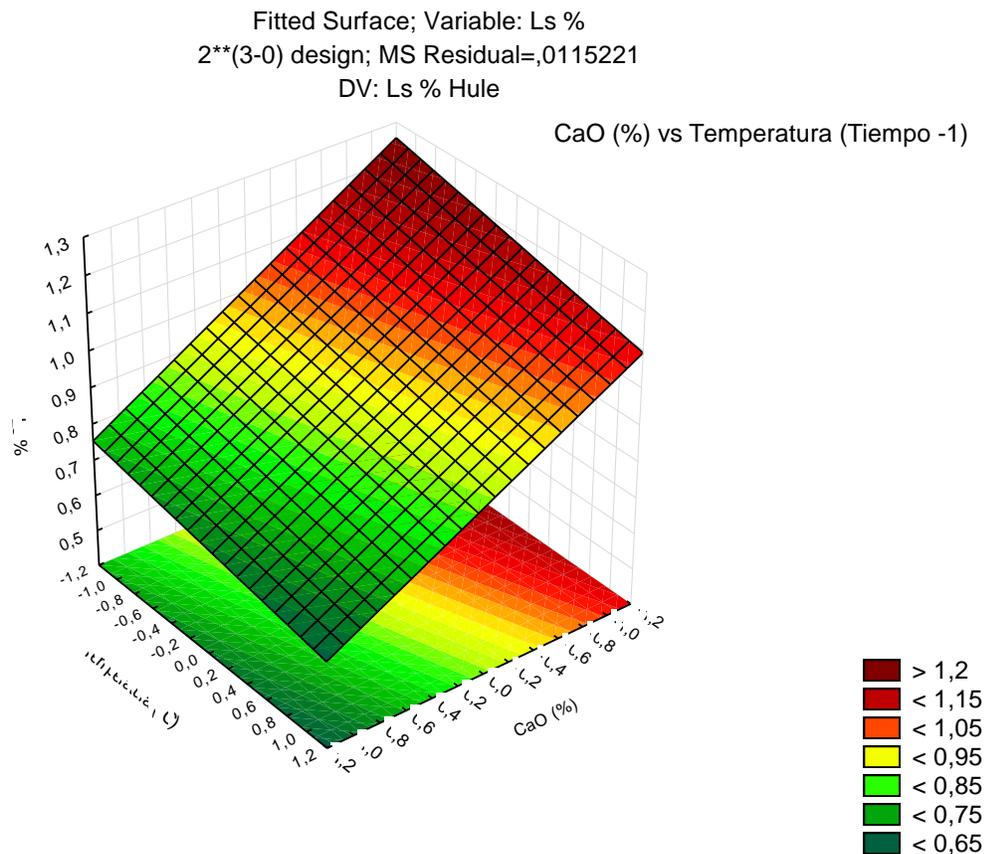


Gráfico 4. Efecto del pretratamiento básico de la madera de Hule sobre el contenido de lignina soluble (% p/p) a un tiempo de reacción de 1 hora.

Con los resultados obtenidos del diseño de experimentos se seleccionaron las mejores condiciones experimentales para realizar el pretratamiento básico (Tabla 13). Los factores experimentales que favorecen la solubilización de lignina y por

consiguiente la generación de azúcares totales son la concentración de cal y la temperatura, en tanto que se requiere una mayor temperatura para la madera de Apapaxco que para la madera de Hule, mientras que se necesita incrementar la concentración de CaO para los experimentos de Hule en comparación de los realizados con Apapaxco.

Tabla 13. Condiciones experimentales del pretratamiento básico que favorecen la solubilización de lignina y generación de azúcares totales de los residuos forestales.

Biomasa	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	[CaO] (% p/p)	Azúcares totales (%p/p)	Lignina soluble (%p/p)
Apapaxco	117	2	5	4.79 ± 0.09	0.82 ± 0.01
Hule	93	1	1	13.63 ± 0.07	1.20 ± 0.01

Para comprobar la idoneidad del modelo se realizó un análisis de residuos, para lo cual se examinaron las gráficas de probabilidad normal, una gráfica de residuos contra los valores ajustados y una gráfica de los residuos contra cada variable de regresión (Anexo A y B). Las gráficas de probabilidad normal presentan una distribución de los errores normal, con tendencia a una línea recta, al igual que la gráfica de valores predichos contra valores observados; mientras que las gráficas de los residuos contra los valores predichos muestran suposiciones satisfactorias al no tener los residuos algún patrón.

El contenido de azúcares reductores y totales obtenidos en el pretratamiento básico resultó ser más alto en la madera de hule (Tabla 13). Sin embargo, esto no significa que el pretratamiento básico es más efectivo ya que la lignina soluble es

menor en el pretratamiento con respecto a la digestión ácida (Tabla 11), lo que significa que la digestión ácida permite una mayor ruptura del enlace lignina / carbohidrato.

Es importante hacer notar que durante el pretratamiento alcalino, ocurre la solubilización, redistribución, y condensación de la lignina; así como la modificación del estado cristalino de la celulosa, que puede resultar en la disminución de los efectos positivos de la remoción de lignina (Chang , Nagwani, Kim, C, & Holtzaple, 2001), como se observa en los resultados obtenidos para lignina soluble de ambos materiales, existe una pequeña porción de la lignina total que se solubiliza después de la aplicación del pretratamiento básico.

De acuerdo con Karr y Holtzaple (2000) el pretratamiento con cal (y calentamiento) es suficiente para incrementar la digestibilidad de biomasa con bajo contenido de lignina, pero no para materiales con un alto contenido de la misma. Chang et al. (2001) menciona que el pretratamiento con cal funciona correctamente en pastos y rastrojos de maíz sin embargo para maderas suaves con alto contenido de lignina solo se encontró que este pretratamiento altera la estructura de la lignina permitiendo una solubilización parcial de la hemicelulosa y un pobre acceso al ataque enzimático (Chang , Nagwani, Kim, C, & Holtzaple, 2001) como es en el caso del pretratamiento con cal para las maderas de hule y Apapaxco, ya que se aprecia en los resultados la baja solubilización de lignina y por tanto el contenido de azúcares determinados en la fase líquida.

Sacarificación enzimática

Terminada la etapa de pretratamiento básico de los materiales lignocelulósicos se llevó a cabo una hidrólisis enzimática de los sólidos remanentes utilizando el coctel enzimático E7. Los sólidos utilizados para esta etapa de hidrólisis fueron los obtenidos del pretratamiento básico y fueron acondicionados con buffer de citratos 1M para llevarlos a un pH de 4.8 para realizar la sacarificación enzimática, además de la biomasa sin pretratar. Los resultados obtenidos para cada muestra

de biomasa pretratada de cada experimento, así como las condiciones de la hidrólisis enzimática se muestran en las tablas 31 y 32 en el Anexo C. Los datos mostrados en la tabla 32 se restó la cantidad de azúcares reductores y totales asociadas al coctel enzimático, cuantificados con un blanco a las condiciones de la hidrólisis.

De acuerdo a los resultados obtenidos se aprecian mejores resultados para la madera de Hule utilizando el coctel enzimático E7. Esto concuerda con lo esperado con respecto a los efectos del pretratamiento; del mismo se obtuvo una mayor solubilidad de lignina lo que permitió una mayor accesibilidad a las enzimas hidrolíticas. A su vez, la madera de Hule tiene una mayor área de contacto aumentando la acción enzimática porque el tamizado es más fino que en la madera de Apapaxco.

Se aprecia que el pretratamiento con el que se obtuvo mayor cantidad de azúcares totales fue la biomasa de Hule obteniendo 14.36 ± 0.22 %, sin embargo, se obtuvo una cantidad muy pequeña de azúcares reductores de 4.83 ± 0.07 %. En los gráficos 5 y 6 se puede apreciar de manera clara la diferencia entre la generación de azúcares totales y reductores en la etapa de hidrólisis enzimática para cada biomasa previamente pretratada.

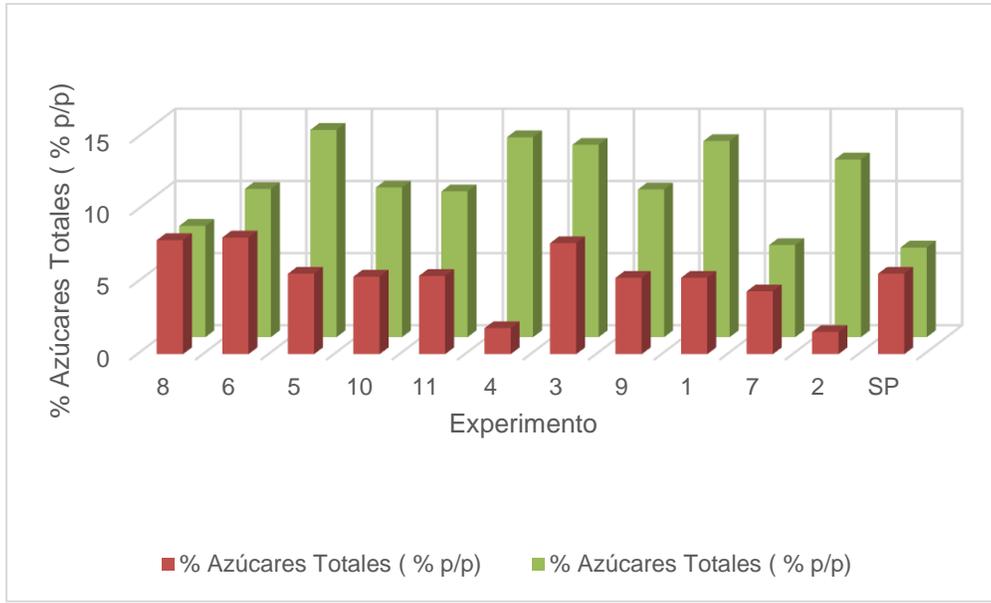


Gráfico 5. Azúcares totales obtenidos después de la hidrólisis enzimática con coctel E7.

*SP: Sin pretratamiento.

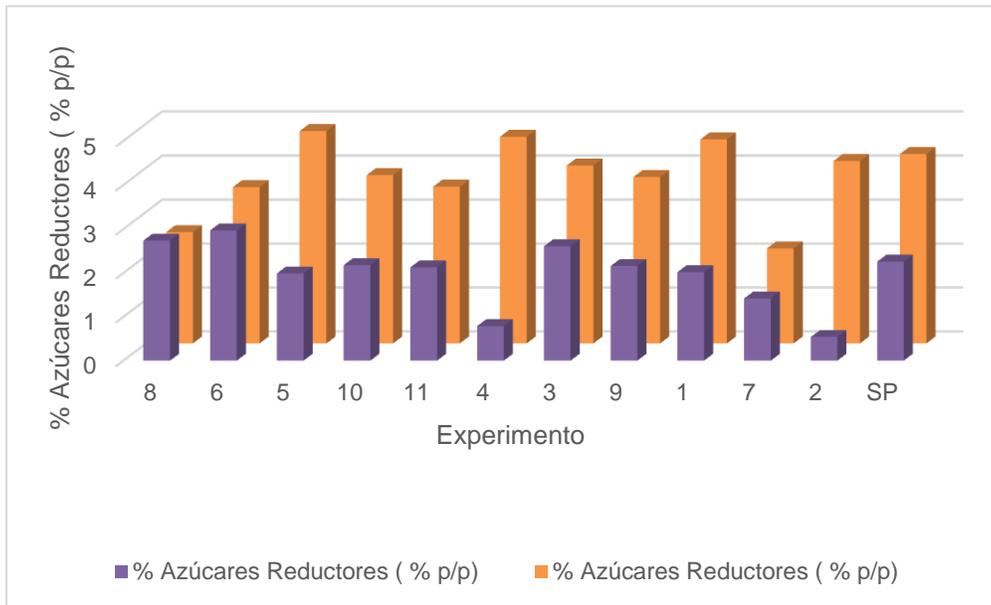


Gráfico 6. Azúcares reductores obtenidos después de la hidrólisis enzimática con coctel E7.

*SP: Sin pretratamiento.

Se observa en el Gráfico 7 que la concentración de azúcares totales para madera de Hule durante la sacarificación se obtiene a concentraciones bajas de CaO (%) y a tiempos de reacción más altos en una temperatura de 93°C mientras que para el caso de Apapaxco se requiere más concentración de CaO (%) y un menor tiempo de reacción a una temperatura de 117°C como se muestra en el Gráfico 8.

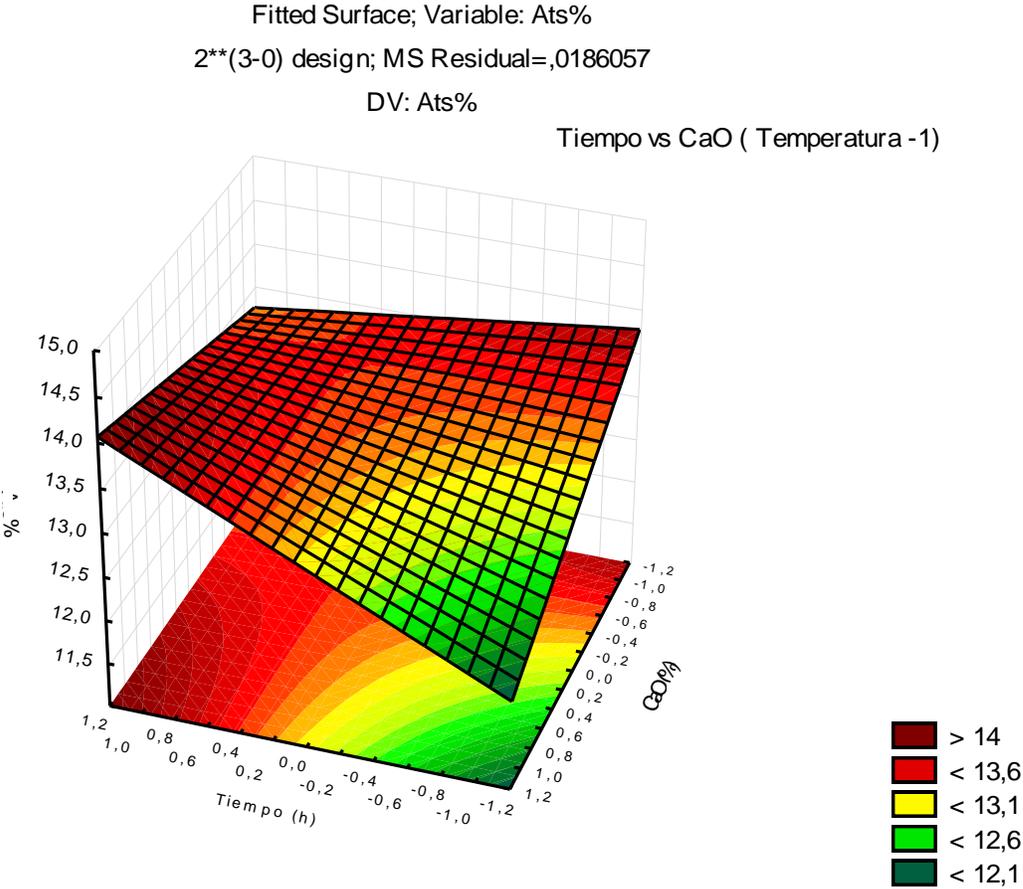


Gráfico 7. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 93°C.

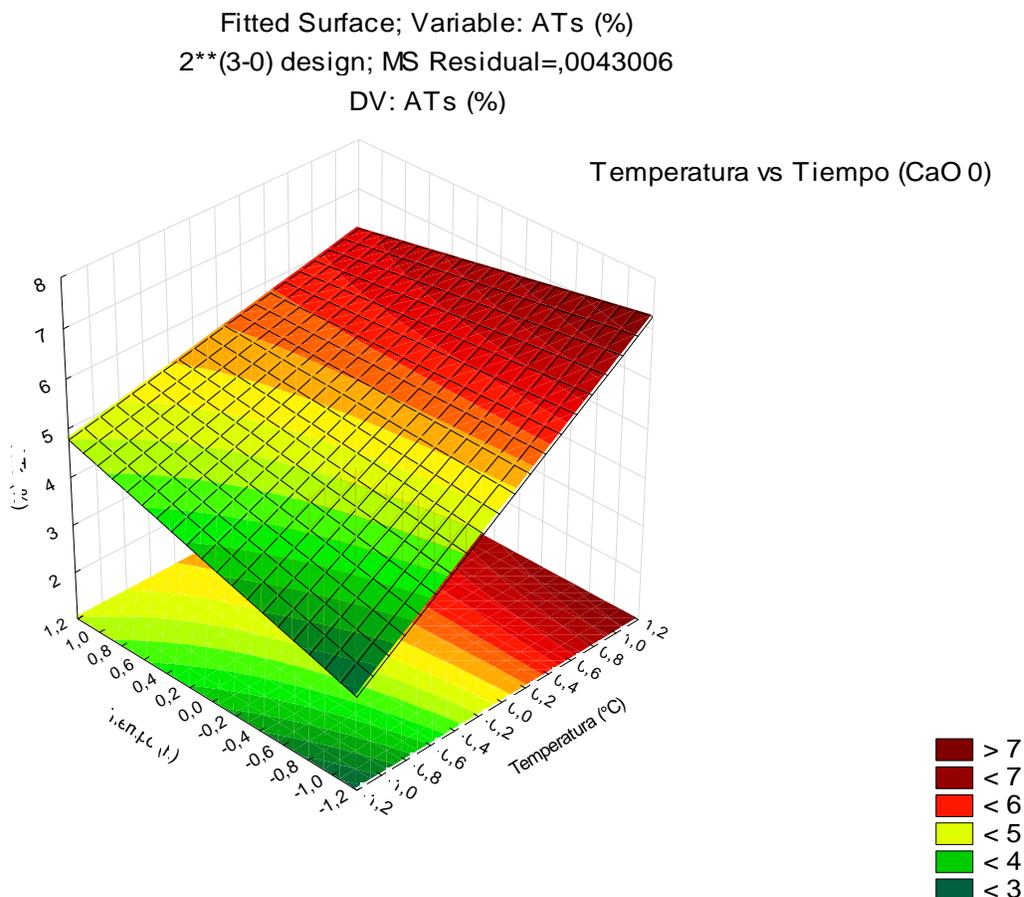


Gráfico 8. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 1 h de tiempo de reacción.

Mientras que para la madera de Apapaxco se observan mejores resultados en la obtención de azúcares reductores cuando aumenta la temperatura a 140°C y disminuye la concentración de CaO al 1% para un tiempo de reacción de 2 horas (Gráfico 9). En el caso de la concentración de azúcares reductores generados en la sacarificación de las muestras pretratadas se obtiene una mayor concentración para Hule con menor temperatura de 93°C y 3 horas de tiempo de reacción para una concentración de 1 % de CaO (Gráfico 10).

Fitted Surface; Variable: ARs (%)
2**(3-0) design; MS Residual=,0007391
DV: ARs (%)

Temperatura vs CaO (Tiempo 0)

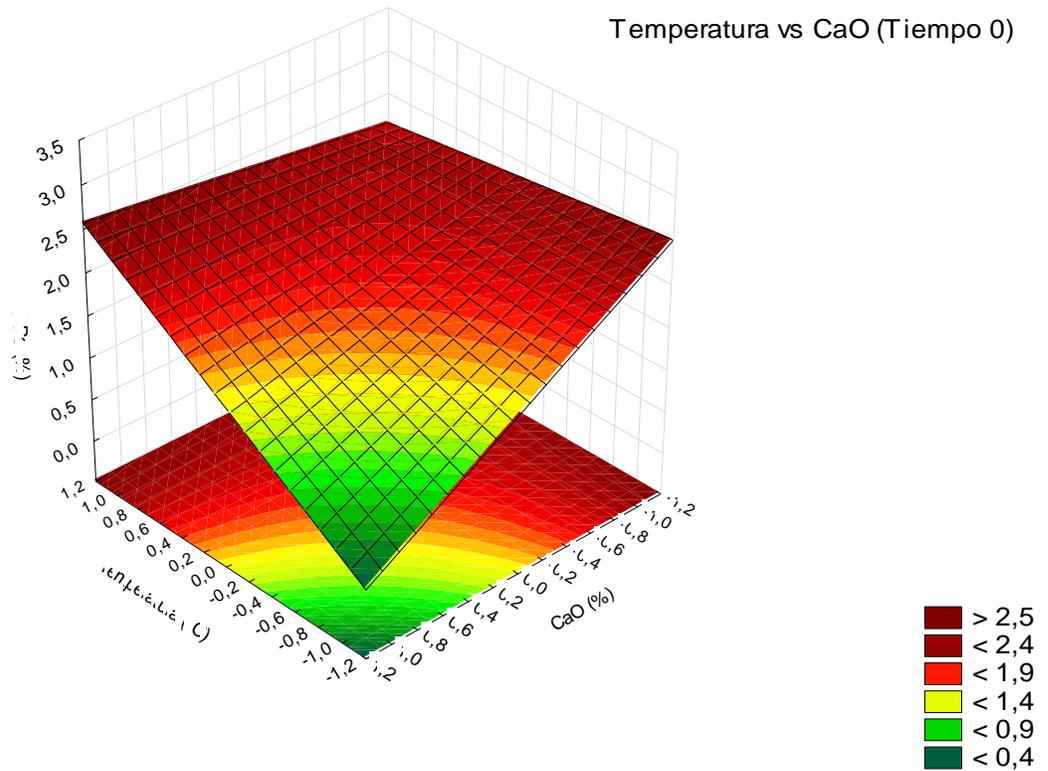


Gráfico 9. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.

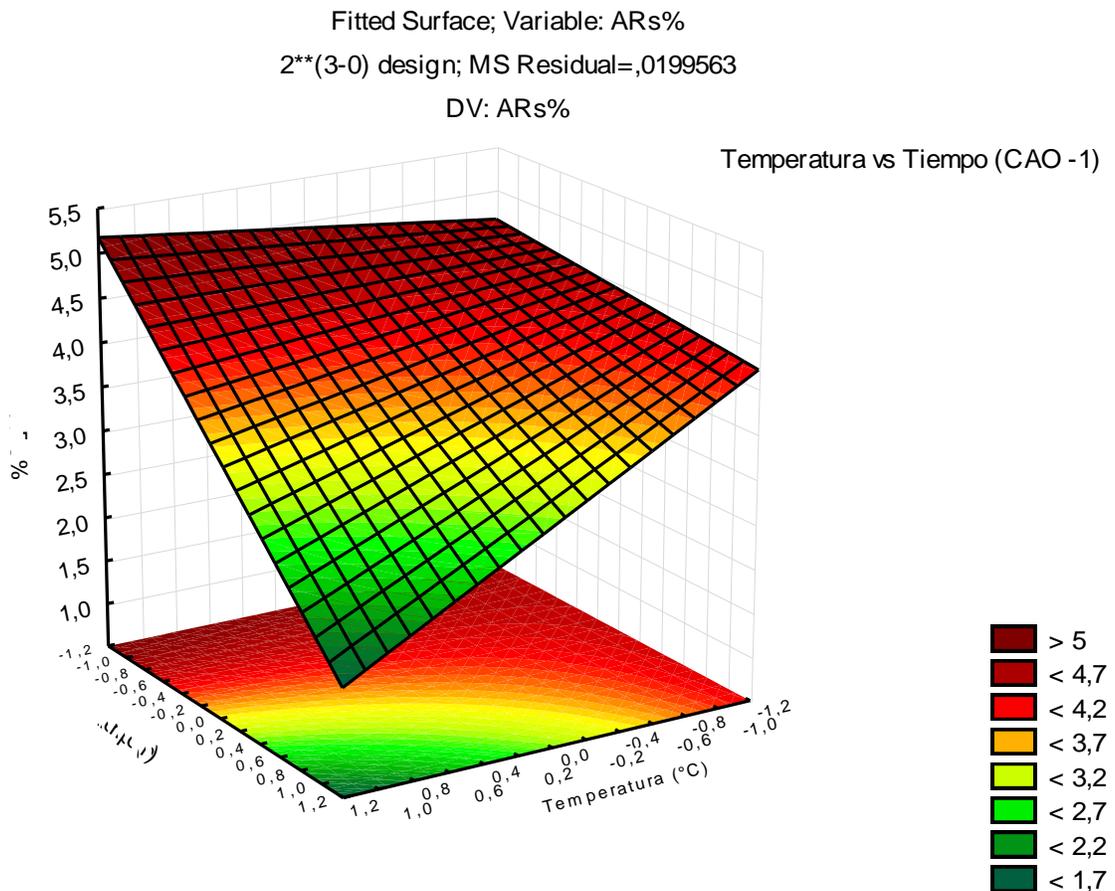


Gráfico 10. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 1% de CaO.

Para evaluar la eficiencia de la hidrólisis enzimática se determinó el grado de polimerización (DP). El grado de polimerización está definido como el número de unidades monoméricas en una macromolécula o una molécula oligomérica, un bloque o una cadena (IUPAC, 2011). De esta manera el DP, mientras el valor sea más cercano a 1 se habrá alcanzado un mayor grado de sacarificación para la formación de monosacáridos (azúcares reductores), que son los que finalmente se podrán fermentar a etanol. En la Tabla 14 se muestra el DP calculado para cada experimento como la relación azúcares totales/azúcares reductores obtenidos de

la sacarificación de cada una de las muestras de biomasa previamente pretratadas.

Tabla 14. Grado de polimerización (DP) después de la aplicación de la hidrólisis enzimática.

Grado de polimerización		
Experimento	Apapaxco	Hule
8	2.88	3.04
6	2.72	2.88
5	2.80	2.97
10	2.46	2.71
11	2.54	2.83
4	2.28	2.95
3	2.95	3.29
9	2.45	2.70
1	2.62	2.93
7	3.06	2.94
2	2.85	2.97
Sin pretratamiento	2.465	1.44

De acuerdo al DP, se puede observar que existen variaciones para cada experimento. Se observa que para el pretratamiento básico de madera de Apapaxco y hule se obtienen los DP más altos para los experimentos 7 y 3 respectivamente, lo que indica que las enzimas no están desdoblado por completo la celulosa, por lo que se está obteniendo una gran cantidad de moléculas no monoméricas (azúcares totales). Esto se puede atribuir a que el pretratamiento no tuvo un gran efecto sobre la estructura de la lignina provocando el difícil acceso de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa (Chang , Nagwani, Kim, C, & Holtzapple, 2001).

