

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“Optimización de la hidrólisis enzimática a partir de bagazo de sorgo dulce a nivel planta piloto usando enzimas comerciales”.

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

I.Q. Javier Guarneros Flores

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Leticia López Zamora

CODIRECTOR DE TESIS:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga





FECHA: 31/01/2017
DEPENDENCIA: POSGRADO
ASUNTO: Autorización de Impresión
OPCIÓN: I

C. JAVIER GUARNEROS FLORES
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:
CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"OPTIMIZACION DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA A PARTIR DE BAGAZO DE SORGO DULCE A NIVEL PLANTA PILOTO USANDO ENZIMAS COMERCIALES".

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E

M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO



SECRETARIA DE
EDUCACION PÚBLICA
INSTITUTO
TENOLOGICO
DE ORIZABA

ggc



SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



Subsecretaría de Educación Superior
Tecnológico Nacional de México
Instituto Tecnológico de Orizaba

FECHA : 23/01/2017

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACION.
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

JAVIER GUARNEROS FLORES

la cual lleva el título de:

**"OPTIMIZACION DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA A PARTIR DE BAGAZO DE SORGO
DULCE A NIVEL PLANTA PILOTO USANDO ENZIMAS COMERCIALES".**

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : **DRA. LETICIA LOPEZ ZAMORA**

SECRETARIO : **DRA. MARIA GUADALUPE AGUILAR USCANGA**

VOCAL : **DRA. ROSALIA CERECERO ENRIQUEZ**

VOCAL SUP. : **M.C. MARIA ELENA GARCIA REYES**



FIRMA


FIRMA


FIRMA

EGRESADO (A) DE LA MAESTRIA EN **CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA**

OPCION: I **Tesis**



Avenida Oriente 9 Núm. 852, Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320 Orizaba, Veracruz, México

Teléfonos: (272) 7 24 40 96 Fax. (272) 7 25 17 28

e-mail: Orizaba@itorizaba.edu.mx www.itorizaba.edu.mx



RECONOCIMIENTOS

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- 2016 Expositor Optimización del proceso de hidrólisis enzimática a partir de bagazo de sorgo dulce pretratado. Congreso Interdisciplinario de Energías Renovables, Mantenimiento Industrial, Mecatrónica e Informática. 19 al 21 de Octubre. Colegio de Ingenieros en Energías Renovables. San Juan del Rio, Querétaro. México.
- 2016 Expositor Optimización de la hidrólisis enzimática a nivel planta piloto a partir de bagazo de sorgo dulce. Sexto Simposio Internacional de Investigación Multidisciplinaria. 14 al 16 de Noviembre. Instituto Tecnológico de los Ríos. Balancán, Tabasco. México.
- 2016 Expositor Optimization of the enzymatic hydrolysis process using sweet sorghum bagasse delignified. ECORFAN 7th International Congress. Scientific, Technological and Innovative Crowdsourcing. 22 al 25 de Noviembre. Universidad Iberoamericana. Ciudad de México, México.

PUBLICACIONES

J. Guarneros Flores, L. López Zamora y M. G. Aguilar Uscanga. 2016. "Optimización del proceso de hidrólisis enzimática a partir de bagazo de sorgo dulce pretratado". Revista de Investigación y Desarrollo. España. ISSN: 2444 – 4987. Vol. 2 N°6, 75-81.

J. Guarneros Flores, L. López Zamora y M. G. Aguilar Uscanga. 2016. "Optimization of the enzymatic hydrolysis process using sweet sorghum bagasse delignified". ECORFAN Journal - Democratic Republic of Congo. México. ISSN 2414 – 4924. Vol. 2 N° 2, 33-39.