Por otra parte, la sacarificación de la biomasa con pretratamiento muestra grados de polimerización más altos que para la sacarificación sin pretratamiento. Aunque para hidrólisis sin pretratamiento la generación de azúcares es mucho menor que la obtenida después del pretratamiento con el coctel E7, se tienen DP menores

debido a que no existe la barrera física que impone los residuos de cal para la acción enzimática. Sin embargo, la concentración de azúcares totales aumenta para los materiales pretratados pero el contenido de azúcares reductores no aumenta significativamente en comparación con las concentraciones observadas en la sacarificación sin pretratamiento. De acuerdo a los resultados, se observa que para algunos pretratamientos no se obtuvieron rendimientos muy altos comparados con el material sin pretratar. Otros factores que afectaron la sacarificación ha sido el alto grado de polimerización, la humedad de las muestras y el tamaño de partícula de los materiales (Chang , Nagwani, Kim, C, & Holtzaple, 2001) esto se puede explicar debido a las características del material lignocelulósico, ya que pudo haber existido poca difusión del coctel enzimático dentro de la estructura del material lignocelulósico para su acceso a las cadenas de celulosa a consecuencia de la baja solubilización de lignina en el pretratamiento.

Como se observa en los experimentos en donde la concentración de cal utilizada fue mayor, los azúcares generados durante la sacarificación fueron menores en comparación de aquellos experimentos en donde la concentración de cal fue menor debido a que puede existir una barrera limitante entre la enzima y el tamaño de poro de la madera en relación al tamaño, a su vez que estos poros pudieran estar obstruidos con remanentes de cal embebidos en el material dificultado la acción enzimática (Gregg & Saddler, 1996). Además de que la madera blanda es un material recalcitrante y resistente a ataques fisicoquímicos gracias a su alto contenido de lignina.

Conclusiones

El pretratamiento básico probado en este trabajo no fue efectivo en la deslignificación de la biomasa y como consecuencia no mejoró significativamente la sacarificación enzimática de acuerdo a la cantidad de azúcares obtenidos

El tamiz malla 60 utilizado con la madera de Hule permite obtener mayor concentración de azúcares durante el pretratamiento y la sacarificación debido al incremento del área superficial.

El factor de CaO (%) en el pretratamiento disminuye con severidad la generación de azúcares durante la sacarificación enzimática, aunque la interacción con los parámetros de temperatura y tiempo presenta un efecto positivo sobre la variable de respuesta AR y AT.

El pretratamiento básico de la madera de hule resultó el más eficiente en la obtención de azúcares reductores y mostro un ligero aumento en la solubilización de lignina, los resultados se muestran en el diagrama de la figura 16. Para el caso de madera de apapaxco los resultados obtenidos son muy similares a los experimentos en donde se sacarificó el material sin pretratamiento, sugiriendo así que no se logró desestabilizar la estructura lignocelulósica del material con el pretratamiento alcalino.

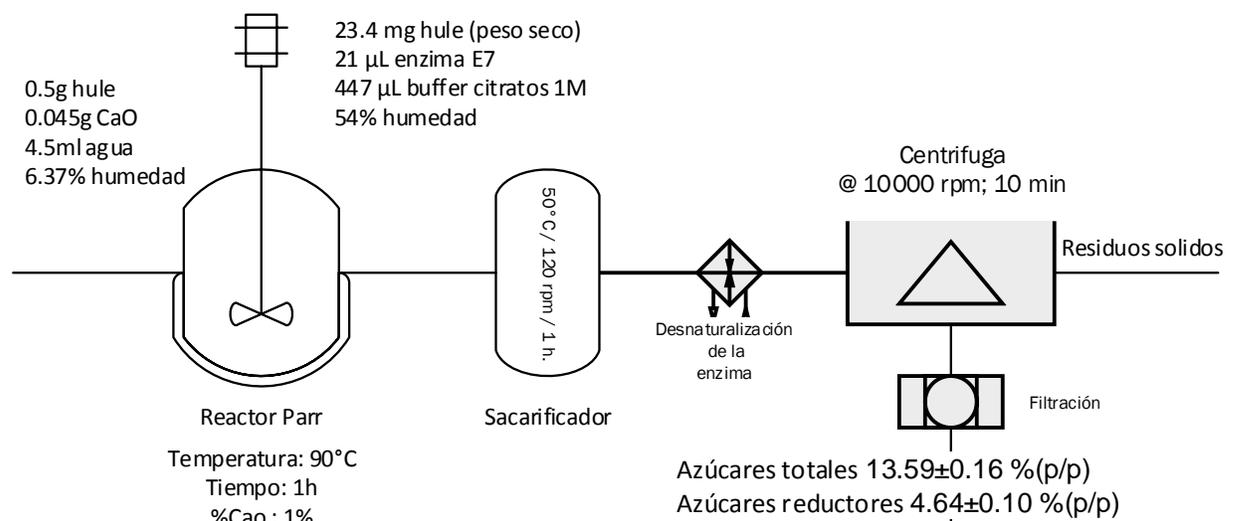


Figura 16. Diagrama de flujo de proceso para el pretratamiento y sacarificación de residuos de hule que representa las mejores condiciones de operación.

Todos los pretratamientos presentaron un aumento en la generación de azúcares respecto a la biomasa sin pretratar. Ya que los resultados obtenidos en la sacarificación enzimática no fueron altos se recomienda realizar un estudio sobre las condiciones de operación de los pretratamientos básicos. Se recomienda la aplicación de otras tecnologías en la etapa de pretratamiento como el pretratamiento explosión con vapor o líquidos iónicos ya que se ha probado que son muy efectivos para materiales como la madera o incrementar el tiempo de reacción y la temperatura del pretratamiento básico con cal y utilizar concentraciones de cal dentro del rango de 0 – 1 %.

Referencias

- AJ, R., Williams, C., Davison, B., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., . . . Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311, 484-489.
- Balat, M. (2010). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*.
- Barrera, I., Aburto, J., & Gualo, N. (2013). *Manual de técnicas analíticas para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos*. (I. M. Petróleo, Ed.) Mexico, D. F.
- Chandel, A., Rudravaram, R., Narasu, M., Rao, L., & Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies. *Biotechnol Mol Biol*, 14-32.
- Chang, V., Nagwani, M., Kim, C., & Holtzaple, T. (2001). Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol*.
- DeAngelis, K., & Allgaier, M. (2010, 08 22). *Lignocellulose Decomposition*. Retrieved from Second Genome: <http://www.secondgenome.com/2010/08/lignocellulose-decomposition/>
- Demirbas, A. (2008). Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J. Hazard Mater*, 157:220-9.
- Detroy, R., & Julian, G. (1982). Biomass conversion: fermentation chemicals and fuels. *Crit Rev Microbiol*.
- Feldman, D., Williams, C., Davison, B., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., & Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311, 484-489.
- García, J. A., & Colom, J. F. (1992). El proceso al sulfato: aspectos químicos de la cocción. In E. t. Terrassa. Terrassa, España.
- Garcia, O. (2003). *Utilización de fibras de lino en la fabricación de papel. Nuevas secuencias de blanqueo y aplicación de sistemas enzimáticos*. Tesis doctoral, Universidad Politecnica de Cataluña, España.
- Gnansounou, E. (2010). *Bioenergy and Energy Planning Research Group BPE*. Retrieved from ENERS Energy Concept: <http://bpe.epfl.ch/page-34012-en.html>

- Gregg, D., & Saddler, J. (1996). A techno economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass to ethanol process. *Appl. Biochem. Biotechnol.*
- Guzmán, N. (2012). Pretratamiento de bagazo de gramíneas para el incremento de azúcares reductores fermentables a etanol. *Tesis de licenciatura*. México.
- Keshwani, D., & Cheng, J. (2009). Switchgrass for bioethanol and other value-added application: a review. *Bioresour Technol*, 100:1515-23.
- Kodali, B., & Pogaku, R. (2006). Pretreatment studies of rice bran for the effective production of cellulose. *Electron J Environ Agric Food Chem*, 64.
- Kumar, P., Barrett, D., Delwiche, M., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuels production. *Ind Eng Chem Res*, 48:3713-29.
- Lee, D., Owens, V., Boe, A., & Jeranyama, P. (2007, June). Composition of herbaceous biomass feedstocks. *South Dakota State University Publication*.
- Limayem, A., & Ricke, S. (2011). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*.
- Maya, D. C., Figueroa, J., Garnica, R., & Veles, J. (2010). Whole-grain corn tortilla prepared using an ecological nixtamalisation process and its impact on the nutritional value. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(23-28).
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment. *Bioresource Technology*, 673-686.
- Osvando-Chacón, S., & Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 111-120.
- Pan, X., Gilkes, N., & Saddler, J. (2006). Effect of acetyl groups on hydrolysis of cellulosic substrates. *Holzforchung*, 60:398-401.
- Parr, I. C. (2013). *Parr Instrument Company*. Retrieved from <http://www.parrinst.com/es/products/stirred-reactors/series-5500-hp-compact-reactors/>.
- Pike, P., Segupta, D., & Hertwig, T. (2008, November 3). Integrating biomass feedstocks into chemical production complexes using new and existing processes. *Minerals Processing Research Institute*.
- Sánchez, Ó. J., & Cardona, C. A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 671-678.

- Sluiter, A., & Hames, R. R. (2008, April). National Renewable Energy Laboratory. *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. U.S.
- Stevens, C. F., & Kocurek, M. J. (1983). Pulp and paper manufacture: properties of fibrous raw materials and their preparation for pulping. . *Technical section Canadian Pulp and Paper Association* .
- Szulcyk, K., McCarl, B., & Cornforth, G. (2010). Market penetration of ethanol. *Sustain Energy Rev*, 14:394-403.
- Taherzadeh, M., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int J Mol Sci*, 9:1621-51.
- Zhang, Y., Himmel, M., & Mielenz, J. (2006). Outlook for cellulase improvement screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*.
- Zhang, Y., Pan, Z., & Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric Biol Eng*, 51-68.
- Zheng, Y. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol. *International journal of agricultural and biological engineering*.
- Zhu, J., Wang, G., Pan, X., & Gleisner, R. (2008, December 3-5). The status of and key barriers in lignocellulosic ethanol production: a technological perspective. *International conference on biomass energy technologies*.

Anexo A. Análisis estadístico del diseño factorial completo del pretratamiento básico de la madera de Apapaxco.

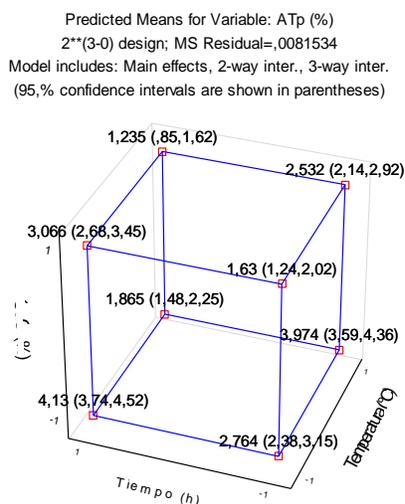


Figura 17. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares totales en el pretratamiento de madera de Apapaxco.

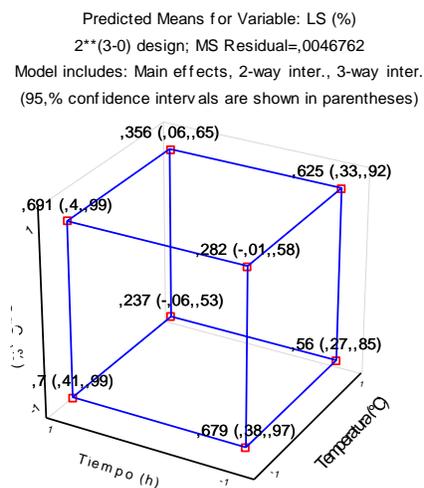


Figura 18. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para lignina soluble en el pretratamiento de madera de Apapaxco.

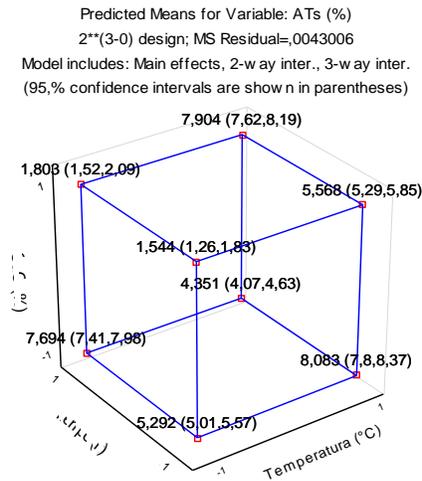


Figura 19. Representación esquemática del modelo 2^3 con triple interacción para azúcares totales en la sacarificación enzimática después del pretratamiento de madera de Apapaxco.

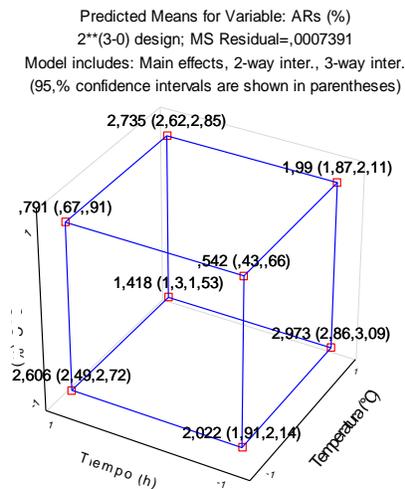


Figura 20. Representación esquemática del modelo 2^3 con triple interacción para azúcares reductores en la sacarificación enzimática después del pretratamiento de madera de Apapaxco.

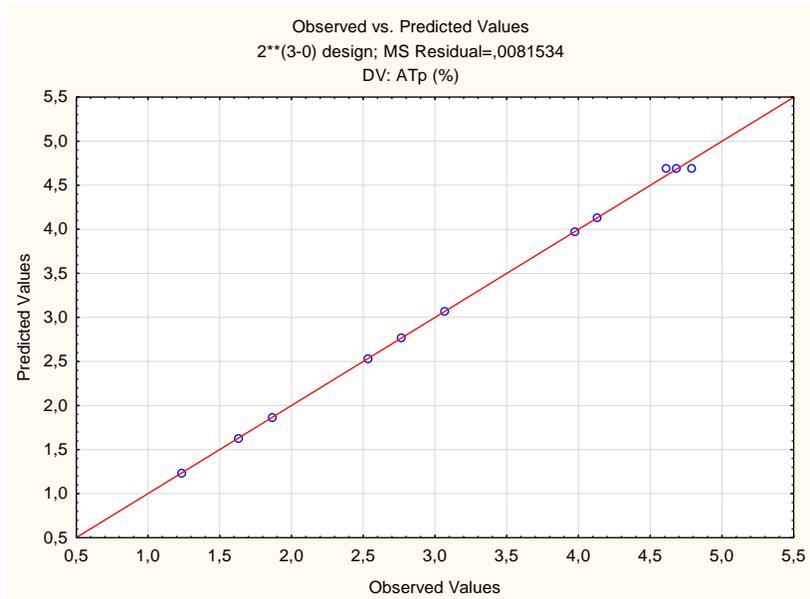


Gráfico 11. Valores predichos contra valores observados de azúcares totales generados en el pretratamiento de residuos de apapaxco.

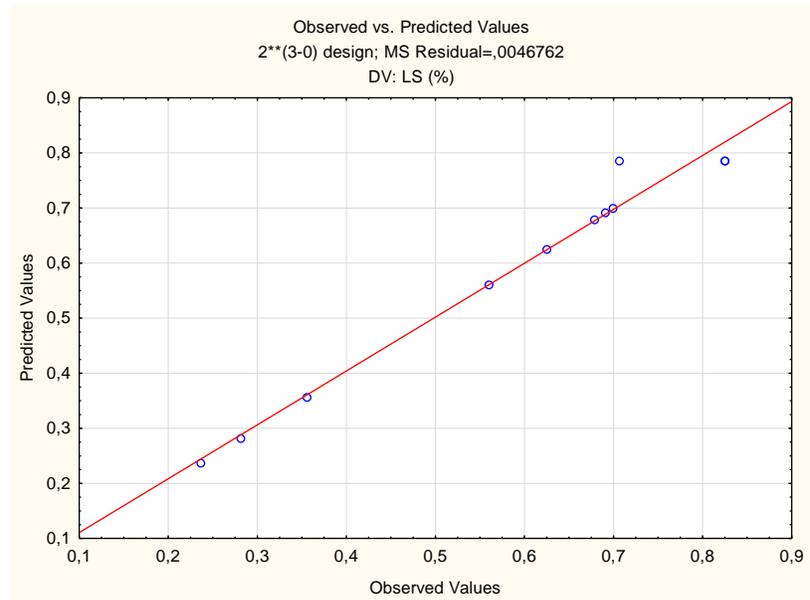


Gráfico 12. Valores predichos contra valores observados de lignina soluble en el pretratamiento de residuos de apapaxco.

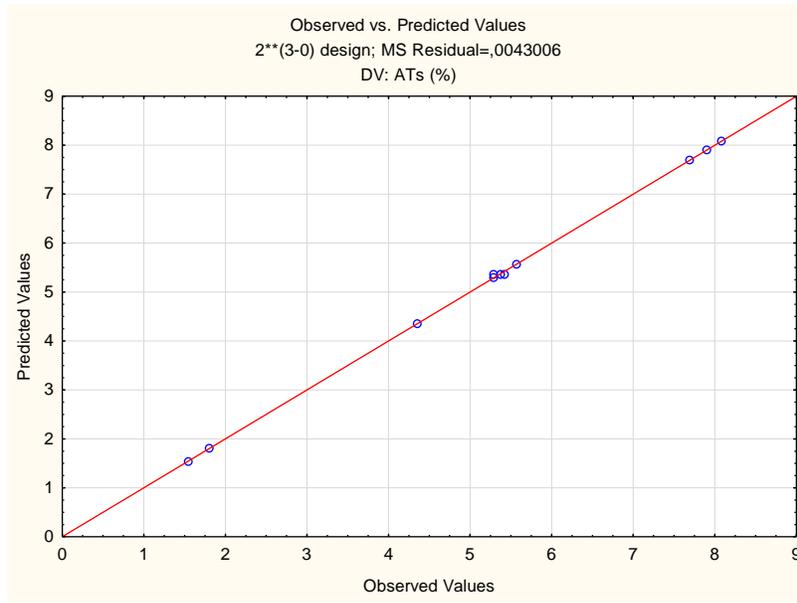


Gráfico 13. Valores predichos contra valores observados de azúcares totales generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento de residuos de apapaxco.

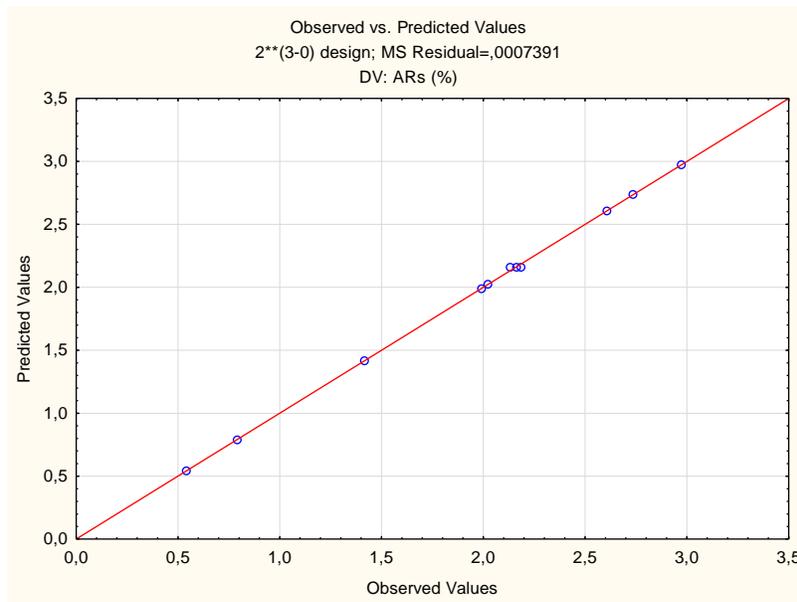


Gráfico 14. Valores predichos contra valores observados de azúcares reductores generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento de residuos de apapaxco.

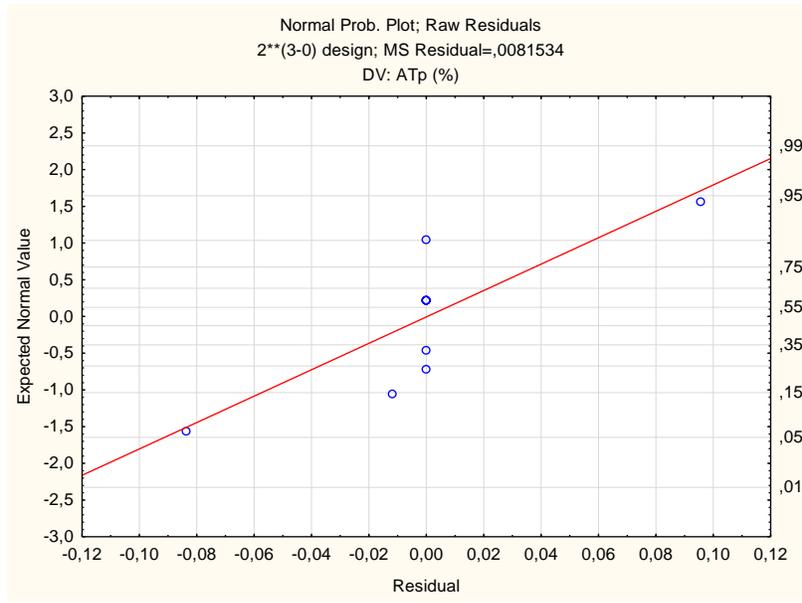


Gráfico 15. Gráfica de probabilidad normal para azúcares totales generados en el pretratamiento básico de residuos de apapaxco.

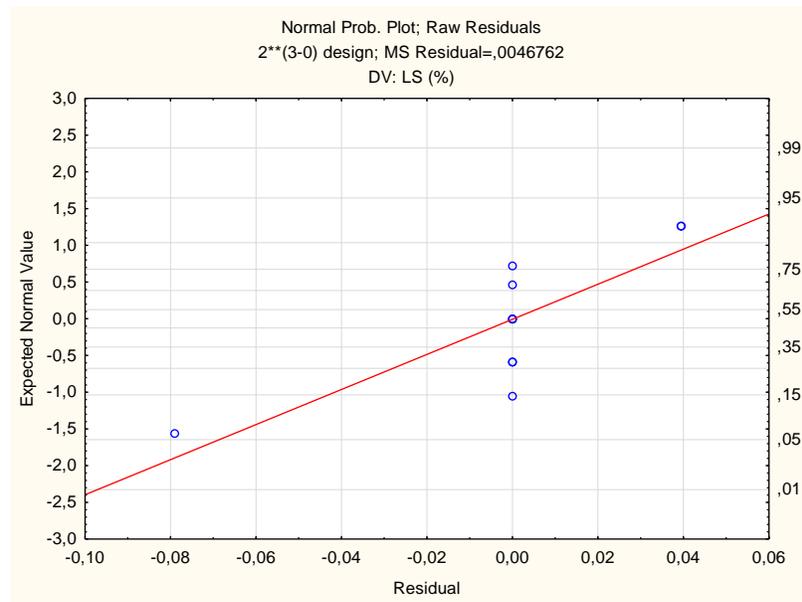


Gráfico 16. Gráfica de probabilidad normal para lignina soluble en el pretratamiento básico de residuos de apapaxco.

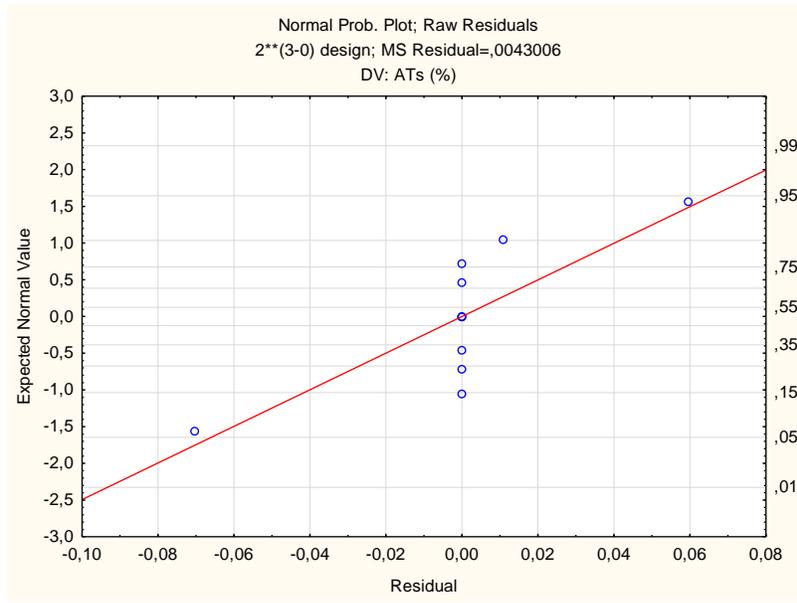


Gráfico 17. Gráfica de probabilidad normal para azúcares totales generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento básico de residuos de apapaxco.

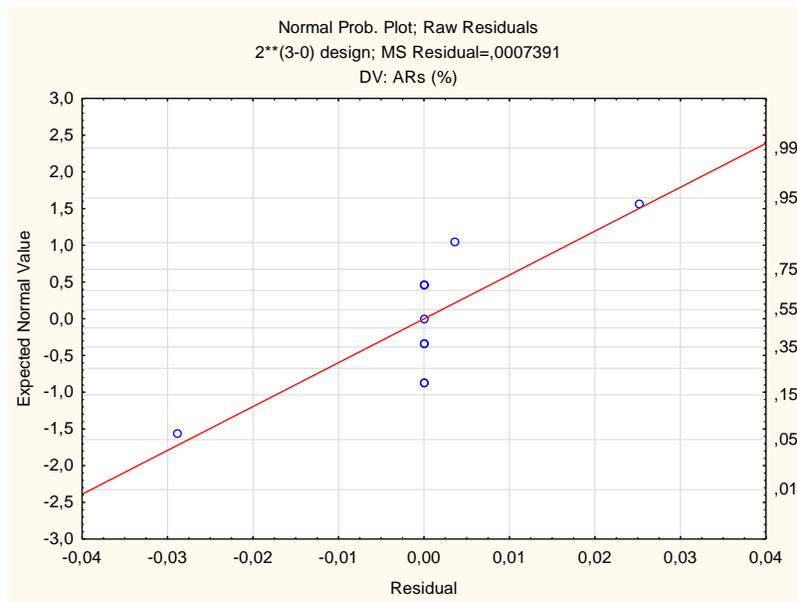


Gráfico 18. Gráfica de probabilidad normal para azúcares reductores generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento básico de residuos de apapaxco.

Azúcares Totales pretratamiento

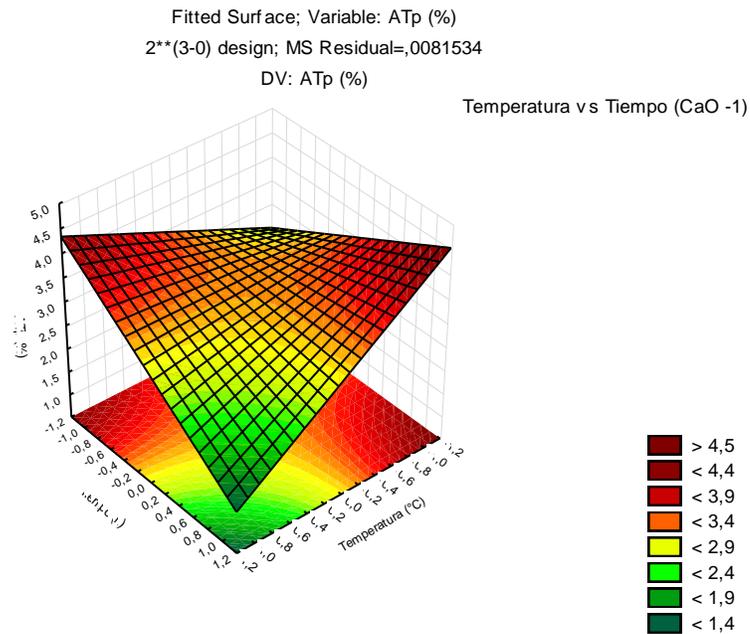


Gráfico 19. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 1% de CaO.

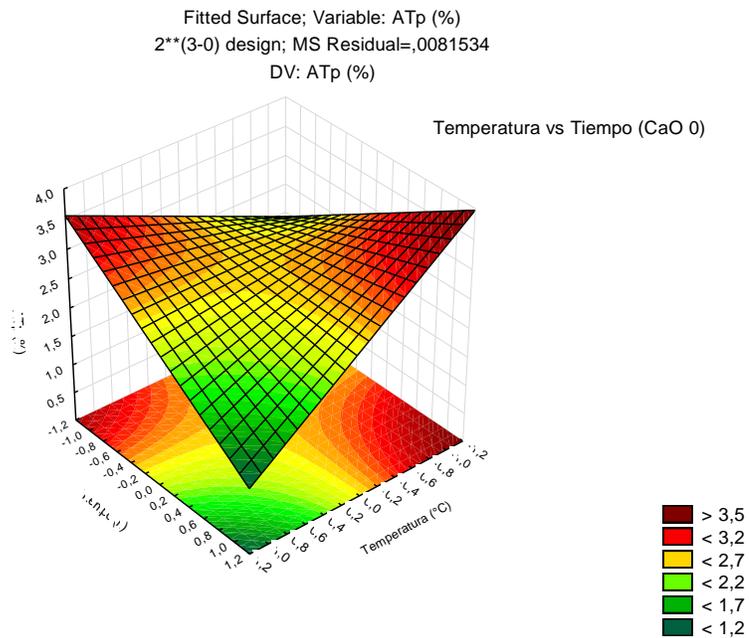


Gráfico 20. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 5% de CaO.

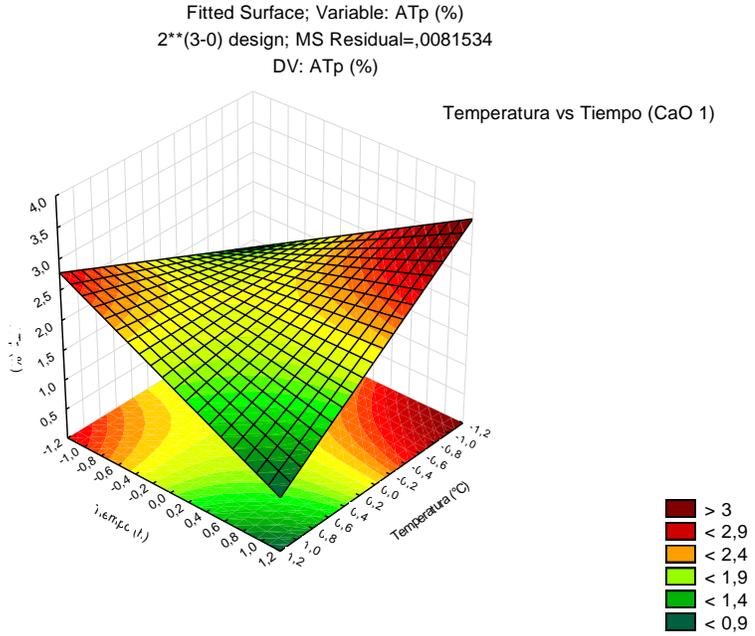


Gráfico 21. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 10% de CaO.

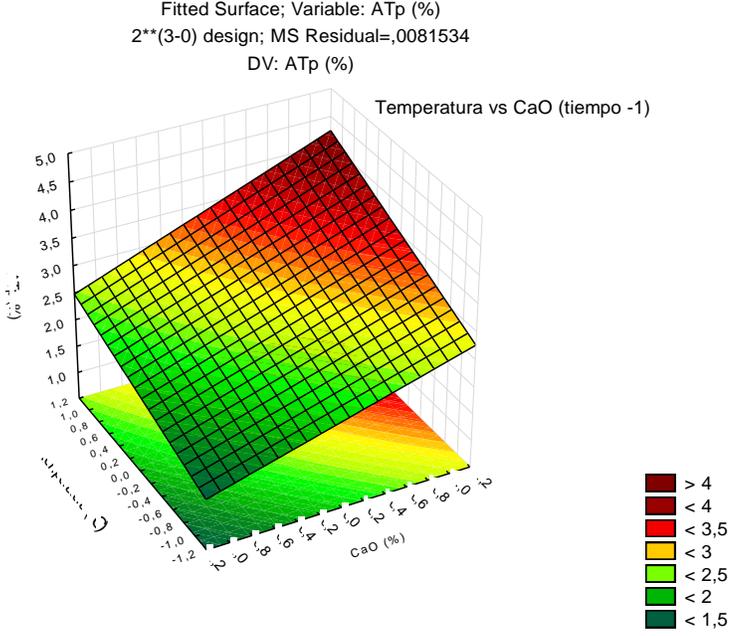


Gráfico 22. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 1 h de tiempo de reacción.

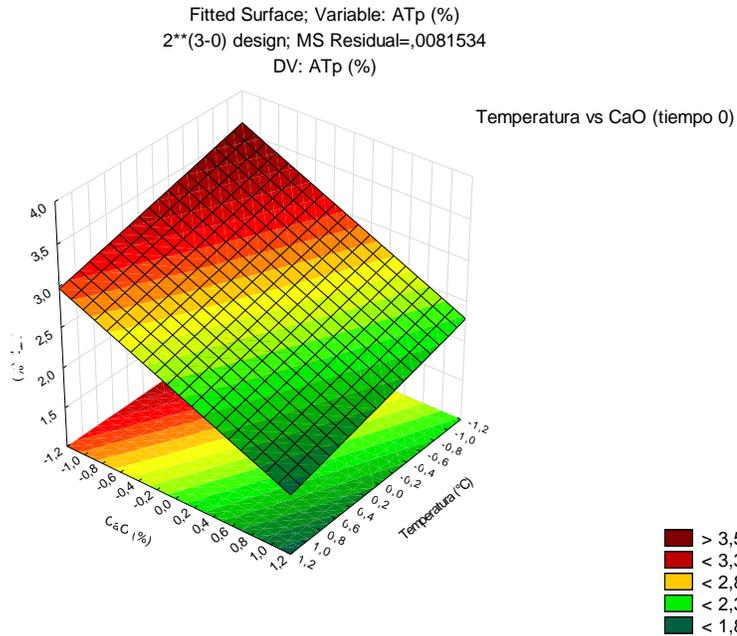


Gráfico 23. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.

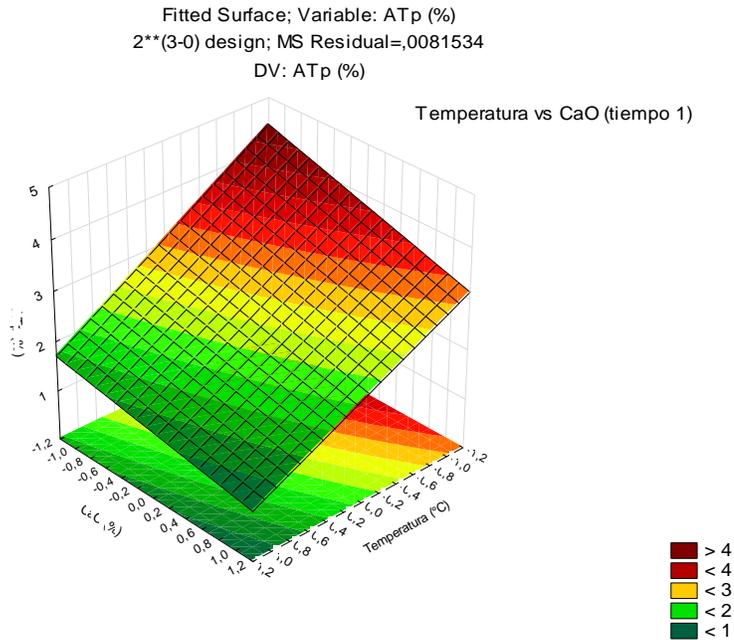


Gráfico 24. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 3 h de tiempo de reacción.

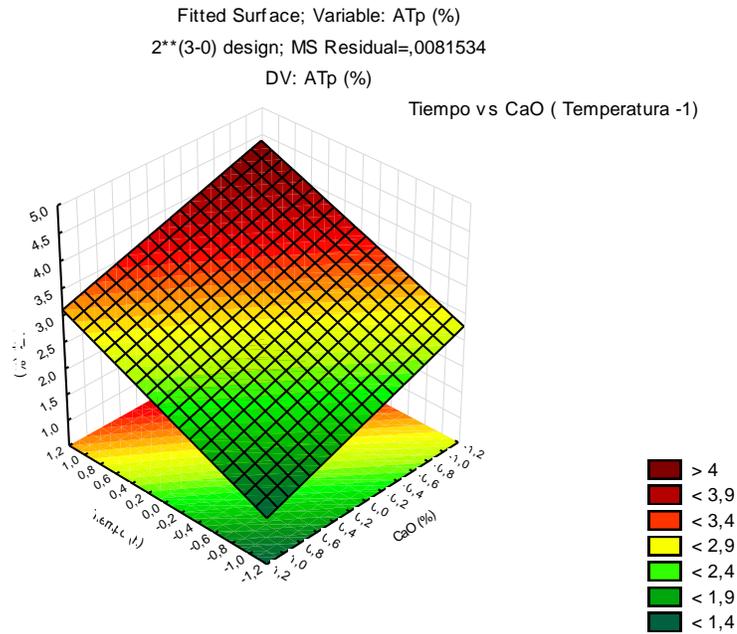


Gráfico 25. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 93°C.

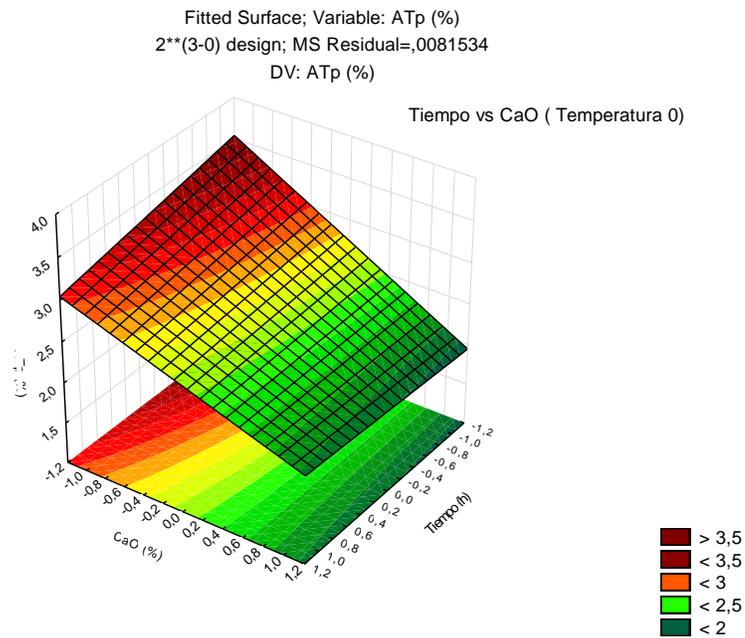


Gráfico 26. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 117°C.

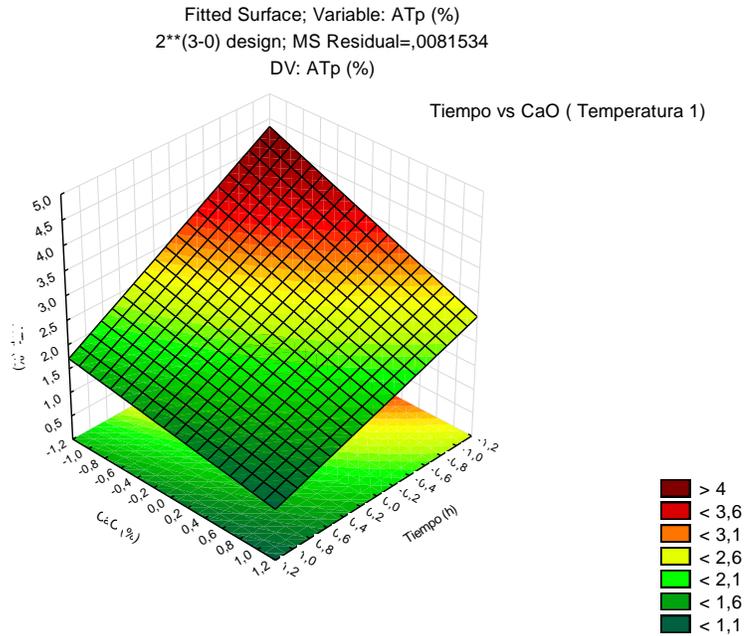


Gráfico 27. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 140°C.

Lignina soluble pretratamiento

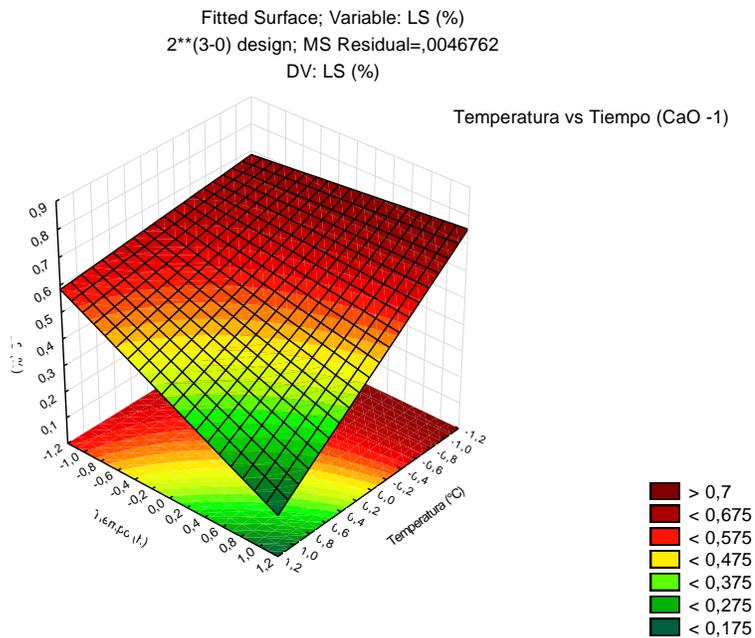


Gráfico 28. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 1% de CaO.

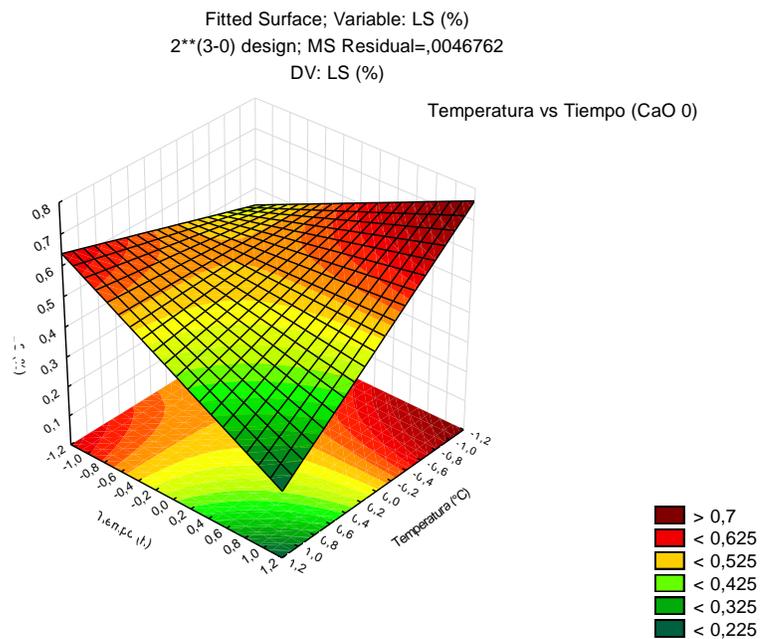


Gráfico 29. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 5% de CaO.

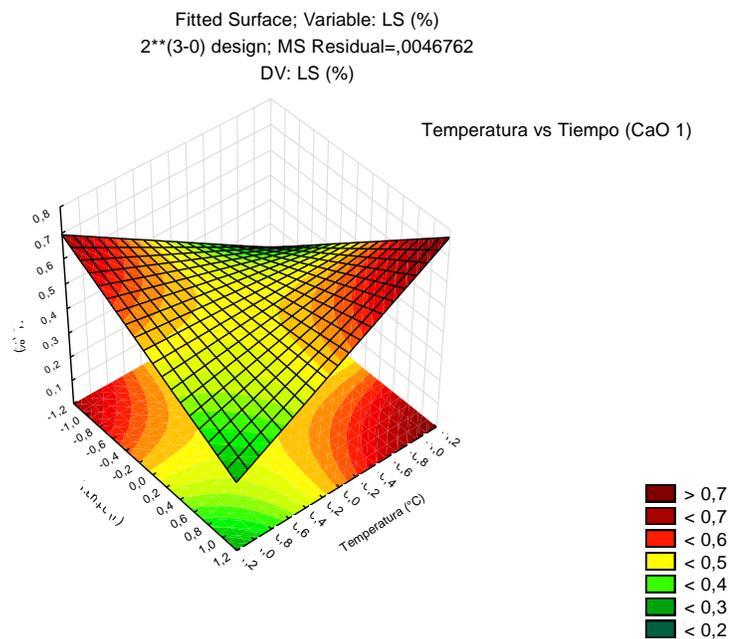


Gráfico 30. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 10% de CaO.

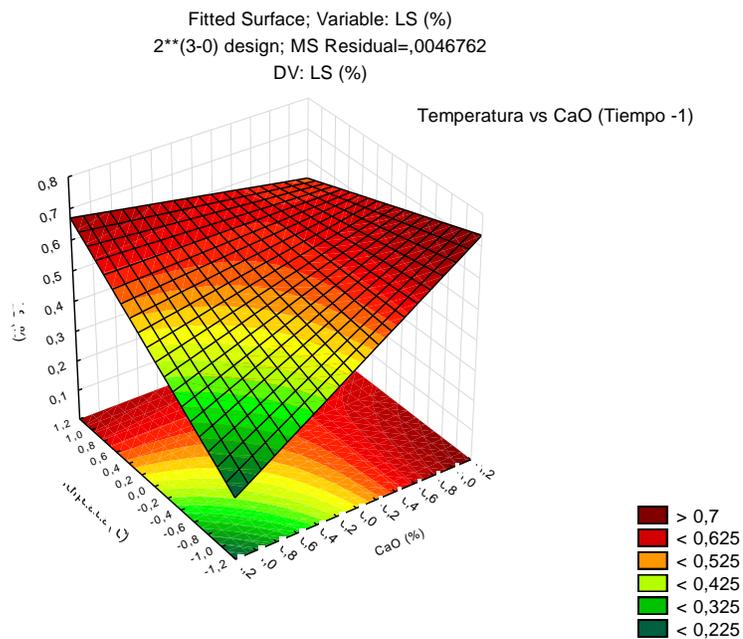


Gráfico 31. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 1 h de tiempo de reacción.

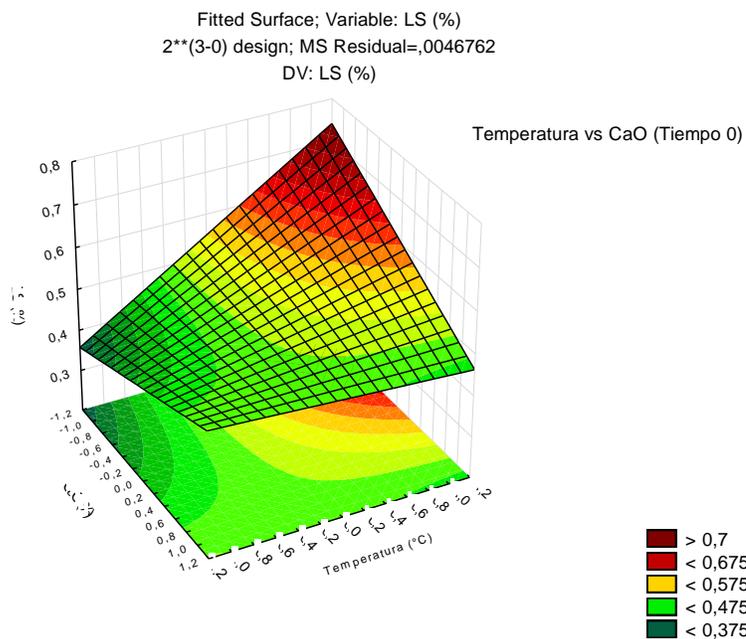


Gráfico 32. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.

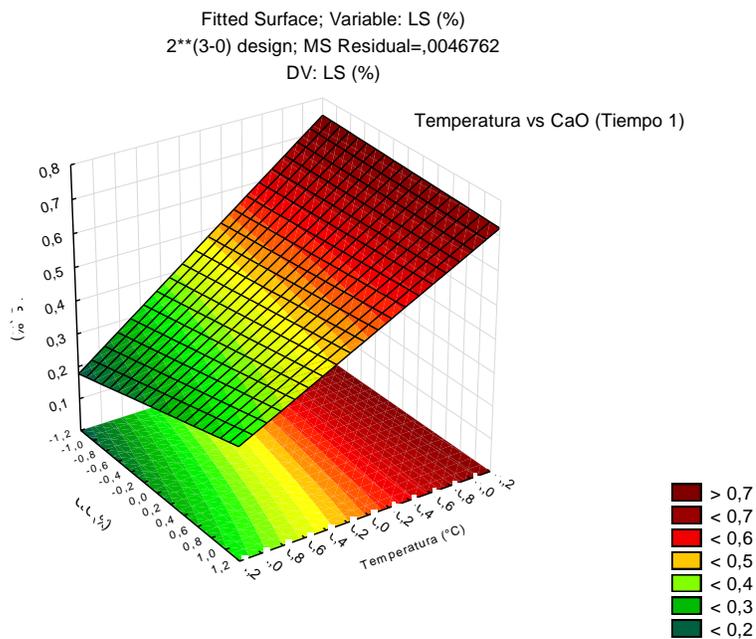


Gráfico 33. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 3 h de tiempo de reacción.

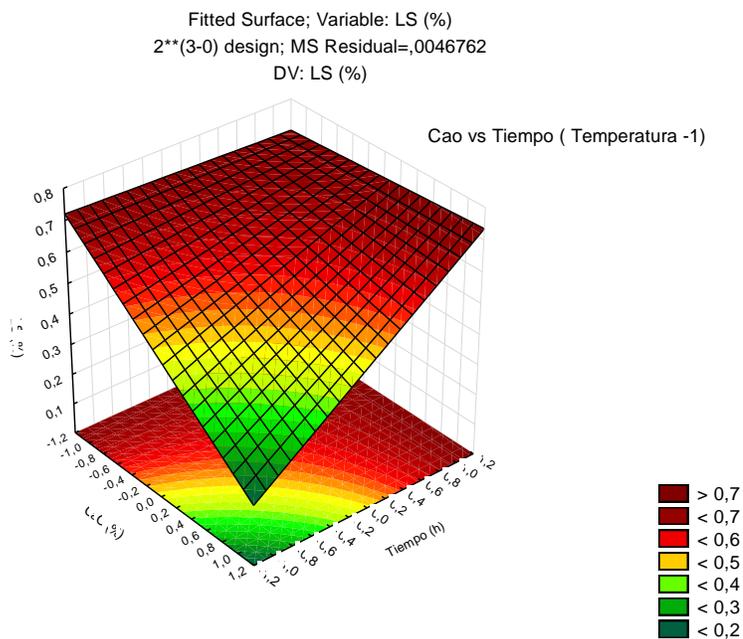


Gráfico 34. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 93°C.

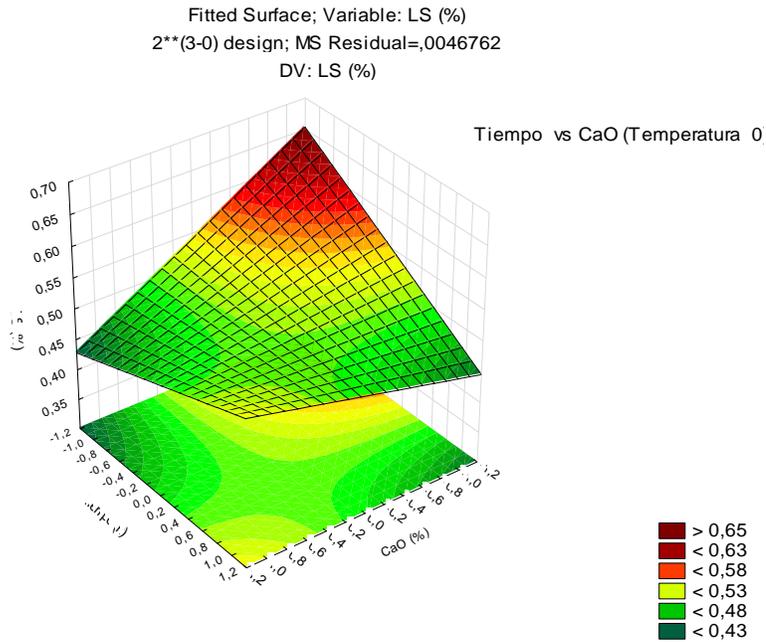


Gráfico 35. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 117°C.