RESUMEN

Optimización de la hidrólisis enzimática a partir de bagazo de sorgo dulce a nivel planta piloto usando enzimas comerciales

Elaborado por: Ing. Javier Guarneros Flores
Dirigida por: Dra. Leticia López Zamora
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Actualmente la producción de biocombustibles está tomando gran importancia como una manera de combatir la contaminación ambiental. Una de las materias primas que está alcanzando importancia mundial en la producción de bioetanol es el sorgo dulce, que representa un material viable por sus mínimos requerimientos y alta resistividad, con un alto contenido de azúcares (16-23 °Brix). La biomasa lignocelulósica correspondiente al bagazo de sorgo dulce (BSD) presenta una estructura compleja, compuesta de varias fracciones (hemicelulosa, celulosa y lignina) que deben ser procesadas por separado para asegurar una mayor obtención de azúcares fermentables. Primero para remover la hemicelulosa de la biomasa se llevó a cabo un pretratamiento en autoclave con una solución de H_2SO_4 al 1.5 % durante 33 min, una presión de 1.2 Kg/cm² y una RLS de 5:1, mientras que para la remoción de la lignina, se aplicó un pretratamiento alcalino empleando H_2O_2 al 4 % durante 48 h, temperatura de 25 °C y una RLS de 16:1. Después, para la hidrólisis enzimática se aplicó un diseño de experimentos Box Behnken siendo las variables independientes: tiempo de reacción (24, 48 y 72 h), RLS (5:1, 7:1 y 9:1) y carga enzimática (5, 6 y 7 % p/p) y como variable de respuesta la concentración de glucosa (g/L) cuantificada mediante cromatografía líquida de alta resolución, la experimentación se realizó en base seca y base húmeda, realizando un monitoreo de producción de glucosa cada 4 h durante 92 h de reacción. Los valores óptimos obtenidos a nivel laboratorio en base seca, fueron probados a nivel planta piloto utilizando 4 Kg de BSD pretratado (celulosa) y adaptando un equipo a escala semi industrial destinado para este proceso con el objetivo de validar que las condiciones de trabajo son totalmente reproducibles, la enzima empleada fue la celulasa Cellic CTec3 de Novozymes. Como aporte adicional se realizó la optimización de la hidrólisis enzimática de BSD deslignificado aplicando dos enzimas diferentes simultáneamente (Cellic CTec3 y HTec3), determinando una carga enzimática de 5 % y 3 % p/p respectivamente, un tiempo de reacción de 48 h y una RLS de 5:1. Los resultados mostraron un 85 % de remoción de hemicelulosa durante la etapa de hidrólisis ácida, además de generar un prehidrolizado ácido con 47.173 g/L de xilosa. El pretratamiento alcalino demostró ser un eficiente removedor de lignina con un 86 % de remoción. Para la etapa enzimática en base seca se obtuvo un máximo de conversión de glucosa de 125.20 g/L empleando los valores obtenidos mediante el análisis estadístico en el NCSS 2007: tiempo de 51 h, RLS de 5:1 y carga enzimática de 5 % p/p, resultado superior en un 27.66 % respecto al generado por el modelo matemático (97.07 g/L de glucosa). La experimentación a nivel planta piloto alcanzó una conversión de 143.61 g/L de glucosa con un incremento del 14.7 % contra lo obtenido a nivel laboratorio, en tanto que en la cinética de monitoreo en la producción de glucosa, entre las 52 h y las 92 h de reacción únicamente existe un aumento del 13 % de glucosa, valor insignificante comparado con el incremento del 77 % en el tiempo de reacción que esto representa (40 h). Finalmente se realizó una fermentación con el hidrolizado enzimático obtenido a nivel planta piloto, empleando la *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo una producción de 57.7 g/L de etanol con un inóculo de 3×10^6 células viables y un tiempo de fermentación de 14 h.