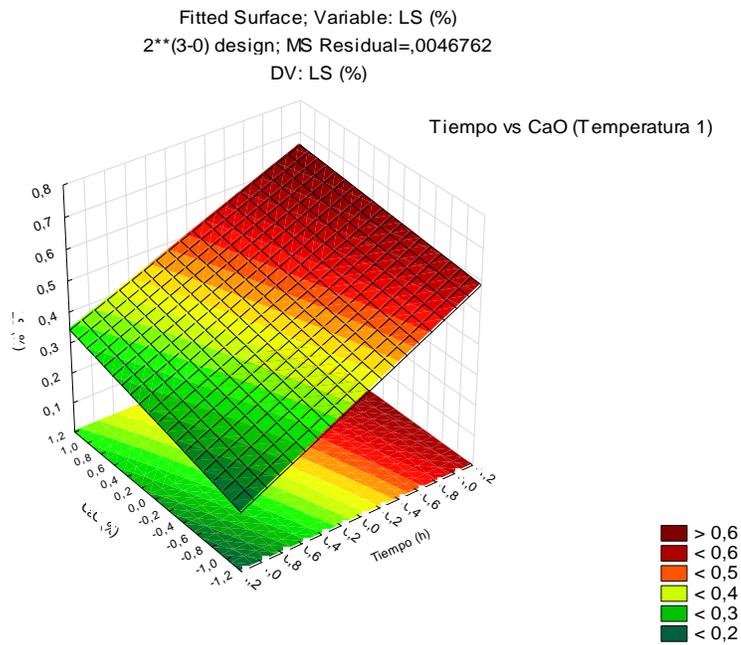


Gráfico 36. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 140°

Azúcares totales sacarificación

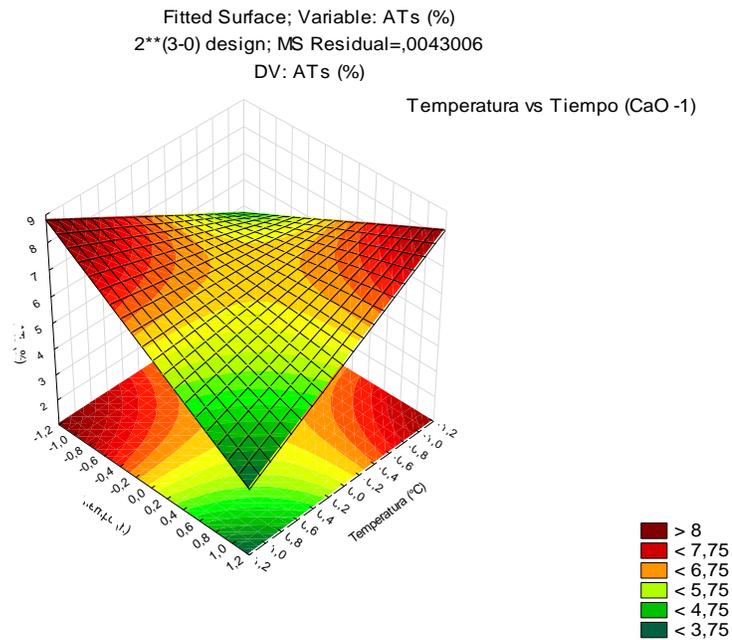


Gráfico 37. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 1% de CaO.

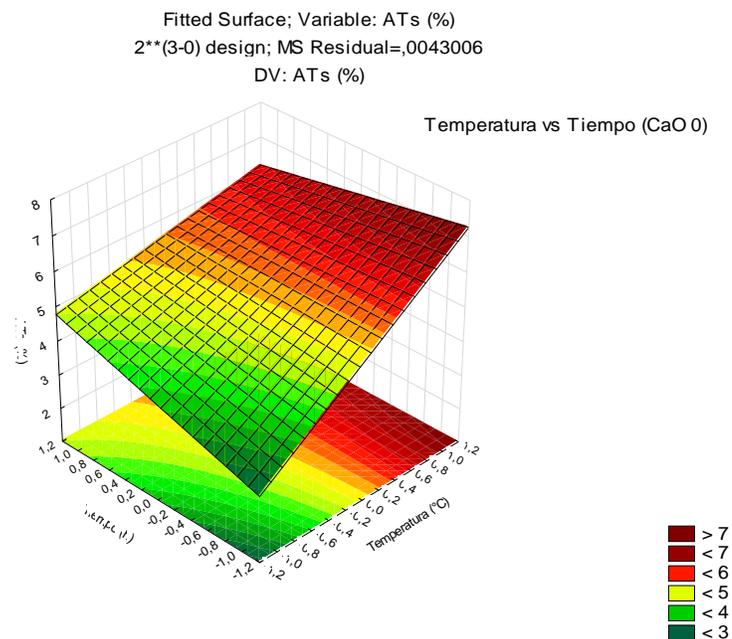


Gráfico 38. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 5% de CaO.

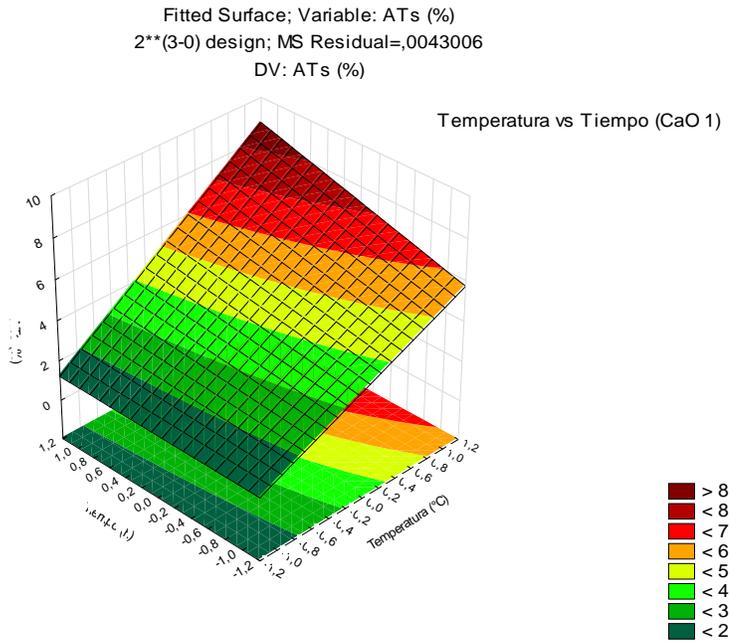


Gráfico 39. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 10% de CaO.

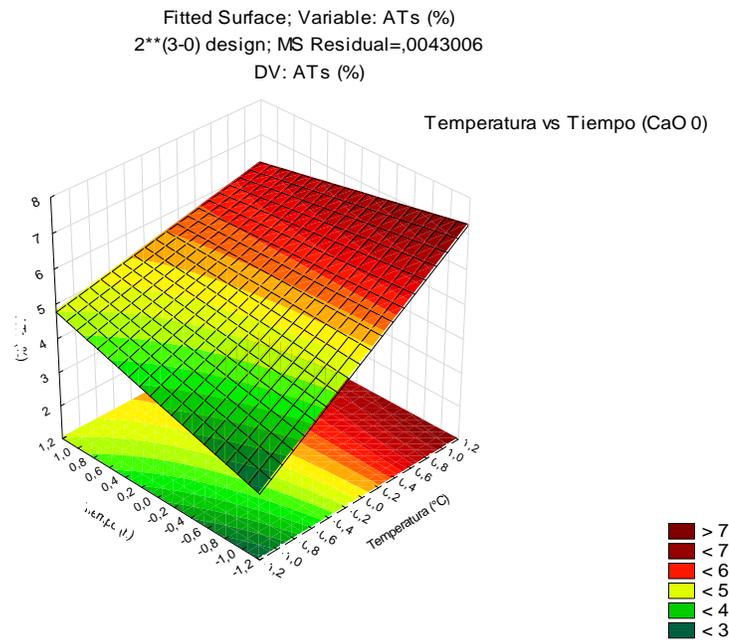


Gráfico 40. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 1 h de tiempo de reacción.

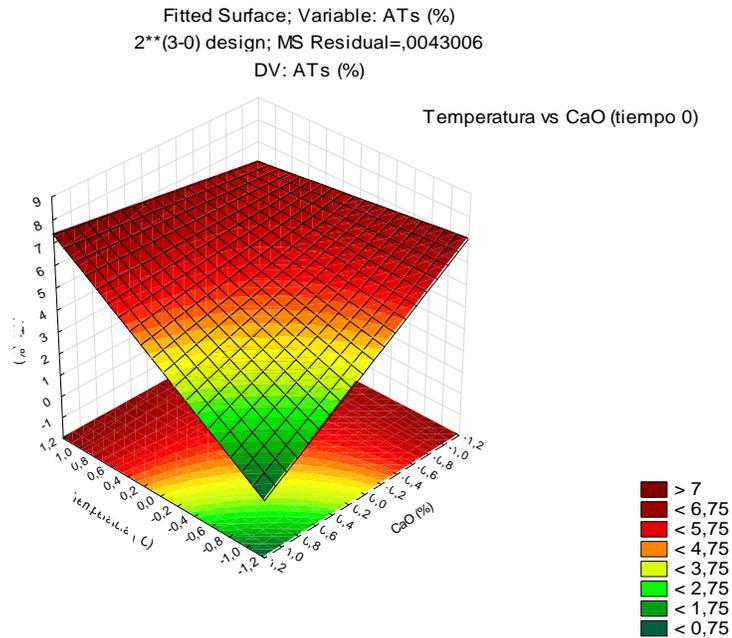


Gráfico 41. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 2 h de tiempo de reacción.

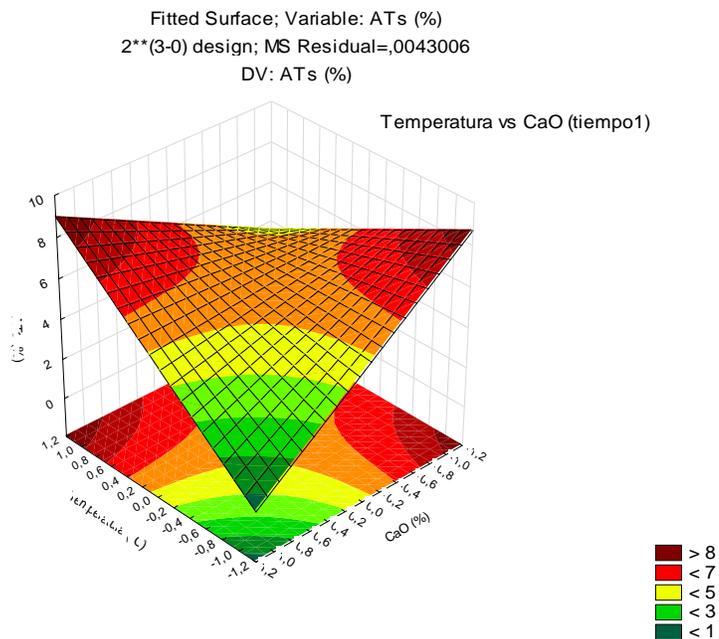


Gráfico 42. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 3 h de tiempo de reacción.

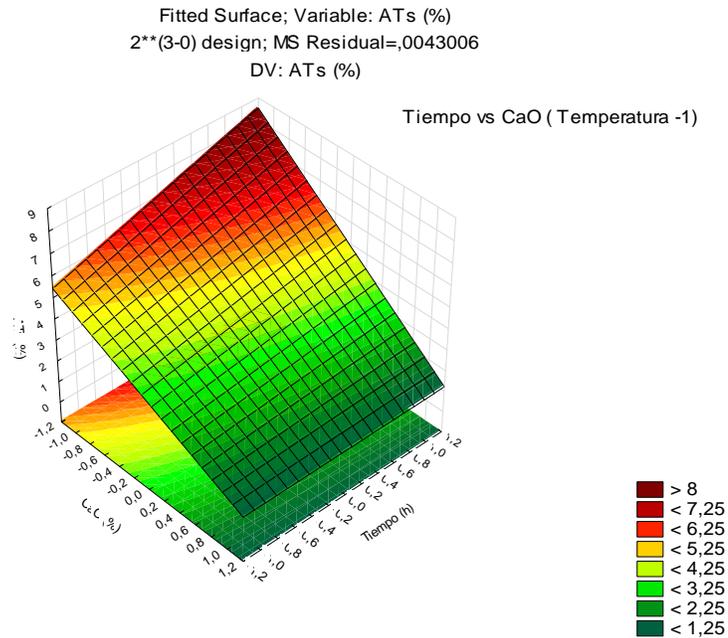


Gráfico 43. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 93°C.

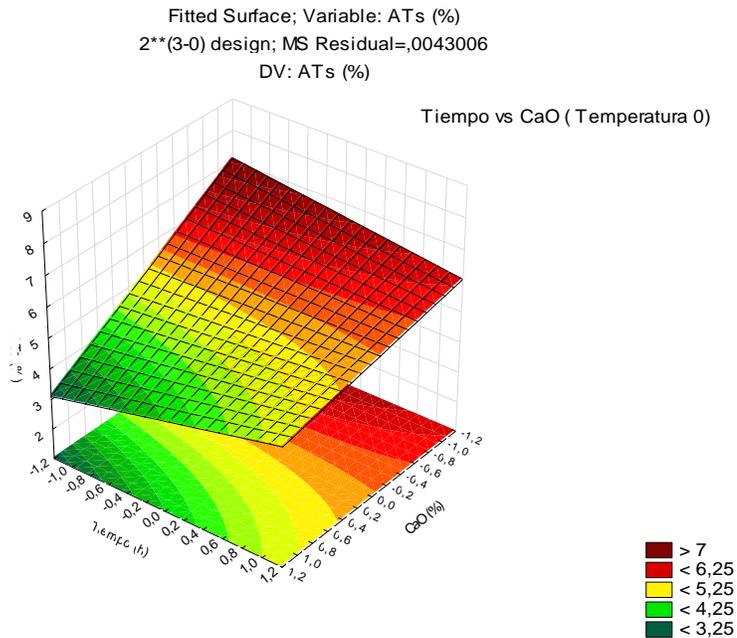


Gráfico 44. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 117°C.

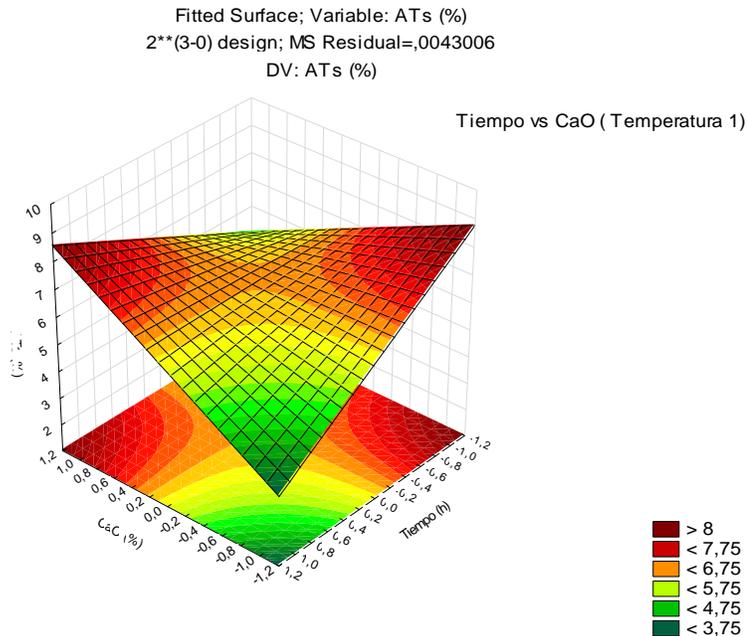


Gráfico 45. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 140°C.

Azúcares reductores sacarificación

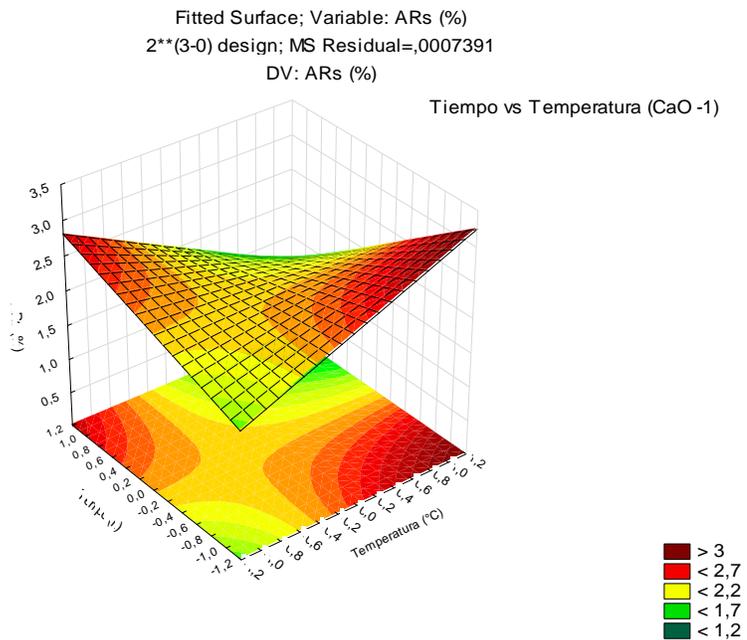


Gráfico 46. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 1% de CaO.

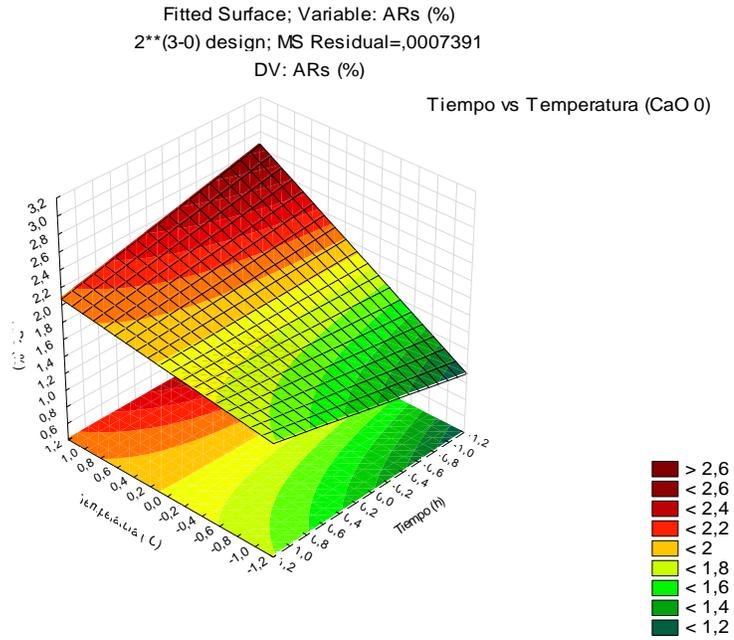


Gráfico 47. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 5% de CaO.

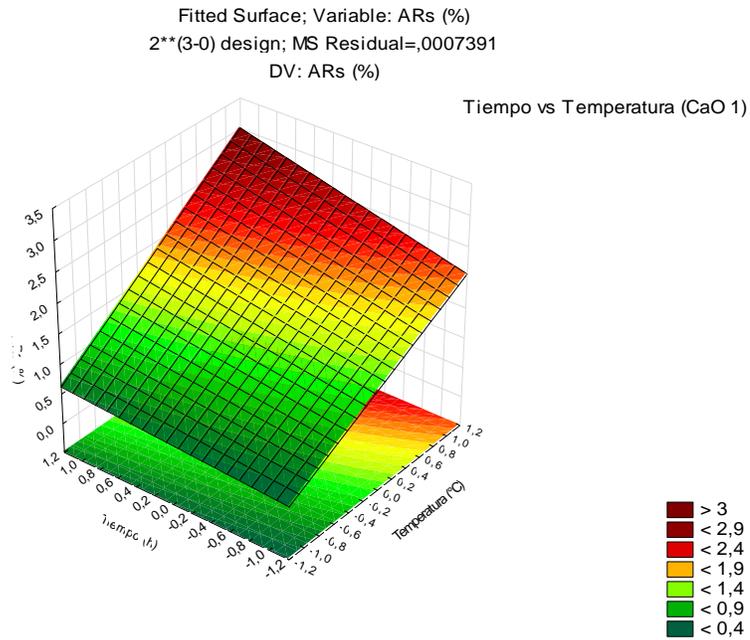


Gráfico 48. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 10% de CaO.

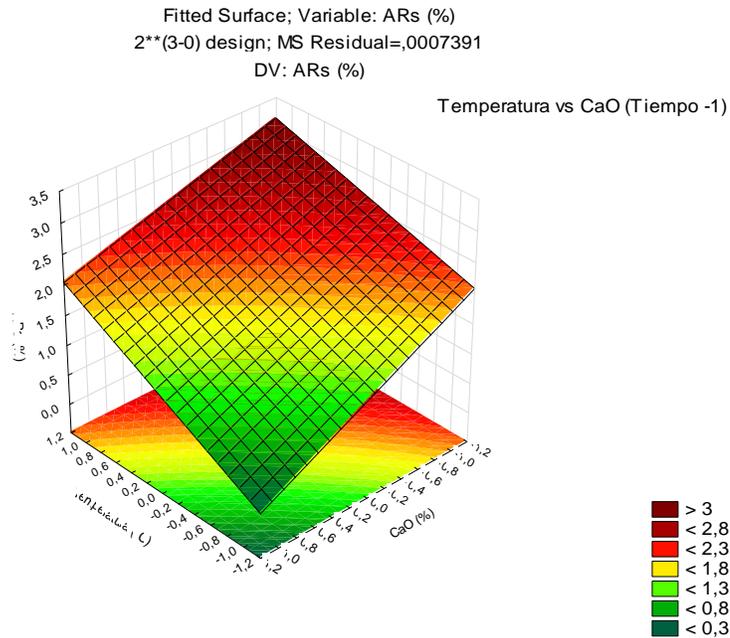


Gráfico 49. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) 1 h de tiempo de reacción.

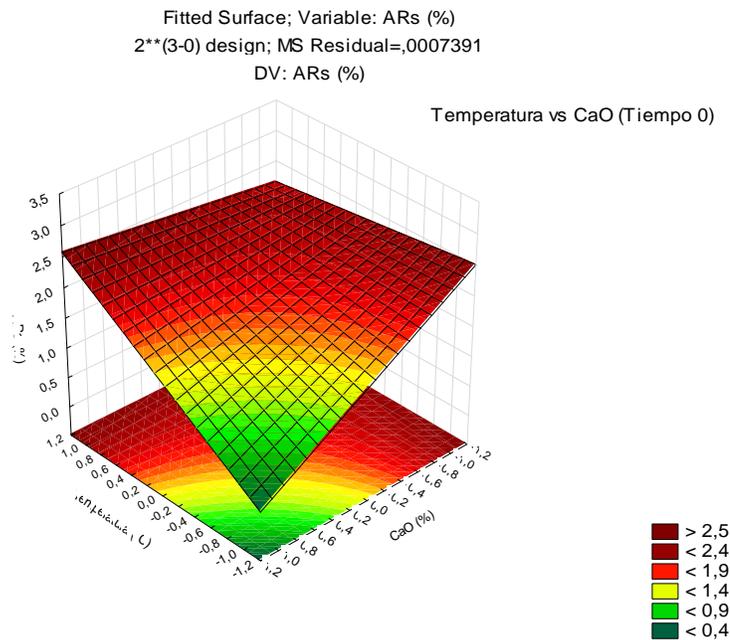


Gráfico 50. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.

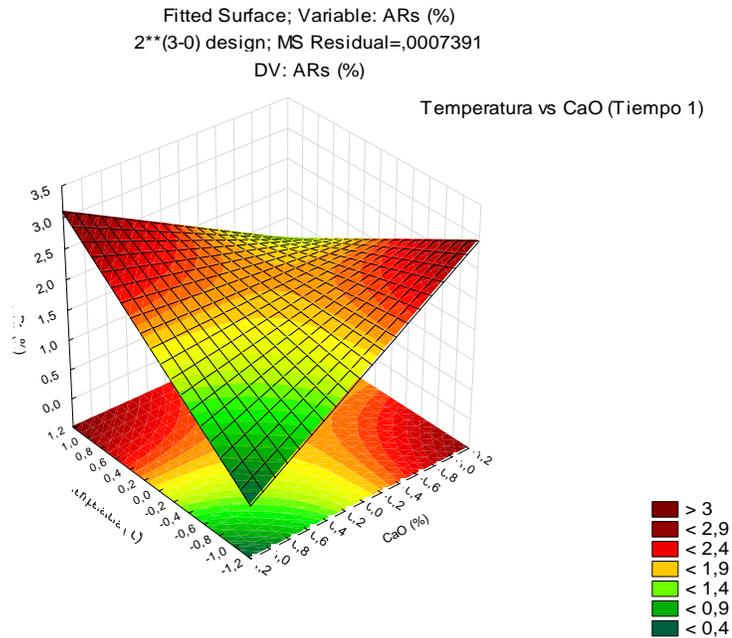


Gráfico 51. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) 3 h de tiempo de reacción.

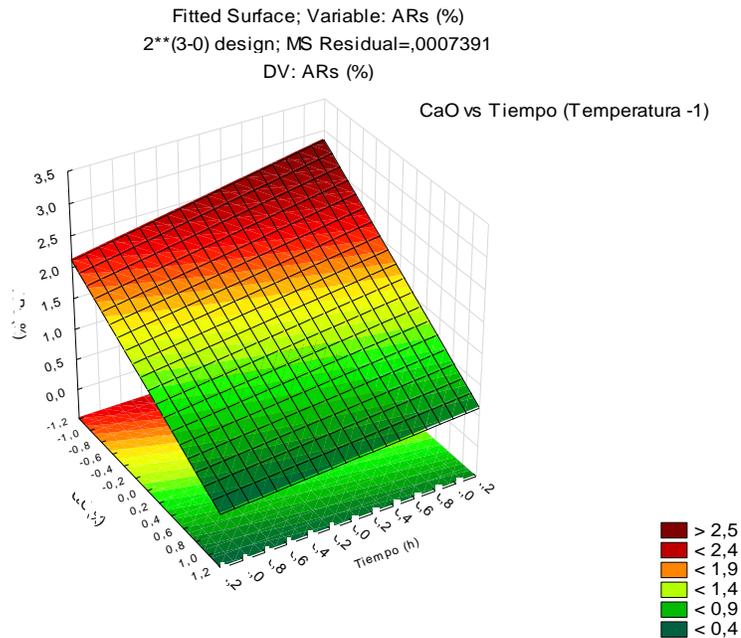


Gráfico 52. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) a 93 °C.

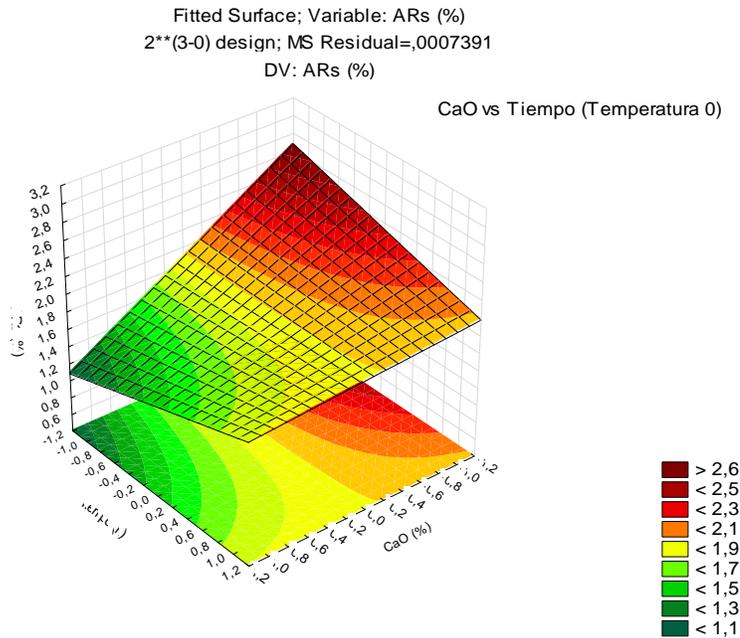


Gráfico 53. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) a 117°C.

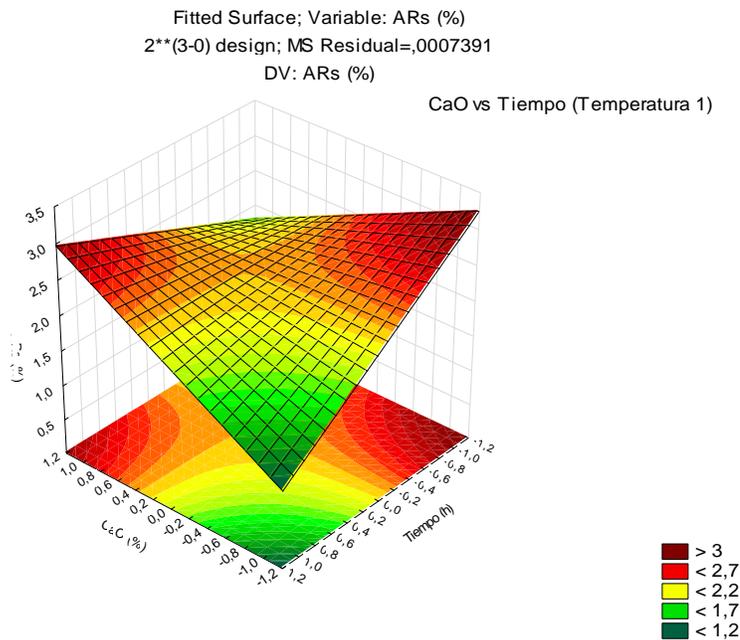


Gráfico 54. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) a 140°C.

Tablas del Análisis de Varianza (ANOVA) del diseño de experimentos factorial completo del pretratamiento básico en madera de Apapaxco.

Tabla 15. ANOVA; Variable: Azúcares Totales generados en la sacarificación posterior al pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0,01484	1	0,01484	3,452	0,204295
(1)Temperatura (°C)	11,45693	1	11,45693	2664,031	0,000375
(2)Tiempo (h)	0,20024	1	0,20024	46,561	0,020809
(3)CaO (%)	9,24519	1	9,24519	2149,745	0,000465
1 by 2	2,05705	1	2,05705	478,316	0,002084
1 by 3	14,25004	1	14,25004	3313,500	0,000302
2 by 3	1,92750	1	1,92750	448,194	0,002224
1*2*3	8,42685	1	8,42685	1959,459	0,000510
Error	0,00860	2	0,00430		
Total SS	47,58724	10			

Tabla 16. ANOVA; Variable: Azúcares Reductores generados en la sacarificación posterior al pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0,164490	1	0,164490	222,548	0,004463
(1)Temperatura (°C)	1,243829	1	1,243829	1682,842	0,000594
(2)Tiempo (h)	0,000058	1	0,000058	0,079	0,805129
(3)CaO (%)	1,095206	1	1,095206	1481,763	0,000674
1 by 2	0,337040	1	0,337040	456,000	0,002186
1 by 3	1,646923	1	1,646923	2228,211	0,000448
2 by 3	0,483212	1	0,483212	653,763	0,001526
1*2*3	0,868509	1	0,868509	1175,053	0,000850
Error	0,001478	2	0,000739		
Total SS	5,840747	10			

Tabla 17. ANOVA; Variable: Azúcares Totales generados en el pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	9,11670	1	9,116695	1118,144	0,000893
(1)Temperatura (°C)	0,49207	1	0,492067	60,351	0,016169
(2)Tiempo (h)	0,04541	1	0,045408	5,569	0,142230
(3)CaO (%)	2,27996	1	2,279958	279,632	0,003557
1 by 2	4,81582	1	4,815822	590,651	0,001689
1 by 3	0,00198	1	0,001983	0,243	0,670738
2 by 3	0,09740	1	0,097402	11,946	0,074478
1*2*3	0,06857	1	0,068570	8,410	0,101181
Error	0,01631	2	0,008153		
Total SS	16,93421	10			

Tabla 18. ANOVA; Variable: Lignina soluble en el pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0,158299	1	0,158299	33,85215	0,028293
(1)Temperatura (°C)	0,041053	1	0,041053	8,77907	0,097528
(2)Tiempo (h)	0,003294	1	0,003294	0,70450	0,489615
(3)CaO (%)	0,006125	1	0,006125	1,30984	0,370921
1 by 2	0,130694	1	0,130694	27,94873	0,033967
1 by 3	0,043514	1	0,043514	9,30539	0,092755
2 by 3	0,024406	1	0,024406	5,21912	0,149731
1*2*3	0,013929	1	0,013929	2,97876	0,226506
Error	0,009352	2	0,004676		
Total SS	0,430666	10			

Tabla 19. Coeficientes de regresión para azúcares totales del pretratamiento básico de Apapaxco. Factores en rojo presentan diferencia significativa. Var.: ATP (%); R-sqr=0,99904

Factor	Regressn Coeff.	Std. Err.	t(2)	p	-95,% Cnf. Limt	+95,% Cnf. Limt
Mean/Interc.	2,649455	0,031925	82,9911	0,000145	2,512095	2,786816
Curvatr	2,044134	0,061131	33,4387	0,000893	1,781109	2,307159
(1)Temperatura	-0,248009	0,031925	-7,7686	0,016169	-0,385369	-0,110649
(2)Tiempo (h)	-0,075339	0,031925	-2,3599	0,142230	-0,212699	0,062021
(3) CaO (%)	-0,533849	0,031925	-16,7222	0,003557	-0,671209	-0,396489
1 by 2	-0,775872	0,031925	-24,3033	0,001689	-0,913233	-0,638512
1 by 3	0,015743	0,031925	0,4931	0,670738	-0,121617	0,153104
2 by 3	0,110342	0,031925	3,4563	0,074478	-0,027019	0,247702
1*2*3	0,092581	0,031925	2,9000	0,101181	-0,044779	0,229941

Tablas del coeficientes de regresión del diseño de experimento factorial completo del pretratamiento básico en madera de Apapaxco.

Tabla 20. Coeficientes de regresión para lignina soluble del pretratamiento básico de Apapaxco. Factores en rojo presentan diferencia significativa. Var.: LS (%); R-sqr=0,97828.

Factor	Regressn Coeff.	Std. Err.	t(2)	p	-95,% Cnf. Limt	+95,% Cnf. Limt
Mean/Interc.	0,516108	0,024177	21,34712	0,002187	0,412083	0,620133
Curvatr	0,269358	0,046295	5,81826	0,028293	0,070165	0,468551
(1)Temperatura	-0,071635	0,024177	-2,96295	0,097528	-0,175660	0,032390
(2)Tiempo (h)	-0,020293	0,024177	-0,83935	0,489615	-0,124318	0,083732
(3) CaO (%)	-0,027670	0,024177	-1,14448	0,370921	-0,131695	0,076355
1 by 2	-0,127815	0,024177	-5,28666	0,033967	-0,231840	-0,023790
1 by 3	0,073751	0,024177	3,05047	0,092755	-0,030274	0,177776
2 by 3	0,055233	0,024177	2,28454	0,149731	-0,048792	0,159258
1*2*3	-0,041727	0,024177	-1,72591	0,226506	-0,145752	0,062298

Tabla 21. Coeficientes de regresión para azúcares totales de la sacarificación posterior al pretratamiento básico de Apapaxco. Factores en rojo presentan diferencia significativa. Var.: ATs (%); R-sqr=0,99982

Factor	Regressn Coeff.	Std. Err.	t(2)	p	-95,% Cnf. Limt	+95,% Cnf. Limt
Mean/Interc.	5,27981	0,023186	227,7186	0,000019	5,18005	5,379567
Curvatr	0,08249	0,044397	1,8579	0,204295	-0,10854	0,273511
(1)Temperatura	1,19671	0,023186	51,6142	0,000375	1,09695	1,296470
(2)Tiempo (h)	0,15821	0,023186	6,8236	0,020809	0,05845	0,257969
(3) CaO (%)	-1,07501	0,023186	-46,3653	0,000465	-1,17477	-0,975251
1 by 2	-0,50708	0,023186	-21,8704	0,002084	-0,60684	-0,407321
1 by 3	1,33464	0,023186	57,5630	0,000302	1,23488	1,434396
2 by 3	0,49085	0,023186	21,1706	0,002224	0,39109	0,590614
1*2*3	1,02633	0,023186	44,2658	0,000510	0,92657	1,126091

Tabla 22. Coeficientes de regresión para azúcares reductores de la sacarificación posterior al pretratamiento básico de Apapaxco. Factores en rojo presentan diferencia significativa. Var.: ARs (%); R-sqr=0,99975

Factor	Regressn Coeff.	Std. Err.	t(2)	p	-95,% Cnf. Limt	+95,% Cnf. Limt
Mean/Interc.	1,884737	0,009612	196,0818	0,000026	1,843380	1,926094
Curvatr	0,274575	0,018406	14,9180	0,004463	0,195382	0,353768
(1)Temperatura	0,394308	0,009612	41,0225	0,000594	0,352951	0,435665
(2)Tiempo (h)	0,002701	0,009612	0,2810	0,805129	-0,038656	0,044058
(3) CaO (%)	-0,370001	0,009612	-38,4937	0,000674	-0,411358	-0,328644
1 by 2	-0,205256	0,009612	-21,3542	0,002186	-0,246613	-0,163899
1 by 3	0,453724	0,009612	47,2039	0,000448	0,412367	0,495081
2 by 3	0,245767	0,009612	25,5688	0,001526	0,204410	0,287124
1*2*3	0,329490	0,009612	34,2790	0,000850	0,288133	0,370847

Anexo B. Análisis estadístico del diseño factorial completo del pretratamiento básico de la madera de Hule.

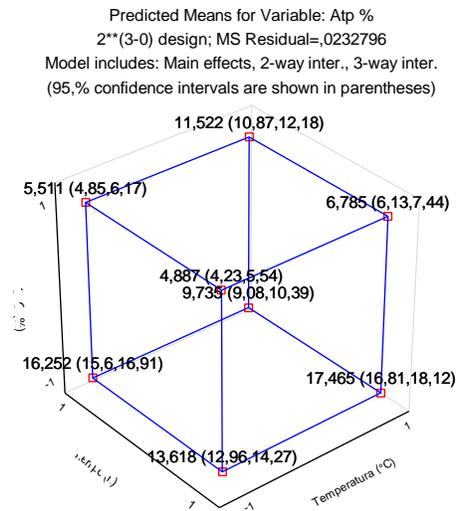


Figura 21. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares totales en el pretratamiento de madera de Hule.

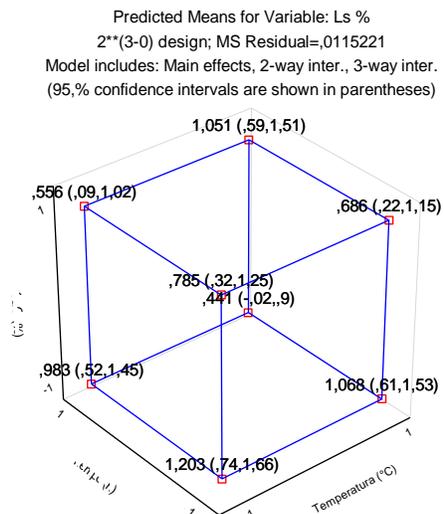


Figura 22. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para lignina en el pretratamiento de madera de Hule.

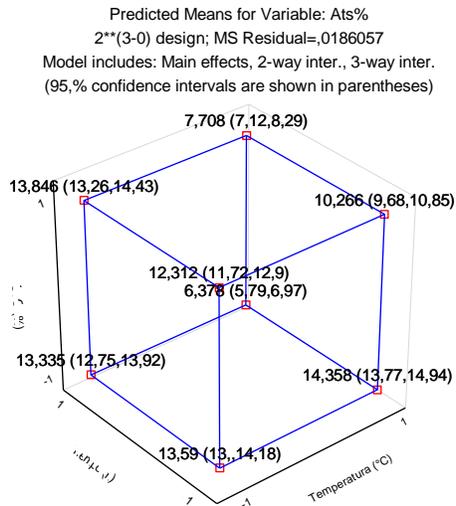


Figura 23. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares totales en la sacarificación enzimática después del pretratamiento de madera de Hule.

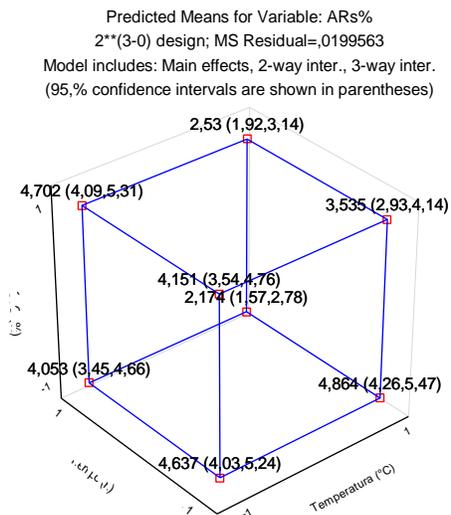


Figura 24. Representación esquemática del modelo 2³ con triple interacción para azúcares reductores en la sacarificación enzimática después del pretratamiento de madera de Hule.

Tablas del Análisis de Varianza (ANOVA) del diseño de experimento factorial completo del pretratamiento básico en madera de Hule.

Tabla 23. ANOVA; Variable: Azúcares Totales generados en el pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatura	57,6944	1	57,6944	2478,322	0,000403
(1)Temperatura(°C)	3,4314	1	3,4314	147,401	0,006716
(2) Tiempo (h)	0,0088	1	0,0088	0,378	0,601428
(3) CaO (%)	100,5732	1	100,5732	4320,225	0,000231
1 by 2	4,8837	1	4,8837	209,786	0,004733
1 by 3	13,9847	1	13,9847	600,729	0,001660
2 by 3	13,6670	1	13,6670	587,081	0,001699
1*2*3	26,1987	1	26,1987	1125,393	0,000887
Error	0,0466	2	0,0233		
Total SS	220,4885	10			

Tabla 24. ANOVA; Variable: Lignina soluble en el pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatura	0,057998	1	0,057998	5,03368	0,154037
(1)Temperatura(°C)	0,009953	1	0,009953	0,86378	0,450798
(2) Tiempo (h)	0,063005	1	0,063005	5,46817	0,144315
(3) CaO (%)	0,047689	1	0,047689	4,13896	0,178896
1 by 2	0,004363	1	0,004363	0,37870	0,600993
1 by 3	0,143733	1	0,143733	12,47456	0,071654
2 by 3	0,120315	1	0,120315	10,44211	0,083891
1*2*3	0,125165	1	0,125165	10,86308	0,081024
Error	0,023044	2	0,011522		
Total SS	0,595266	10			

Tabla 25. ANOVA; Variable: Azúcares Totales generados en la sacarificación posterior al pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatura	3,36854	1	3,36854	181,049	0,005478
(1)Temperatura(°C)	25,82448	1	25,82448	1387,986	0,000720
(2) Tiempo (h)	10,71460	1	10,71460	575,877	0,001732
(3) CaO (%)	1,55710	1	1,55710	83,689	0,011739
1 by 2	17,45191	1	17,45191	937,986	0,001064
1 by 3	0,49745	1	0,49745	26,736	0,035427
2 by 3	6,50215	1	6,50215	349,471	0,002849
1*2*3	1,64868	1	1,64868	88,611	0,011098
Error	0,03721	2	0,01861		
Total SS	67,60213	10			

Tabla 26. ANOVA; Variable: Azúcares Reductores generados en la sacarificación posterior al pretratamiento. Valor de F de tabla F 0.05 (1,2)= 18.51 (Montgomery, 1991). Factores en rojo: Presentan diferencia significativa (significancia del 95%).

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatura	0,022379	1	0,022379	1,1214	0,400613
(1)Temperatura(°C)	2,464214	1	2,464214	123,4803	0,008001
(2) Tiempo (h)	1,736333	1	1,736333	87,0066	0,011299
(3) CaO (%)	0,082057	1	0,082057	4,1118	0,179777
1 by 2	1,676464	1	1,676464	84,0066	0,011695
1 by 3	0,160832	1	0,160832	8,0592	0,104915
2 by 3	0,993747	1	0,993747	49,7961	0,019497
1*2*3	0,037943	1	0,037943	1,9013	0,301894
Error	0,039913	2	0,019956		
Total SS	7,213883	10			

Tablas del coeficientes de regresión del diseño de experimento factorial completo del pretratamiento básico en madera de Hule.

Tabla 27. Coeficientes de regresión para azúcares totales del pretratamiento básico de Hule. Factores en rojo presentan diferencia significativa.

Factor	Regressn Coeff.	Std. Err.	t(2)	p	-95,% Cnf. Limt	+95,% Cnf. Limt
Mean/Interc.	10,72175	0,053944	198,7572	0,000025	10,48965	10,95385
Curvatr.	-5,14230	0,103295	-49,7827	0,000403	-5,58674	-4,69786
(1)Temperatura(°C)	0,65493	0,053944	12,1409	0,006716	0,42283	0,88703
(2) Tiempo (h)	0,03315	0,053944	0,6146	0,601428	-0,19895	0,26526
(3) CaO (%)	-3,54565	0,053944	-65,7284	0,000231	-3,77775	-3,31355
1 by 2	-0,78132	0,053944	-14,4840	0,004733	-1,01343	-0,54922
1 by 3	1,32215	0,053944	24,5098	0,001660	1,09005	1,55426
2 by 3	1,30705	0,053944	24,2297	0,001699	1,07495	1,53915
1*2*3	1,80965	0,053944	33,5469	0,000887	1,57755	2,04175

Tabla 28. Coeficientes de regresión para lignina soluble del pretratamiento básico de Hule. Factores en rojo presentan diferencia significativa.

Factor	Regressn Coeff.	Std. Err.	t(2)	p	-95,% Cnf. Limt	+95,% Cnf. Limt
Mean/Interc.	0,846613	0,037951	22,30820	0,002003	0,683324	1,009902
Curvatr.	-0,163042	0,072670	-2,24359	0,154037	-0,475716	0,149633
(1)Temperatura(°C)	-0,035271	0,037951	-0,92940	0,450798	-0,198560	0,128018
(2) Tiempo (h)	-0,088745	0,037951	-2,33841	0,144315	-0,252033	0,074544
(3) CaO (%)	-0,077209	0,037951	-2,03444	0,178896	-0,240498	0,086080
1 by 2	0,023355	0,037951	0,61539	0,600993	-0,139934	0,186643
1 by 3	0,134040	0,037951	3,53193	0,071654	-0,029249	0,297328
2 by 3	0,122635	0,037951	3,23143	0,083891	-0,040654	0,285924
1*2*3	0,125083	0,037951	3,29592	0,081024	-0,038206	0,288372

Tabla 29. Coeficientes de regresión para azúcares totales de la sacarificación posterior al pretratamiento básico de Hule. Factores en rojo presentan diferencia significativa.

Factor	Regressn Coeff.	Std. Err.	t(2)	P	-95,% Cnf. Limt	+95,% Cnf. Limt
Mean/Interc.	11,47406	0,048226	237,9244	0,000018	11,26656	11,68156
Curvatr.	-1,24254	0,092345	-13,4554	0,005478	-1,63987	-0,84522
(1)Temperatura(°C)	-1,79668	0,048226	-37,2557	0,000720	-2,00418	-1,58918
(2) Tiempo (h)	-1,15729	0,048226	-23,9974	0,001732	-1,36479	-0,94979
(3) CaO (%)	-0,44118	0,048226	-9,1482	0,011739	-0,64868	-0,23368
1 by 2	-1,47699	0,048226	-30,6266	0,001064	-1,68448	-1,26949
1 by 3	-0,24936	0,048226	-5,1707	0,035427	-0,45686	-0,04186
2 by 3	0,90154	0,048226	18,6941	0,002849	0,69404	1,10904
1*2*3	0,45397	0,048226	9,4134	0,011098	0,24647	0,66146

Tabla 30. Coeficientes de regresión para azúcares reductores de la sacarificación posterior al pretratamiento básico de Hule. Factores en rojo presentan diferencia significativa.

Factor	Regressn Coeff.	Std. Err.	t(2)	P	-95,% Cnf. Limt	+95,% Cnf. Limt
Mean/Interc.	3,830619	0,049945	76,6961	0,000170	3,615721	4,045516
Curvatr.	-0,101278	0,095638	-1,0590	0,400613	-0,512775	0,310220
(1)Temperatura(°C)	-0,555002	0,049945	-11,1122	0,008001	-0,769899	-0,340104
(2) Tiempo (h)	-0,465877	0,049945	-9,3277	0,011299	-0,680775	-0,250980
(3) CaO (%)	-0,101278	0,049945	-2,0278	0,179777	-0,316175	0,113620
1 by 2	-0,457775	0,049945	-9,1655	0,011695	-0,672673	-0,242877
1 by 3	-0,141789	0,049945	-2,8389	0,104915	-0,356686	0,073109
2 by 3	0,352446	0,049945	7,0566	0,019497	0,137549	0,567344
1*2*3	0,068869	0,049945	1,3789	0,301894	-0,146029	0,283767

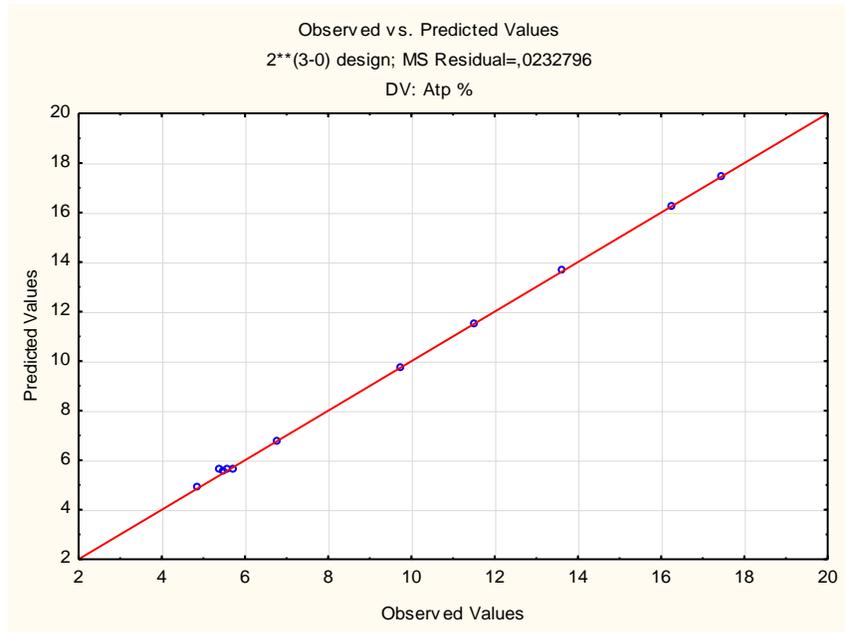


Gráfico 55. Valores predichos contra valores observados de azúcares totales generados en el pretratamiento de residuos de Hule.

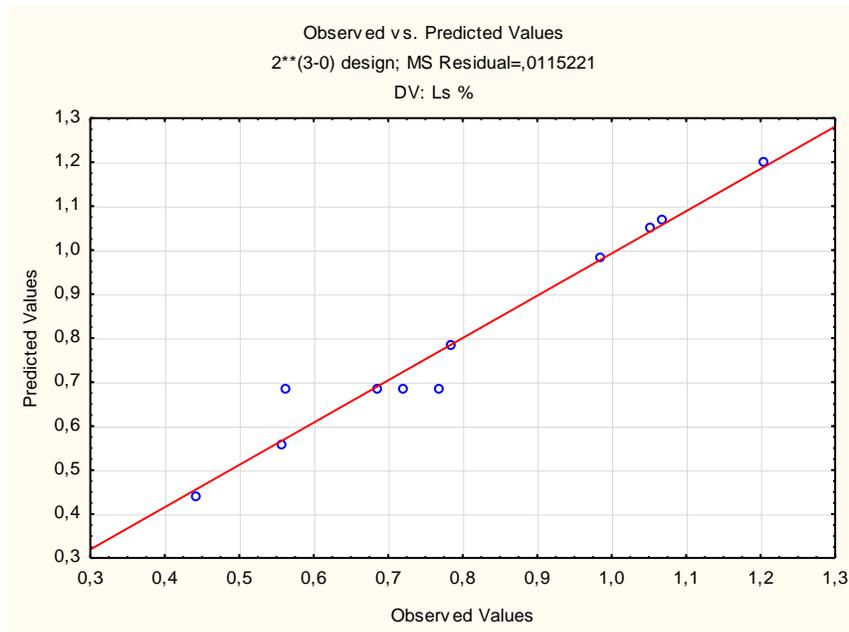


Gráfico 56. Valores predichos contra valores observados de lignina soluble en el pretratamiento de residuos de Hule.

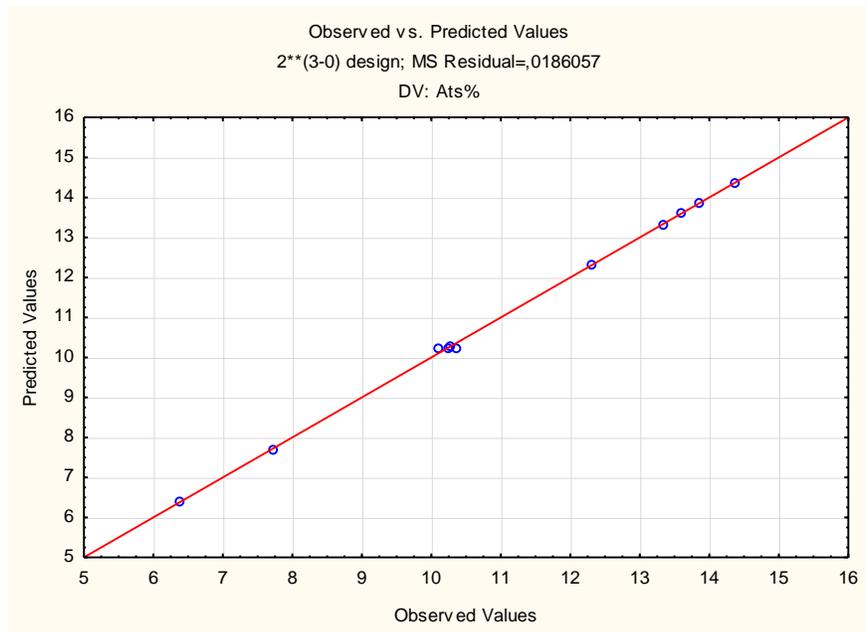


Gráfico 57. Valores predichos contra valores observados de azúcares totales generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento de residuos de Hule.