ABSTRACT

Optimization of enzymatic hydrolysis from sweet sorghum bagasse at pilot plant level using commercial enzymes

By: Ing. Javier Guarneros Flores
Advisor(s): Dra. Leticia López Zamora
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Currently the production of biofuels is taking great importance as a way to combat environmental pollution. One of the raw materials that is reaching global importance in the bioethanol production is sweet sorghum, which represents a viable material due to its minimum requirements and high resistivity, with a high sugar content (16 - 23 °Brix). The lignocellulosic biomass corresponding to sweet sorghum bagasse (BSD) has a complex structure, composed of several fractions (hemicellulose, cellulose and lignin) that must be processed separately to ensure a higher yield of fermentable sugars. First, to remove the hemicellulose of the biomass, a pre-treatment in autoclave was carried out with a solution of H_2SO_4 to 1.5 % for 33 min, a pressure of 1.2 kg/cm² and a RLS of 5:1, while for lignin removal, an alkaline pretreatment was applied using a solution of H_2O_2 to 4 % during 48 h, temperature of 25 °C and a RLS of 16:1. Subsequently, for the enzymatic hydrolysis, was applied a Box Behnken experiment design being the independent variables: reaction time (24, 48 and 72 h), RLS (5:1, 7:1 and 9:1) and enzymatic loading (5, 7 and 9 % w/w) and as a response variable the glucose concentration (g/L) quantified by high performance liquid chromatography, the experimentation was carried out on a dry basis and wet basis, performing a monitoring of glucose production every 4 h during 92 h of reaction. The optimum values obtained at the laboratory level on a dry basis were tested at the pilot plant level using 4 kg of pretreated BSD (cellulose) and adapting an equipment to semi industrial scale destined for this process with the aim of validate that the conditions of work are completely reproducible, the enzyme used in this process was the cellulase Cellic CTec3 of Novozymes. As an additional contribution the optimization of the enzymatic hydrolysis from BSD delignified was carried out applying two different enzymes simultaneously (Cellic CTec3 and HTec3), determining an enzymatic loading of 5 % and 3 % w/w respectively, a reaction time of 48 h and a RLS of 5:1. The results showed an 85% removal of hemicellulose during the acid hydrolysis step, besides generating an acid prehydrolyzed with 47.173 g/L of xylose. Alkaline pretreatment proved to be an efficient lignin remover with 86% removal. For the enzymatic hydrolysis step on a dry basis, a maximum glucose conversion of 125.20 g/L using the values generated by the NCSS 2007 statistical analysis: time of 51 h, RLS of 5:1 and enzymatic loading of 5 % w/w, presenting an increase of 27.66 % over with respect to that generated by the mathematical model (97.07 g/L of glucose). Experiments at the pilot plant level showed a conversion of 143.61 g/L glucose with an increase of 14.7 % with respect to the result obtained at the laboratory level, while monitoring kinetics in glucose production showed that between 52 h and 92 h there is only a 13 % increase in glucose, insignificant value compared to the 77 % increase in the reaction time this represents (40 h). Finally, a fermentation was carried out with the enzymatic hydrolyzate obtained at the pilot plant level, using *Saccharomyces cerevisiae*, obtaining a production of 57.7 g/L of ethanol with an inoculum of 3×10^6 viable cells and a fermentation time of 14 h.

ÍNDICE

Resumen		
Abstract		
	Pág.	
Lista de Figuras	v	
Lista de Tablas	viii	
Nomenclatura	x	
Introducción	1	
CAPÍTULO I. FUNDAMENTOS TEÓRICOS		
1.1	Materiales Lignocelulósicos	4
1.1.1	Sorgo dulce	4
1.1.2	Ventajas comparativas del sorgo dulce	5
1.1.3	Sorgo dulce para producción de etanol	6
1.1.4	Componentes del sorgo dulce	7
1.2	Bagazo de sorgo dulce	8
1.2.1	Composición del bagazo de sorgo dulce	9
1.3	Biocombustibles	9
1.3.1	Bioetanol	12
1.3.2	Bioetanol como combustible	13
1.4	Estructura lignocelulósica	14
1.4.1	Celulosa	15
1.4.2	Hemicelulosa	16
1.4.3	Lignina	18
1.4.4	Influencia de la biomasa lignocelulósica en su procesamiento	19
1.5	Pretratamientos	19
1.5.1	Características de un pretratamiento efectivo	20
1.5.2	Pretratamientos físicos	21