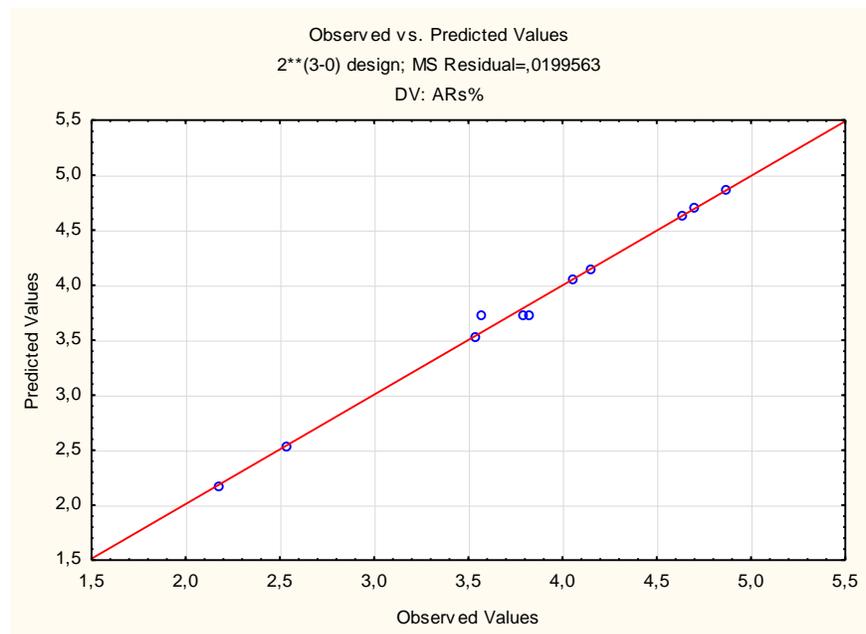


Gráfico 58. Valores predichos contra valores observados de azúcares reductores generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento de residuos de Hule.

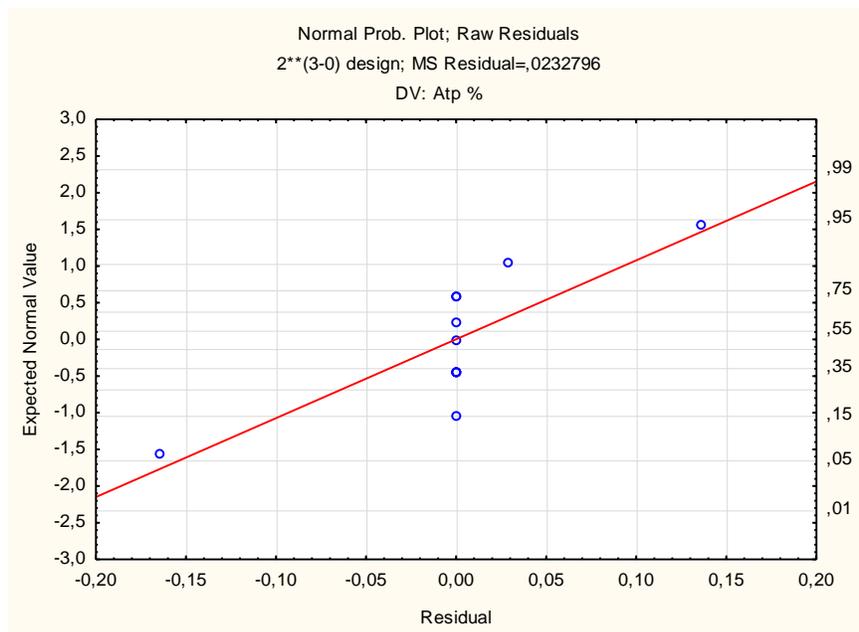


Gráfico 59. Gráfica de probabilidad normal para azúcares totales generados en el pretratamiento básico de residuos de Hule.

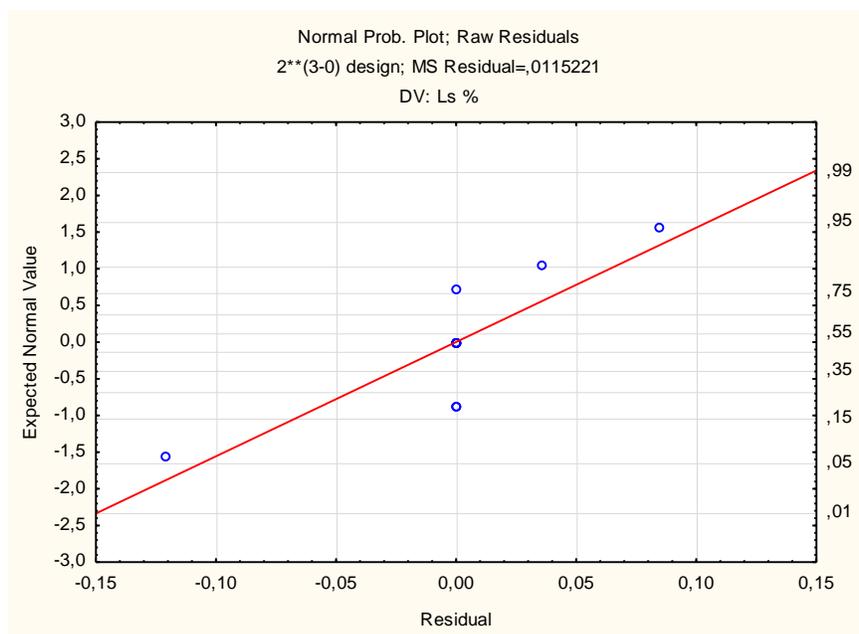


Gráfico 60. Gráfica de probabilidad normal para lignina soluble en el pretratamiento básico de residuos de Hule.

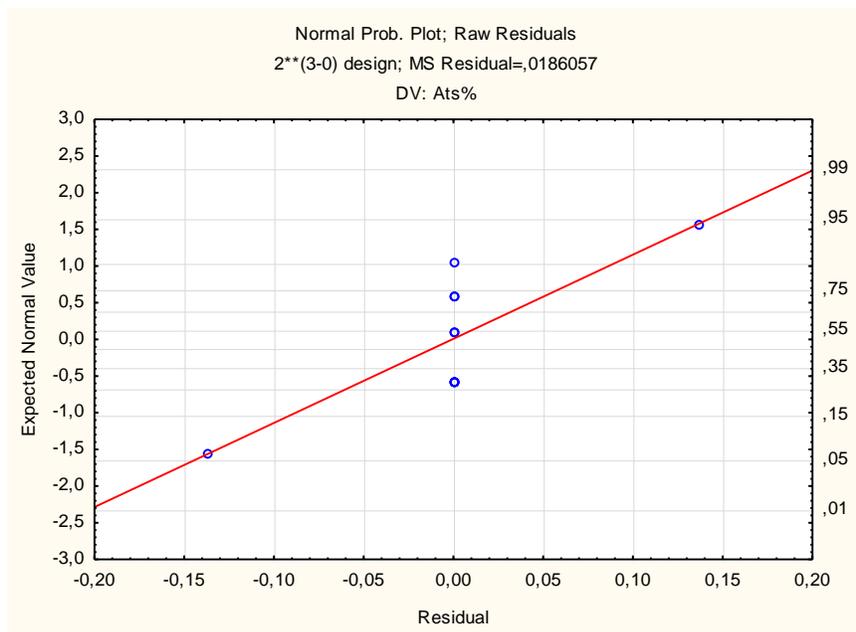


Gráfico 61. Gráfica de probabilidad normal para azúcares totales generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento básico de residuos de Hule.

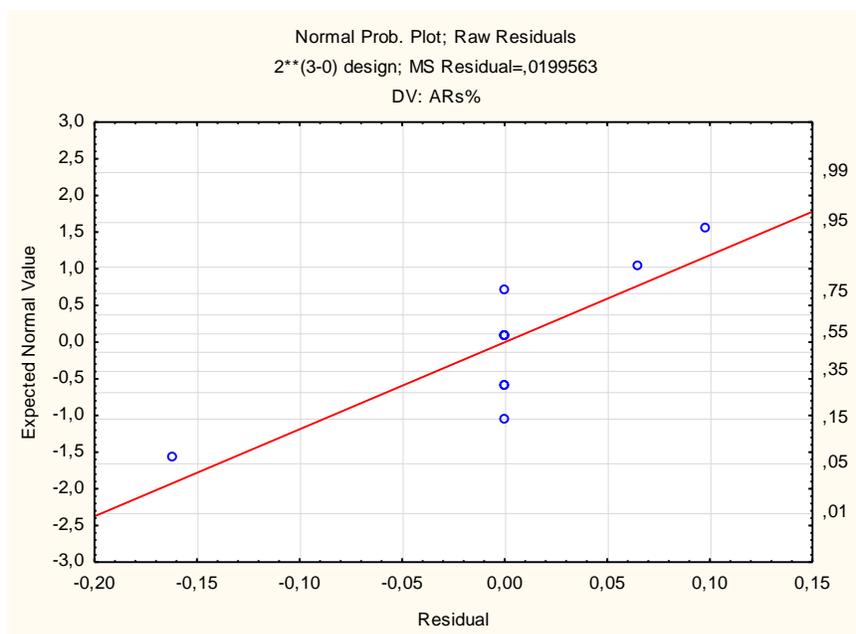


Gráfico 62. Gráfica de probabilidad normal para azúcares reductores generados en la sacarificación enzimática posterior al pretratamiento básico de residuos de Hule.

AZÚCARES TOTALES.

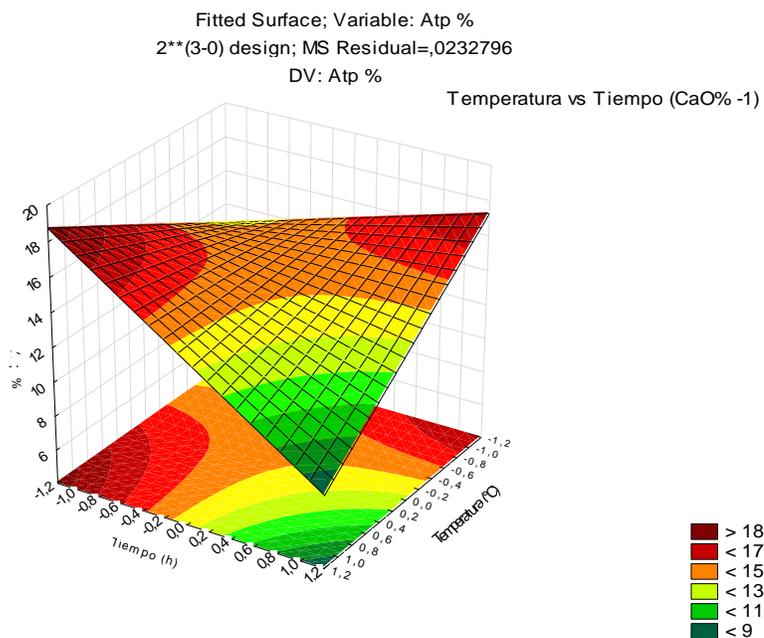


Gráfico 63. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 1% de CaO.

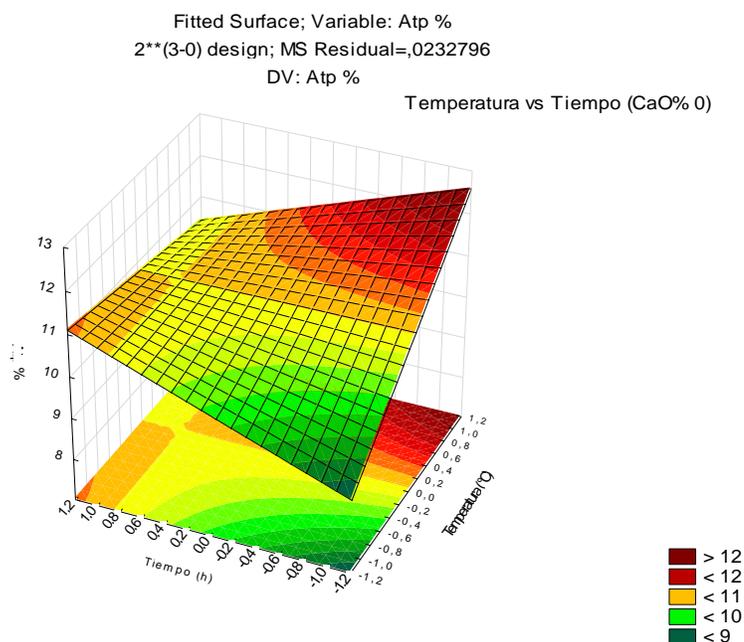


Gráfico 64. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 5% de CaO.

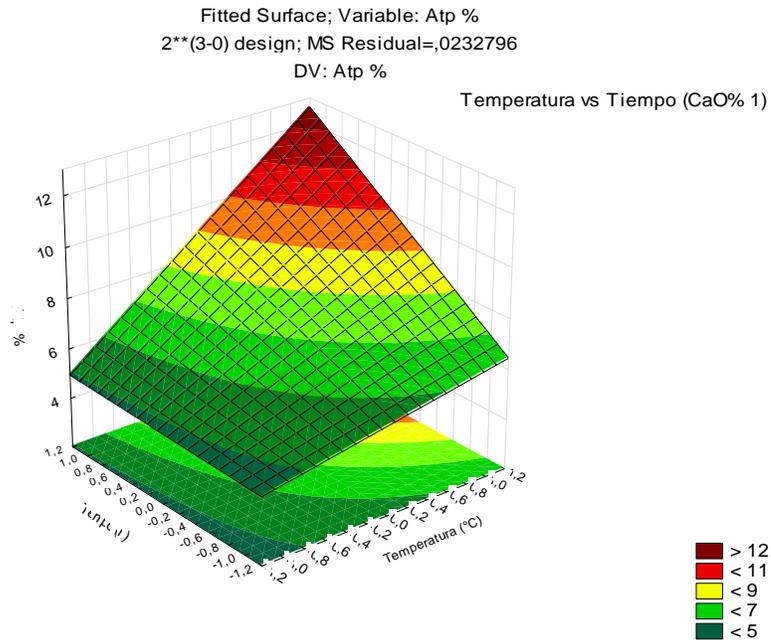


Gráfico 65. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 10% de CaO.

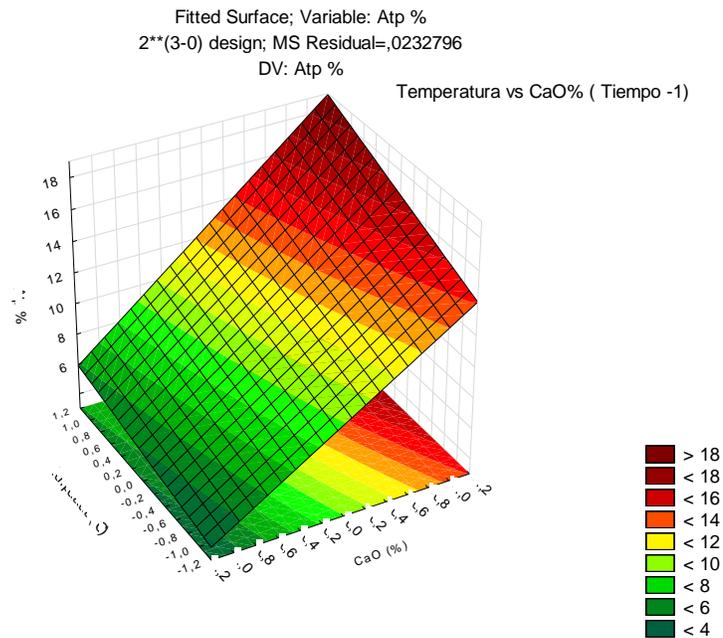


Gráfico 66. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 1 h de tiempo de reacción.

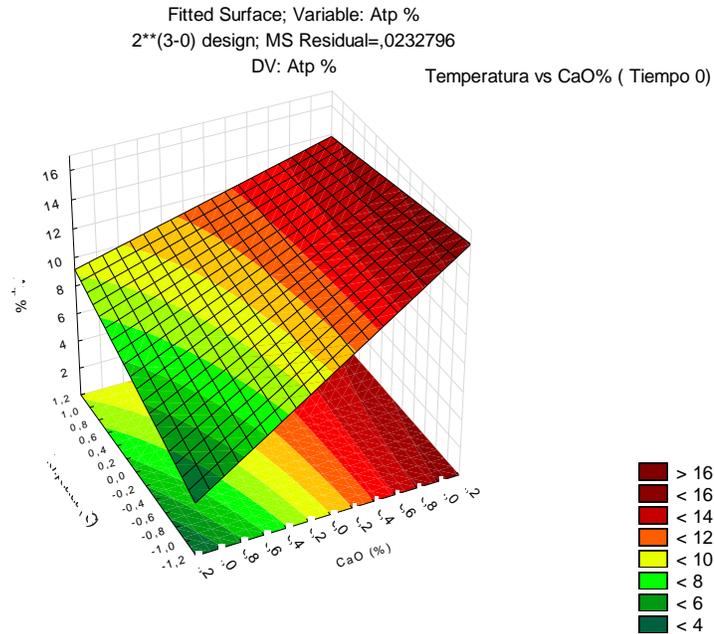


Gráfico 67. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.

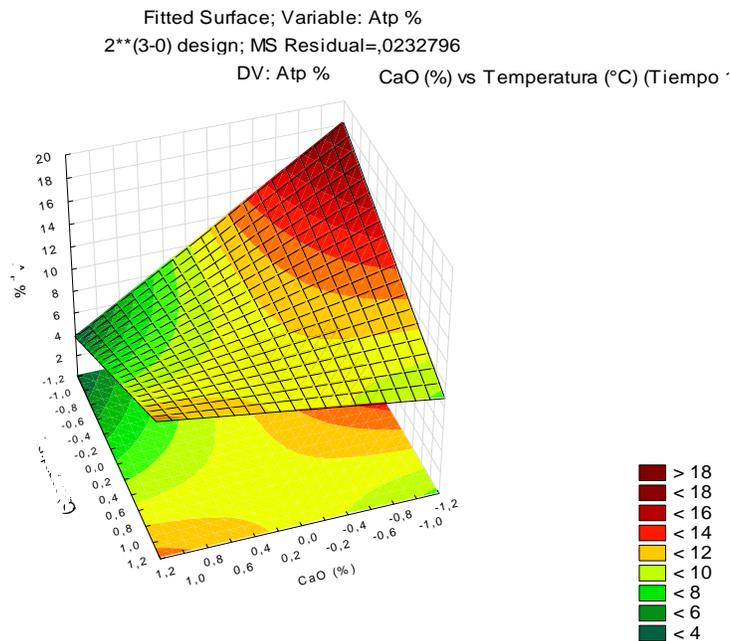


Gráfico 68. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) 3 h de tiempo de reacción.

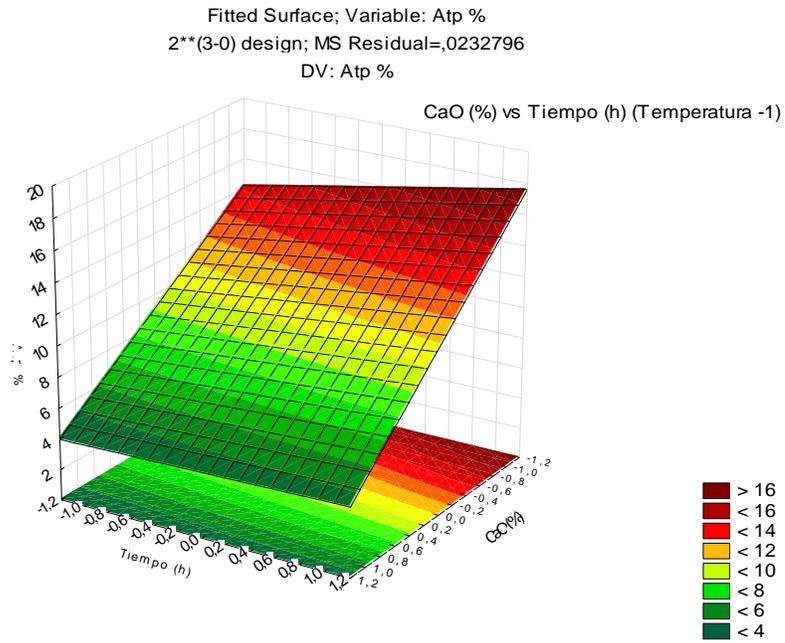


Gráfico 69. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 93°C.

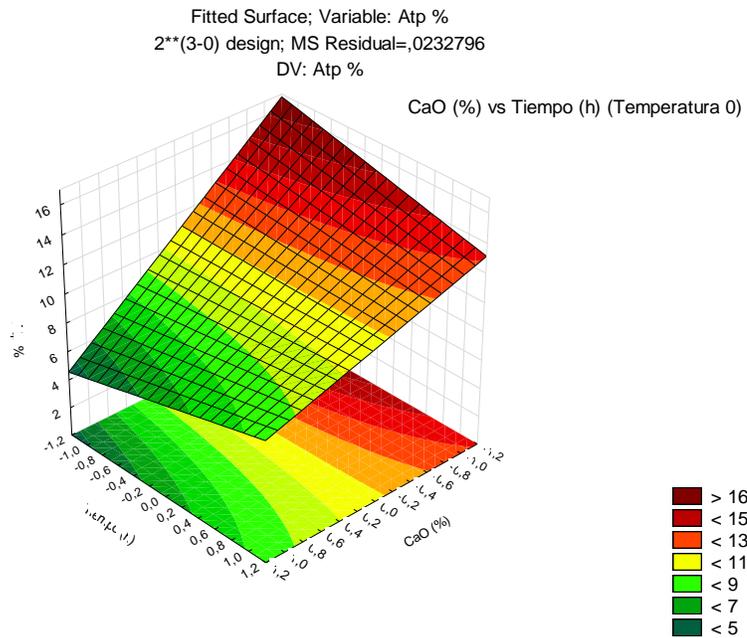


Gráfico 70. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 117°C.

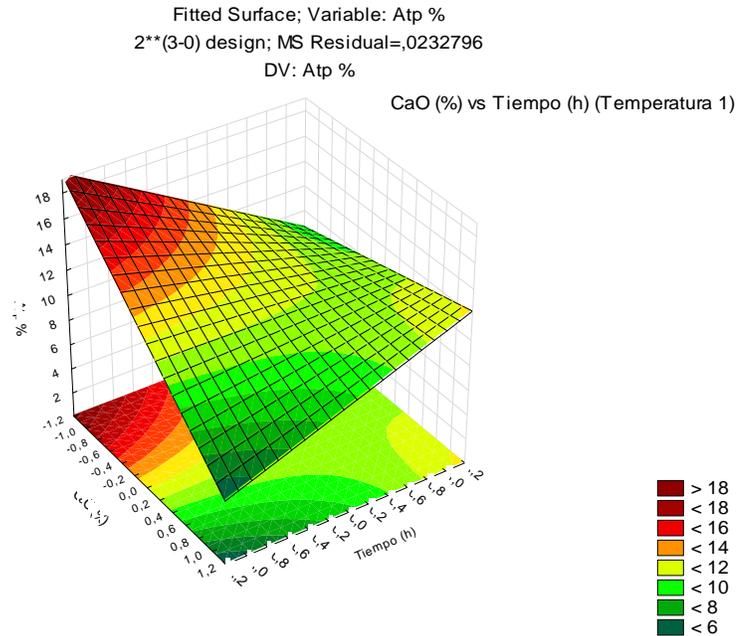


Gráfico 71. Efecto del pretratamiento básico de madera de Apapaxco sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) a 140°C.

LIGNINA SOLUBLE

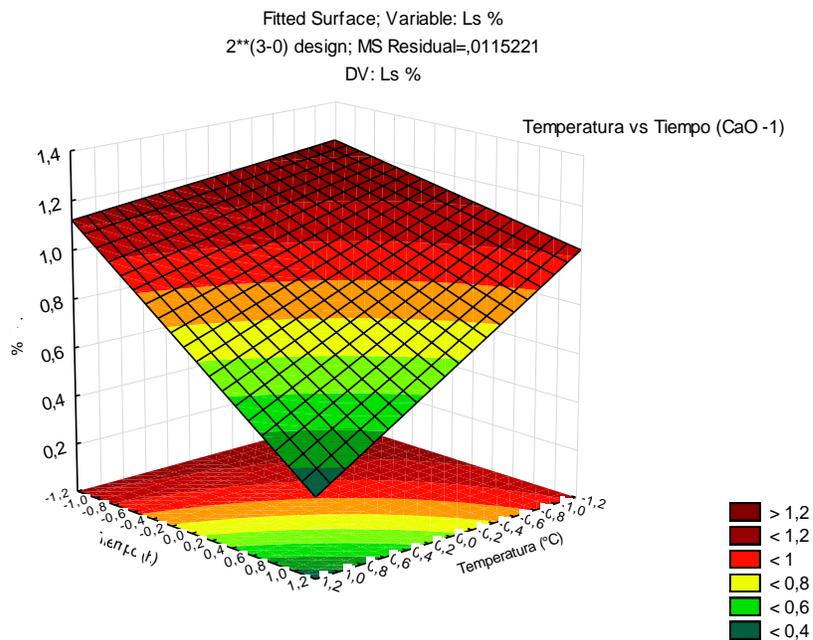


Gráfico 72. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 1% de CaO.

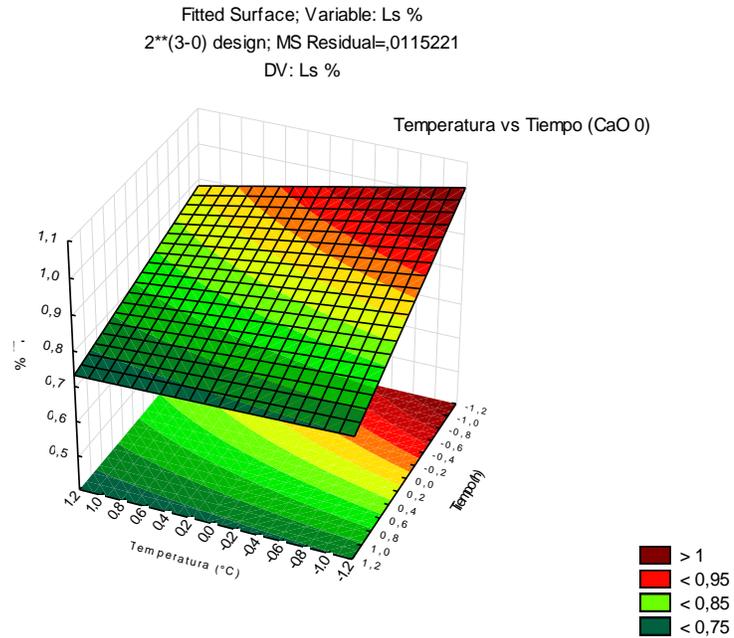


Gráfico 73. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 5% de CaO.

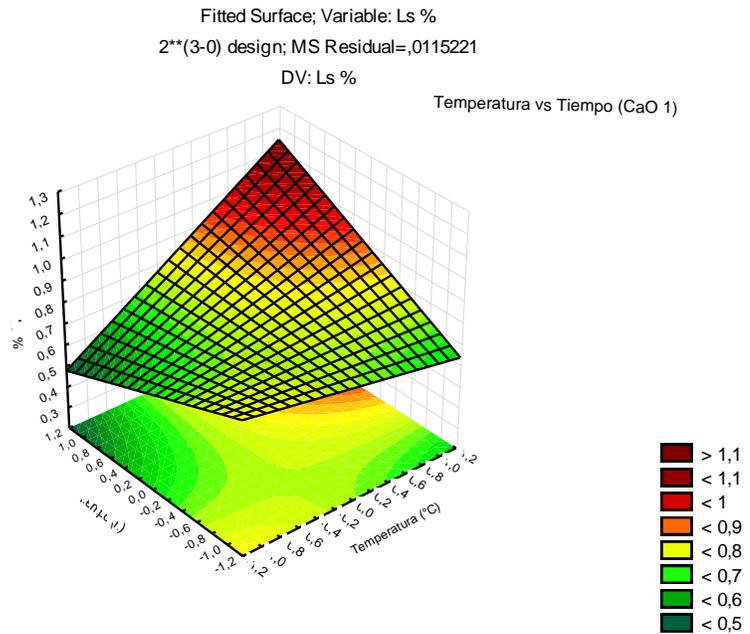


Gráfico 74. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 10% de CaO.

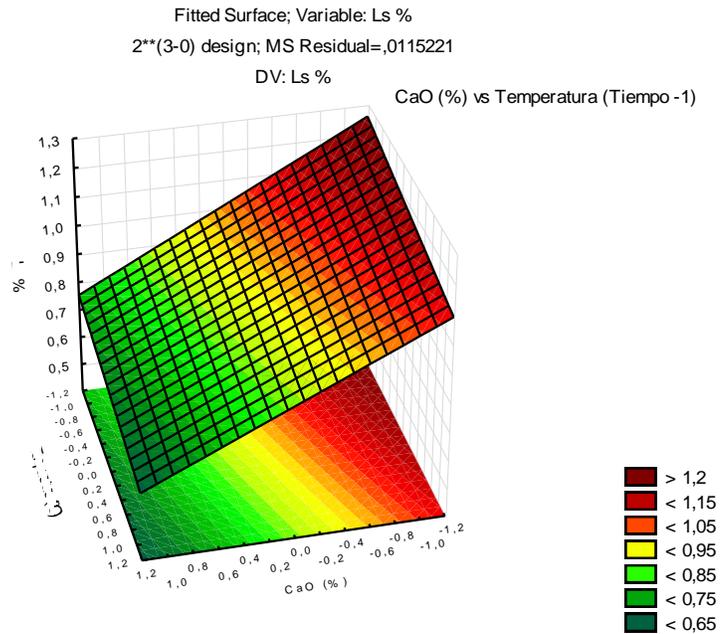


Gráfico 75. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 1 h de tiempo de reacción.

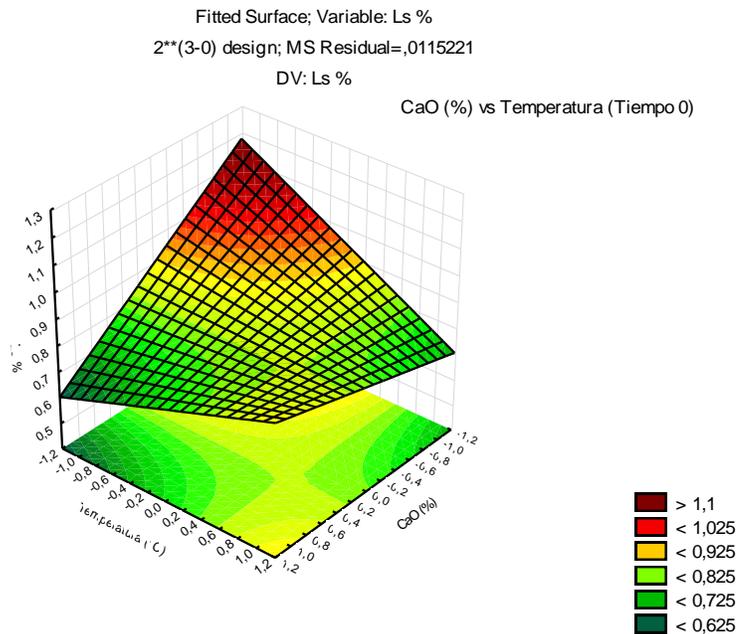


Gráfico 76. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 2 h de tiempo de reacción.

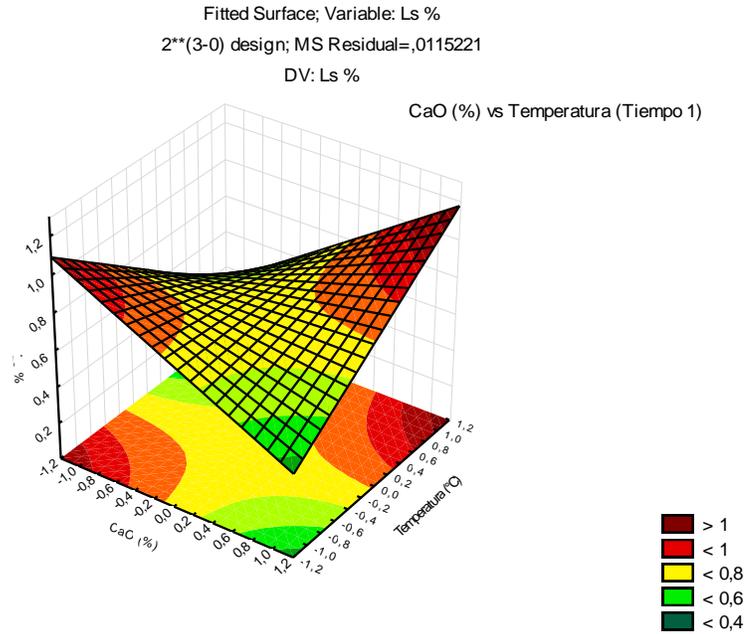


Gráfico 77. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) 3 h de tiempo de reacción.

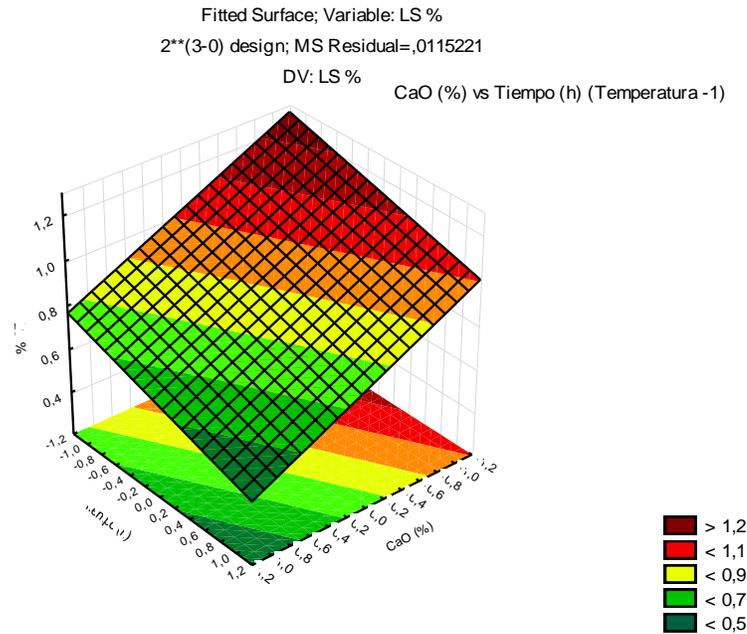


Gráfico 78. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 93°C.

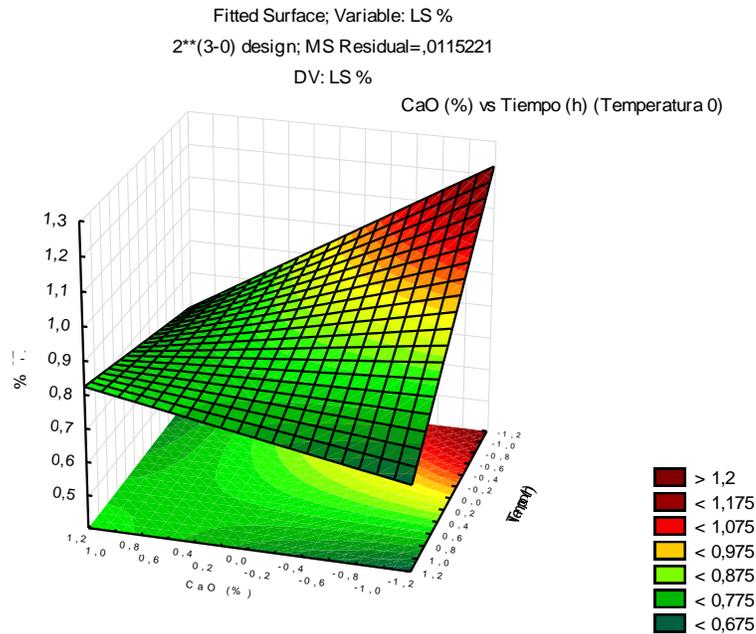


Gráfico 79. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 117°C.

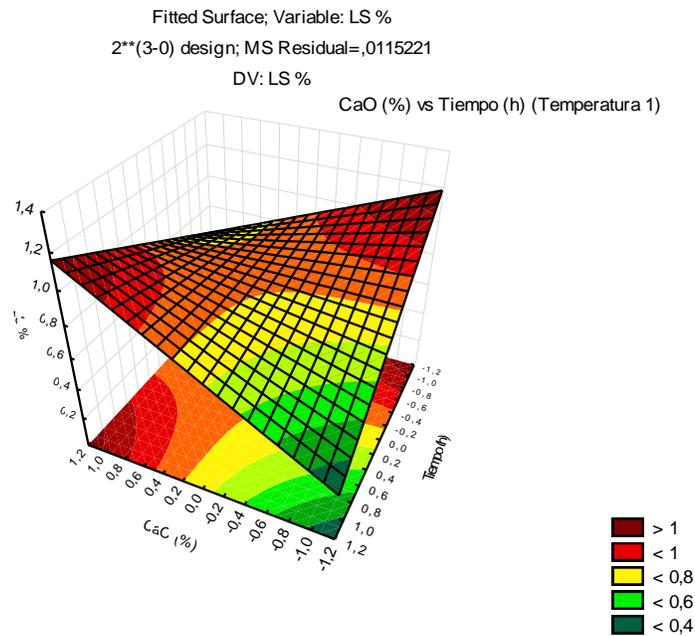


Gráfico 80. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de lignina soluble (%p/p) a 140°C.

AZÚCARES TOTALES SACARIFICACION

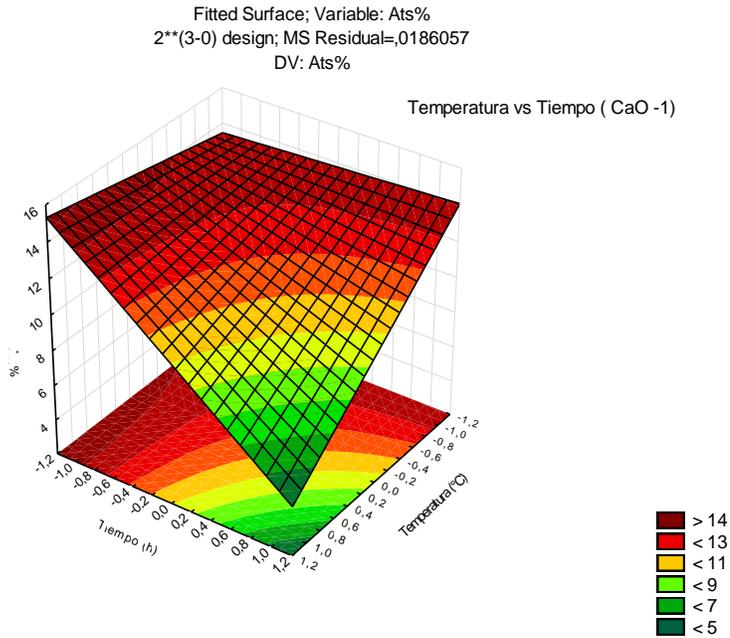


Gráfico 81. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 1% de CaO.

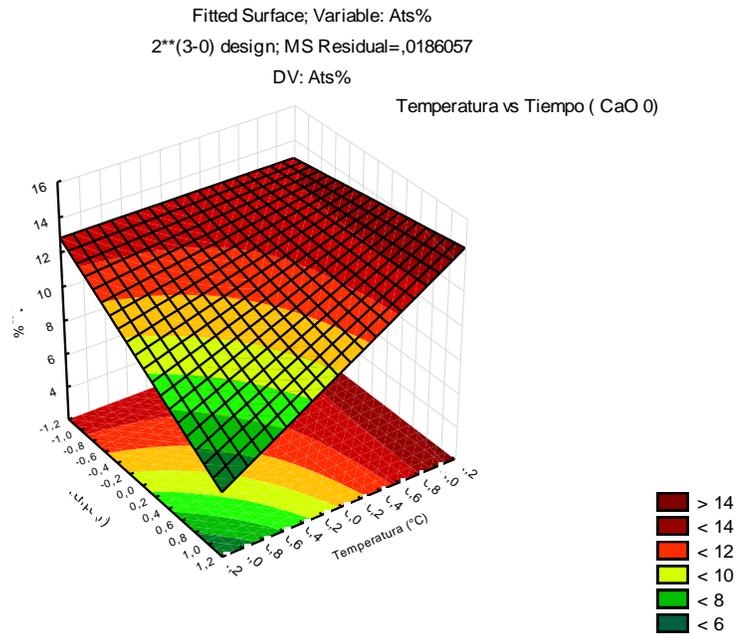


Gráfico 82. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 5% de CaO.

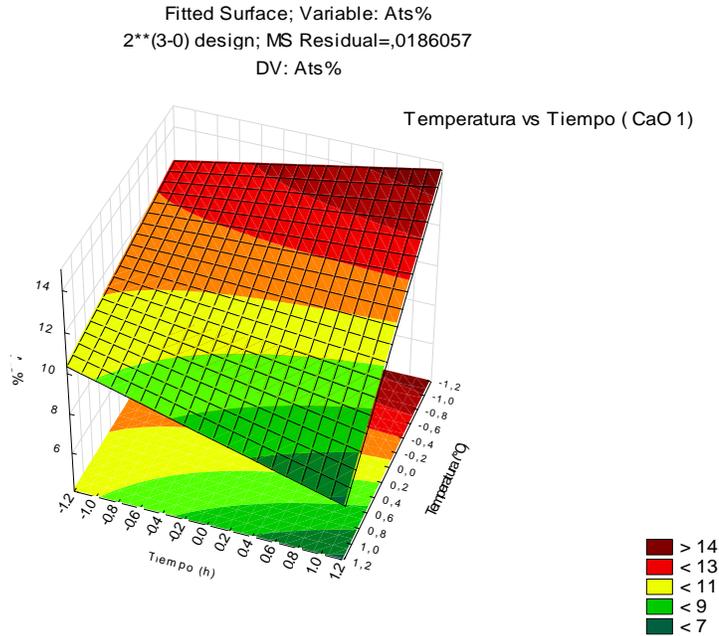


Gráfico 83. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 10% de CaO.

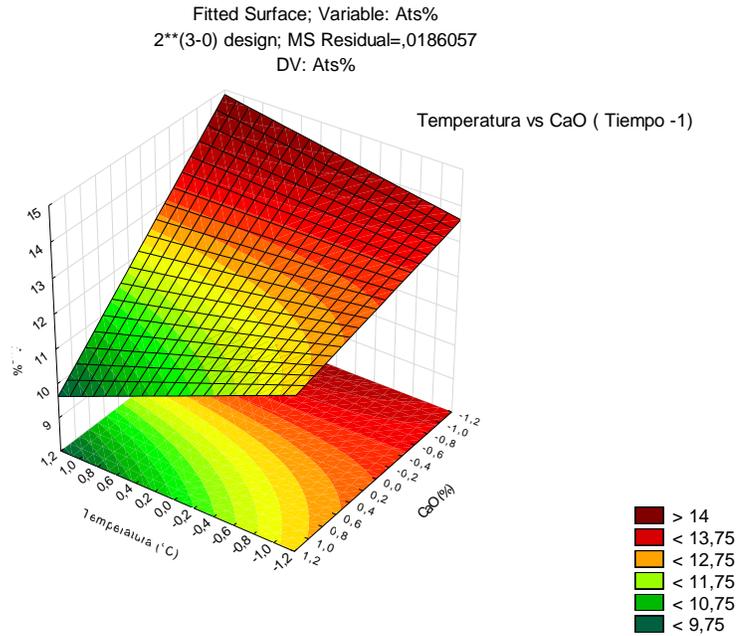


Gráfico 84. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 1 h de tiempo de reacción.

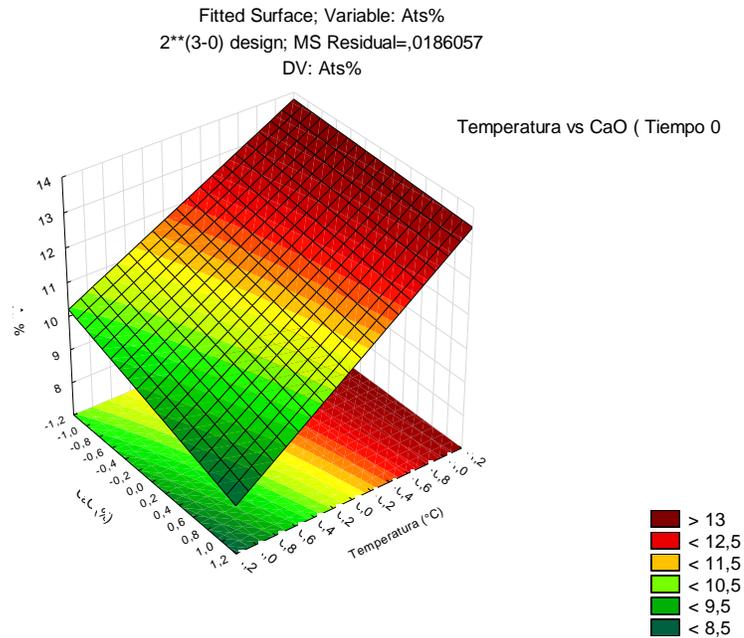


Gráfico 85. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 2 h de tiempo de reacción.

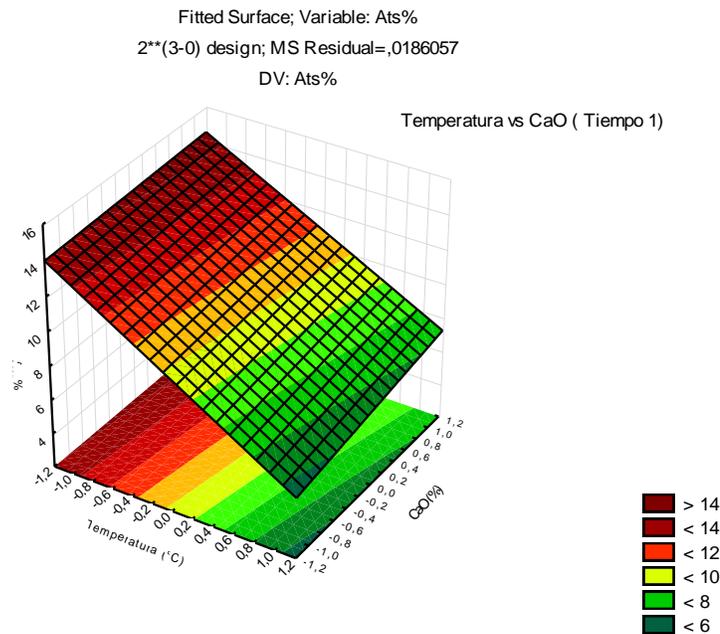


Gráfico 86. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación 3 h de tiempo de reacción.

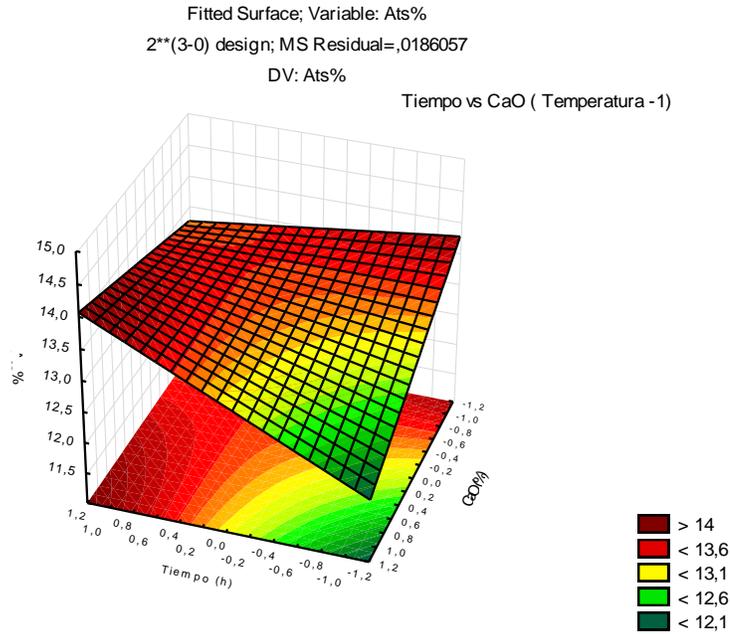


Gráfico 87. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 93°C.

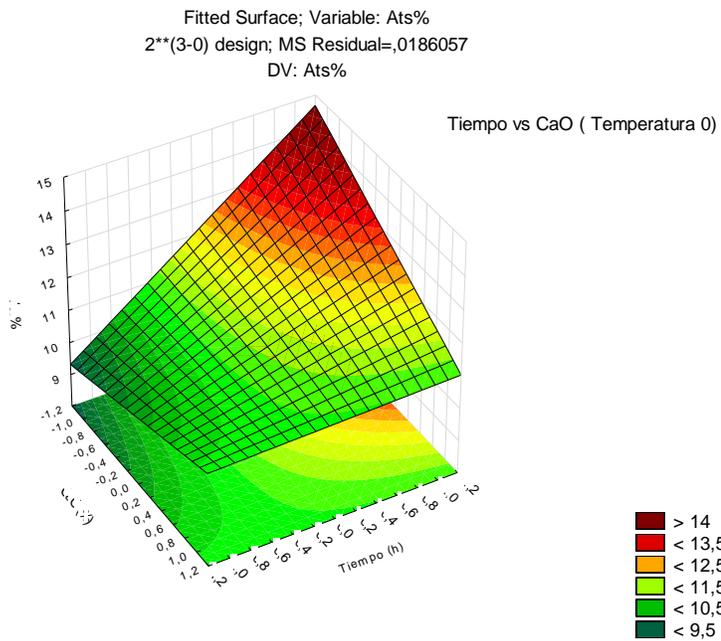


Gráfico 88. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 117°C.

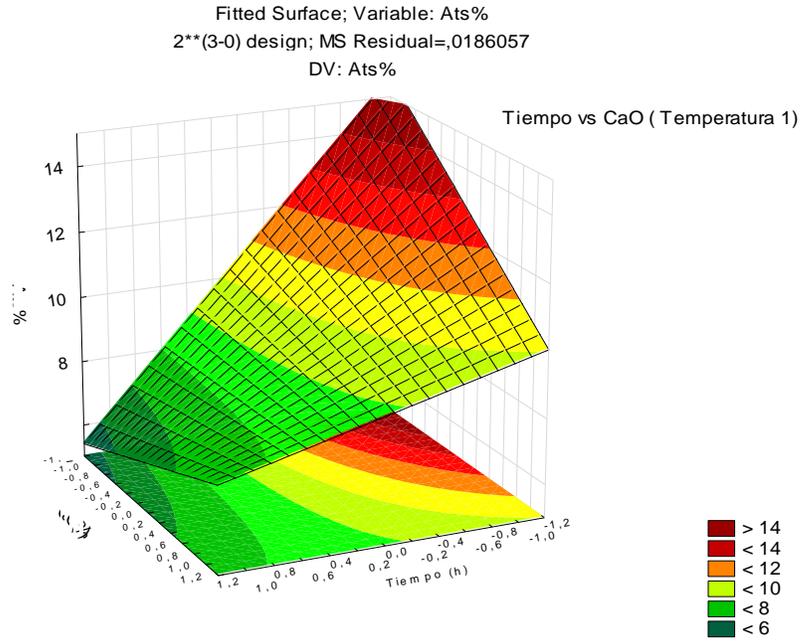


Gráfico 89. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 140°C.

Azúcares reductores sacarificación

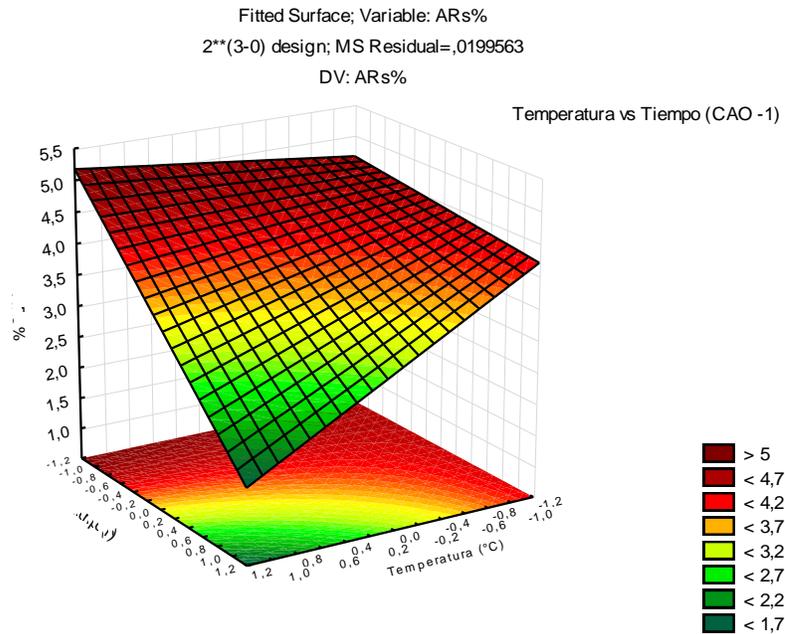


Gráfico 90. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 1% de CaO.