1.5.3	Pretratamientos biológicos	22
1.5.4	Pretratamientos químicos	23
1.6	Hidrólisis enzimática	29
1.6.1	Función de las celulasas	29
1.6.2	Etapas de la hidrólisis enzimática	30
1.6.3	Transferencia de masa durante la hidrólisis enzimática	30
1.6.4	Cellic CTec3	31
1.7	Trabajos relacionados realizados por otros autores	31
1.8	Planta piloto	36
1.8.1	Escalamiento	36

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Obtención y acondicionamiento del bagazo de sorgo dulce	39
2.2	Caracterización del bagazo de sorgo dulce	41
2.3	Obtención de puntos óptimos de la hidrólisis enzimática a nivel laboratorio (base seca)	42
2.3.1	Condiciones de la hidrólisis ácida	42
2.3.2	Condiciones de la hidrólisis alcalina	43
2.3.3	Evaluación de factores para el diseño de experimentos	43
2.3.4	Hidrólisis enzimática a nivel laboratorio	44
2.3.5	Optimización de la respuesta de la hidrólisis enzimática en base seca	46
2.3.6	Cinética de la hidrólisis enzimática	47
2.4	Obtención de puntos óptimos a nivel laboratorio (base húmeda)	48
2.5	Adaptación del equipo a nivel planta piloto para la hidrólisis enzimática	48
2.6	Pretratamiento ácido a nivel planta piloto	49
2.7	Pretratamiento alcalino a nivel planta piloto	51
2.8	Hidrólisis enzimática a nivel planta piloto	53
2.8.1	Inactivación de la enzima	54

2.9	Tratamiento utilizando dos enzimas diferentes (base seca)	55
2.9.1	Relación a utilizar de celulasa y hemicelulasa	55
2.9.2	Tratamiento utilizando dos enzimas diferentes (base húmeda)	57
2.10	Fermentación	58
2.10.1	Medio de preparación y preadaptación	58
2.10.2	Condiciones de precultivo y preinóculo	59
2.10.3	Medio de fermentación	59

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Obtención y caracterización del BSD	62
3.2	Optimización de la hidrólisis enzimática a nivel laboratorio (Base seca)	64
3.2.1	Hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce	64
3.2.2	Hidrólisis alcalina del bagazo de sorgo ácido	64
3.2.3	Condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática	64
3.2.4	Análisis de regresión en función de la carga enzimática, tiempo y masa de celulosa	66
3.2.5	Establecimiento de las mejores condiciones para la producción de glucosa a partir del bagazo de sorgo dulce	68
3.2.6	Optimización de la respuesta de la hidrólisis enzimática en base seca	71
3.3	Optimización de la hidrólisis enzimática en base húmeda (nivel laboratorio)	73
3.3.1	Condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática	74
3.3.2	Análisis de varianza de la hidrólisis enzimática en base húmeda	76
3.3.3	Análisis de regresión en función de la carga enzimática, tiempo y celulosa	76
3.3.4	Análisis de contornos de la hidrólisis enzimática	78

3.3.5	Superficie de respuesta de la hidrólisis enzimática	79
3.3.6	Optimización de la respuesta de la hidrólisis enzimática en base húmeda	79
3.4	Pretratamientos a nivel planta piloto	82
3.4.1	Hidrólisis ácida a nivel planta piloto	82
3.4.2	Hidrolisis alcalina a nivel planta piloto	84
3.5	Adaptación del equipo a escala piloto	86
3.6	Hidrólisis enzimática del BSD a nivel planta piloto	88
3.7	Hidrólisis enzimática a partir de BSD deslignificado	89
3.7.1	Determinación de las concentraciones enzimáticas	90
3.7.2	Condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática del BSD deslignificado (Base seca).	91
3.7.3	Análisis de regresión en función de la carga enzimática, tiempo y masa de bagazo	92
3.7.4	Análisis de contornos de la producción de glucosa y xilosa	94
3.7.5	Análisis de superficie de respuesta de la producción de glucosa y xilosa usando BSD deslignificado en base seca	94
3.7.6	Hidrólisis enzimática del BSD deslignificado en base húmeda	95
3.7.7	Análisis de regresión en función de la carga enzimática, tiempo y masa de bagazo	97
3.7.8	Análisis de superficie de respuesta de la producción de glucosa y xilosa	98
3.7.9	Comprobación de las respuestas obtenidas utilizando BSD deslignificado a nivel laboratorio	98
3.8	Producción de etanol a partir de la fermentación	99
	Conclusiones	102
	Anexos	106
	Referencias bibliográficas	115