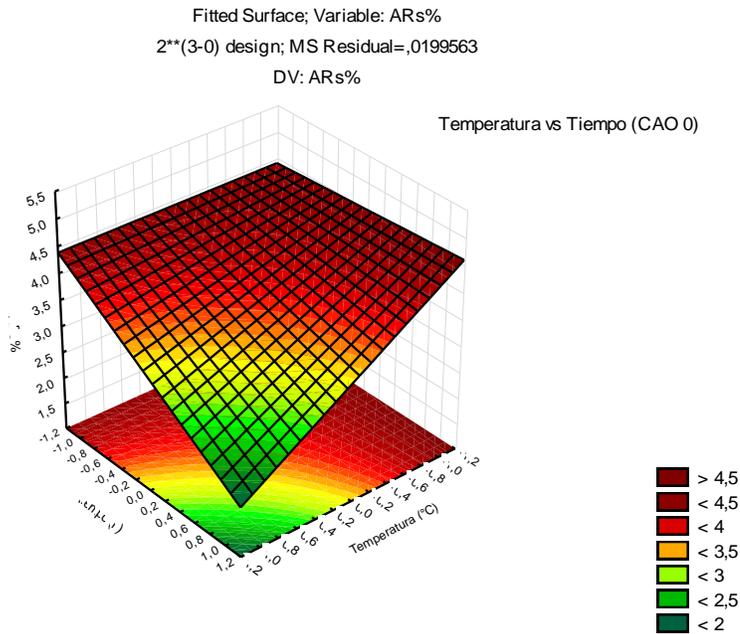


Gráfico 91. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares totales (%p/p) posterior a la sacarificación a 5% de CaO.

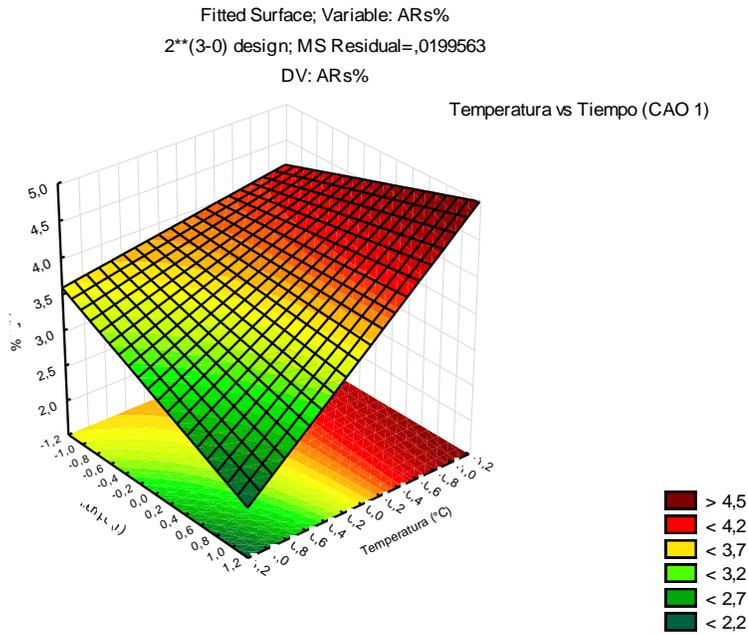


Gráfico 92. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 10% de CaO.

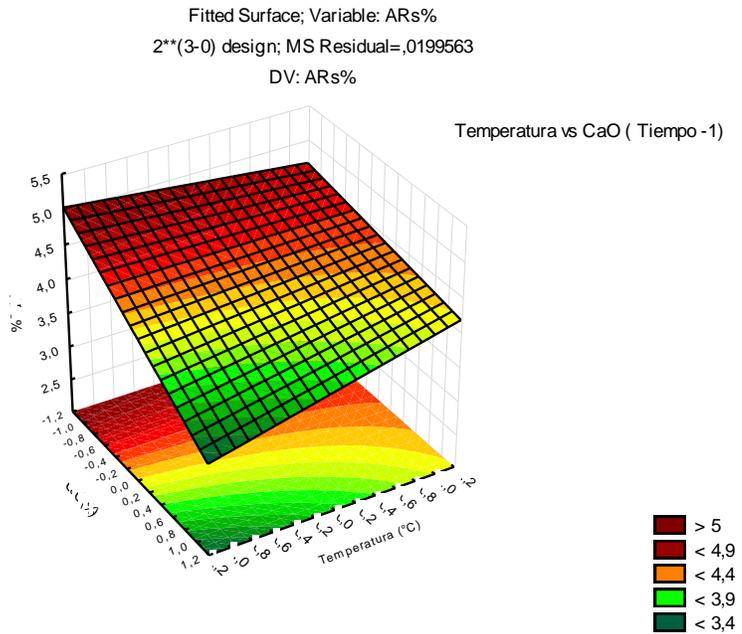


Gráfico 93. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación 1 h de tiempo de reacción.

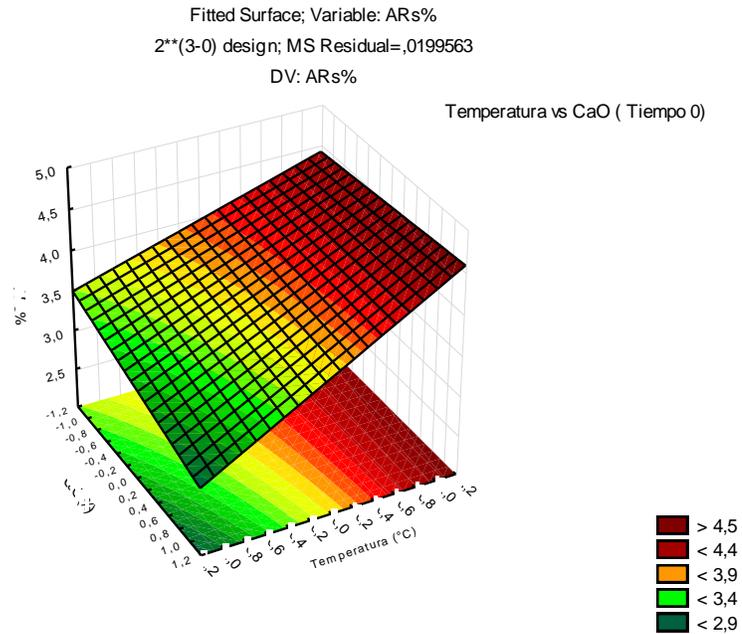


Gráfico 94. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación 2 h de tiempo de reacción.

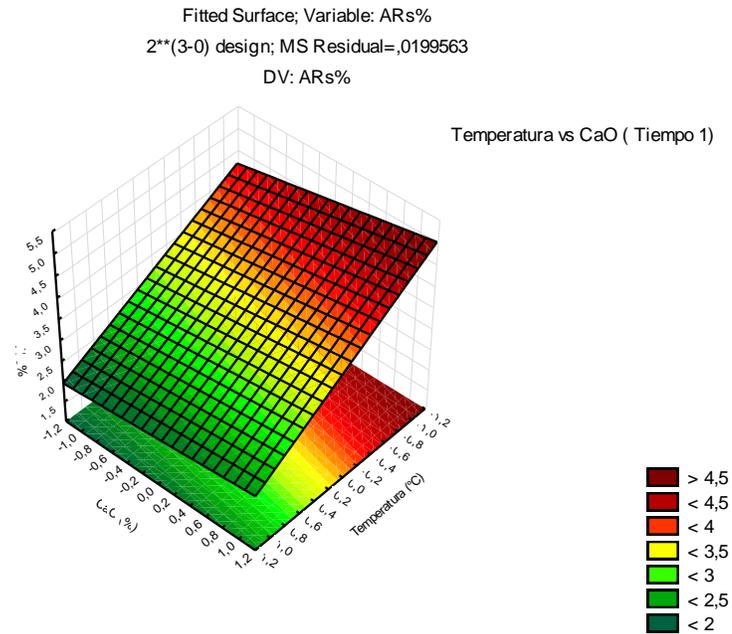


Gráfico 95. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación 3 h de tiempo de reacción.

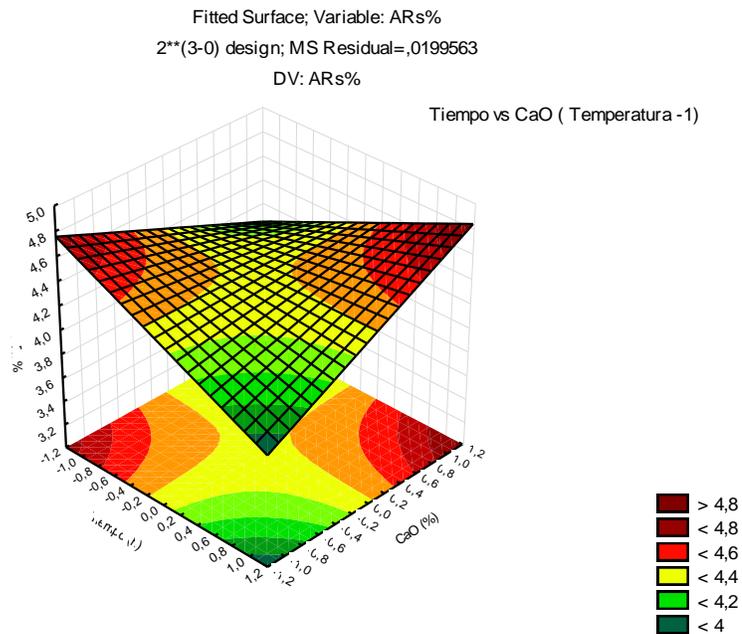


Gráfico 96. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 93°C.

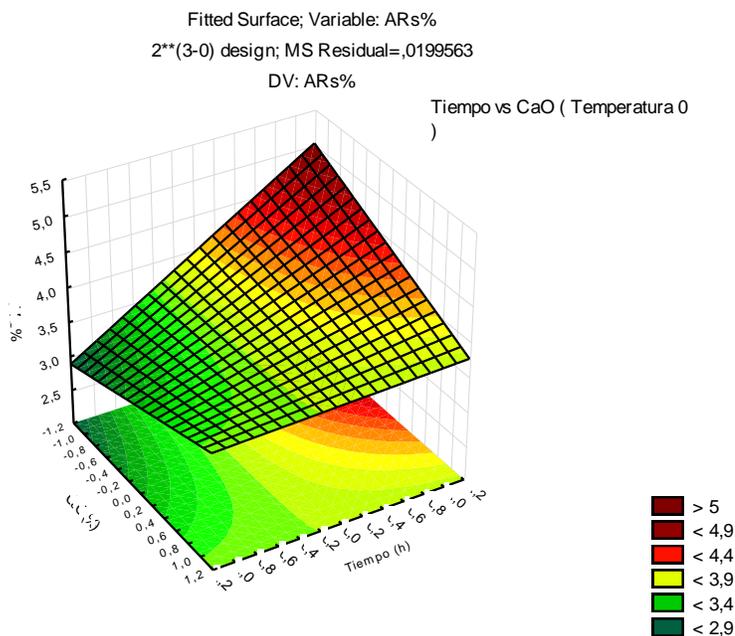


Gráfico 97. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 117°C.

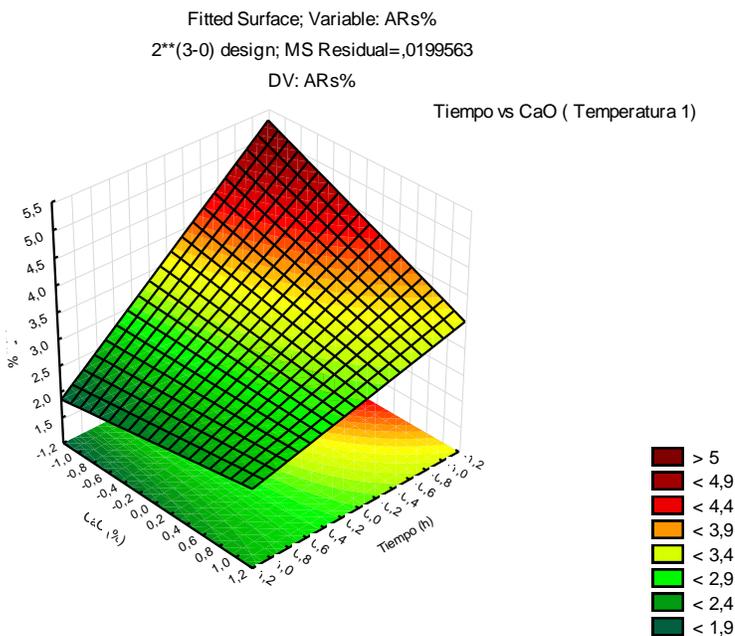


Gráfico 98. Efecto del pretratamiento básico de madera de Hule sobre la concentración de azúcares reductores (%p/p) posterior a la sacarificación a 140°C.

Anexo C. Sacarificación

Cálculo para determinar la concentración de azúcares totales y reductores

$$mg AT = \frac{Abs - b}{a} \left(\frac{mg}{ml} \right) * Factor de dilución * Vol. filtrado(ml) - mgAT Enzima$$

$$\% AT = \frac{mg AT}{mg Biomasa seca} * 100$$

$$mg AR = \frac{Abs - b}{a} \left(\frac{mg}{ml} \right) * Factor de dilución * Vol. filtrado(ml) - mgAR Enzima$$

$$\% AR = \frac{mg AR}{mg Biomasa seca} * 100$$

*AT: Azúcares Totales *AR: Azúcares Reductores *Del modelo de la recta $y=ax+b$
a: pendiente de la recta y b: ordenada al origen

Tabla 31. Condiciones de la sacarificación enzimática sin pretratamiento para los materiales lignocelulósicos.

Muestra	Peso (mg)	Biomasa Seca (mg)	Cantidad de enzima (µL)	Buffer (µL)	Agua (µL)
Apapaxco	25	23.32	20.99	445	2034
Hule	25	23.40	21.07	447	2032

Tabla 32. Resultados sacarificación con pretratamiento alcalino con coctel enzimático E7 Apapaxco.

Experimento	% Azúcares Totales	% Azúcares Reductores
8	7.90 ± 0.30	2.74± 0.09
6	8.08± 0.28	2.97±0.28
5	5.57±0.29	1.99±0.07
10	5.37±0.07	2.18±0.13
11	5.42±0.20	2.13±0.10
4	1.80±0.07	0.79±0.04
3	7.69±0.44	2.61±0.10
9	5.29±0.37	2.16±0.12
1	5.29±0.44	2.02±0.10
7	4.35±0.25	1.42±0.07
2	1.54±0.10	0.54±0.02

Tabla 33. Resultados sacarificación con pretratamiento alcalino con coctel enzimático E7 para madera de hule.

Experimento	% Azúcares Totales	% Azúcares Reductores
8	7.71±0.16	2.54±0.11
6	10.27±0.18	3.56±0.04
5	14.36±0.22	4.83±0.07
10	10.37±0.22	3.83±0.07
11	10.10±0.23	3.57±0.07
4	13.85±0.21	4.70±0.08
3	13.33±0.24	4.05±0.12
9	10.23±0.26	3.79±0.06
1	13.59±0.16	4.64±0.10
7	6.38±0.27	2.17±0.08
2	12.31±0.16	4.15±0.16

Anexo D. Curvas de calibración para HPLC

Curvas de Calibración de azúcares mediante HPLC.

Tabla 34. Tiempos de retención (minutos) de los estándares de glucosa, fructosa, sacarosa, xilosa y celobiosa

Azúcar	Tiempo de retención
Xilosa	4.3
Fructosa	6.2
Glucosa	6.9
Sacarosa	17
Celobiosa	21.8

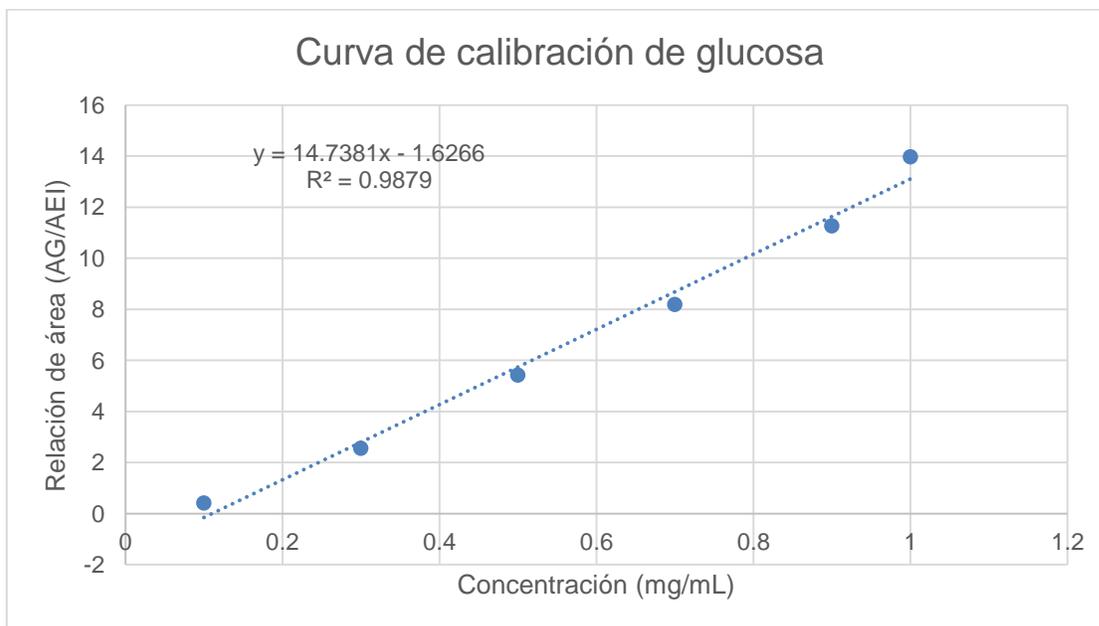


Gráfico 99 Curva de calibración de glucosa en HPLC

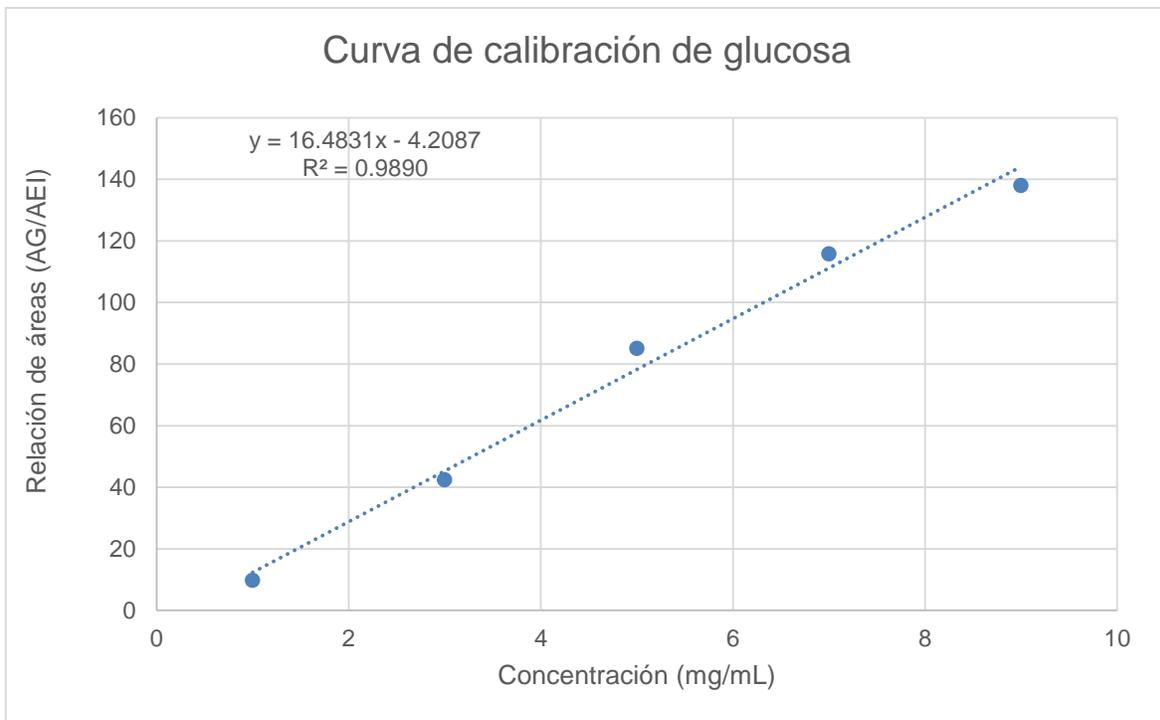


Gráfico 100. Curva de calibración de glucosa en HPLC.

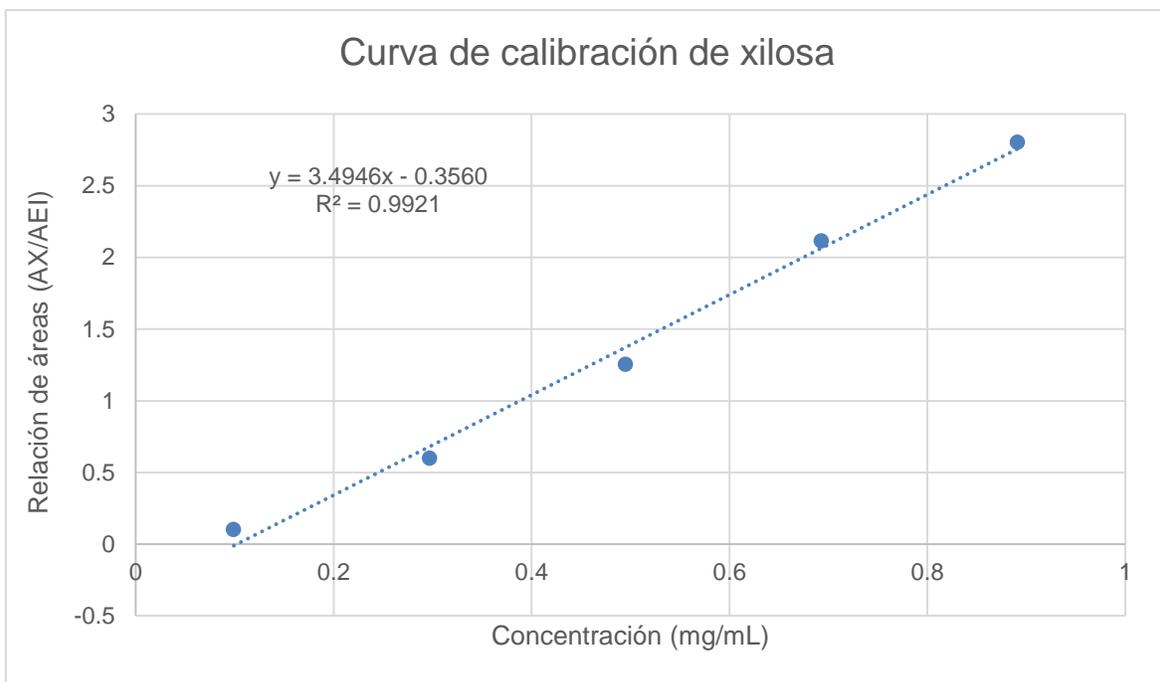


Gráfico 101. Curva de calibración de xilosa en HPLC.

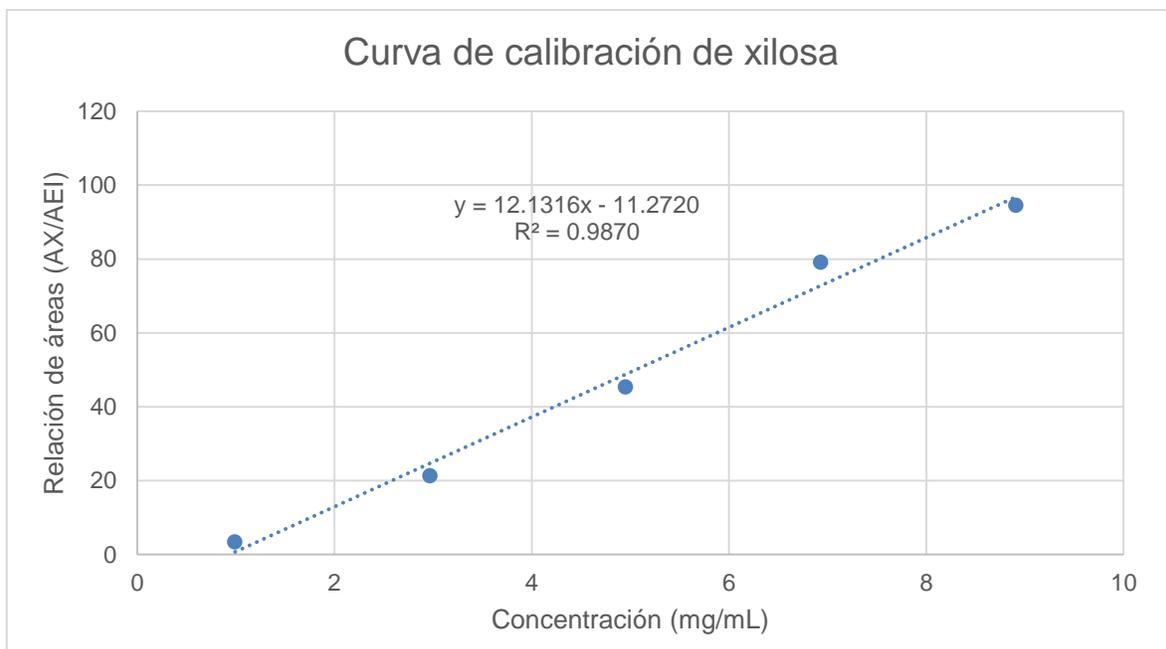


Gráfico 102. Curva de calibración de xilosa en HPLC

Anexo E. Especificaciones de Sistemas de Reactor a Presión Serie 5500

Tabla 35. Especificaciones de Sistemas de Reactor a Presión Serie 5500

N° Modelo	5513	Potencia del calentador, Watts	1000	
Tamaño, mL	100	Motor de Agitador, Velocidad Variable	1/17 hp	
Presión Máxima	3000 psi (200 bar)	Suministro Eléctrico		
Temperatura Máxima		Voltios, AC	115 ó 230	
con junta tórica FKM	225 °C	Máxima Carga, amps, 115 / 230	10 - 5	
con junta tórica FFKM	275 °C	Dimensiones del Recipiente		
con Junta Plana PTFE	350 °C	Dia. Interno, pulg.	1.3	
Estilo de Recipiente	Móvil	Profundidad Interna, pulg.	4.5	
Ensamble de Reactor	Para Banco Compacto	Peso del Recipiente, lbs.	12	
Cierre	Anillo Partido(6 Tornillos para Junta Plana) (0 Tornillos para Cerrado Rápido)	Dimensiones del Reactor		
Conexiones de Válvula	1/8" Macho NPT	Ancho, pulg c/o Controlador	8.3	
Torque Máximo, Pulg-Libras	2.5 (0.28 Nm)	Profundidad, pulgadas	9.5	
Manómetro, Tamaño	3.5 pulgadas	Altura, pulgadas	23.4	
Rango	0-3000 psi (200 bar)	Peso, libras	25	
Medición de Temperatura	Termopar Fijo			
Serpentín de Enfriamiento	Estándar de Una Espira			
Estilo de Calefactor	Bloque de Aluminio (Enfriamiento Externo Opcional)			