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.1	Sorgo dulce	5
1.2	Distribución de °Brix en el tallo del sorgo dulce	7
1.3	Composición química promedio de los tallos de sorgo dulce (FAOSTAD, 2011)	8
1.4	Contenido comparativo de celulosa, hemicelulosa, lignina y ceniza como porcentaje de fibra presente en diversos materiales lignocelulósicos (FAOSTAD, 2011)	10
1.5	Estructura de la celulosa (Harris, 2012)	15
1.6	Estructura de la hemicelulosa	17
1.7	Alcoholes cinamílicos precursores de la lignina	18
1.8	Fibrillas de celulosa, rodeadas de hemicelulosa y lignina (Harris, 2012)	20
1.9	Procedimiento para el escalamiento a nivel industrial	37
2.1	Metodología para la hidrólisis enzimática a nivel planta piloto del BSD pretratado	39
2.2	Secado por radiación solar del bagazo de sorgo dulce (BSD)	41
2.3	Incubadora Lab Tech	45
2.4	Equipo HPLC Waters para cuantificación de productos	46
2.5	BSD pre hidrolizado con H ₂ SO ₄ expuesto a secado solar	50
2.6	Celulosa expuesta a secado mediante radiación solar	52
2.7	Incremento de volumen durante la reacción alcalina	53
2.8	Conteo celular observado al microscopio	60
3.1	Contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce crudo (RB cañero)	63
3.2	Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 1 (Ec.3.1)	66
3.3	Gráfica de contornos del contenido de Glucosa en la hidrólisis	69

	enzimática del efecto de: (a) Celulosa (g) vs Tiempo (h), (b) Enzima (% p/p) vs Celulosa (g) y (c) Enzima (% p/p) vs Tiempo (h)	
3.4	Gráficas de superficie de respuesta del contenido de glucosa en la hidrólisis enzimática: (a) Tiempo (h) vs Celulosa (g), (b) % de Enzima (p/p) vs Celulosa (g) y (c) % de Enzima (p/p) vs Tiempo (h)	70
3.5	Hidrolizado enzimático en base húmeda (proceso continuo)	75
3.6	Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 2 (Ec. 3.2)	77
3.7	Gráfica de contornos del contenido de Glucosa en la hidrólisis enzimática del efecto de: (a) Bagazo (g) vs Tiempo (h), (b) Enzima (% p/p) vs Tiempo (h) y (c) Bagazo (g) vs Enzima (% p/p)	78
3.8	Gráficas de superficie de respuesta del contenido de glucosa en la hidrólisis enzimática en modo continuo: (a) Tiempo (h) vs Celulosa (g), (b) % de Enzima (p/p) vs Celulosa (g) y (c) % de Enzima (p/p) vs Tiempo (h)	80
3.9	Cinéticas de la hidrólisis enzimática del BSD a distintos tiempos de reacción durante 92 horas en base húmeda y base seca	81
3.10	Contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado	83
3.11	Contenido de fibra del BSD deslignificado	85
3.12	Aislamiento de la chaqueta de calentamiento del equipo destinado para la hidrólisis enzimática a nivel planta piloto	86
3.13	Tanque adaptado para la hidrolisis enzimática a nivel planta piloto	87
3.14	Degradación de la celulosa mediante la hidrólisis enzimática a nivel planta piloto	89
3.15	Comparación de las concentraciones obtenidas en la Tabla 3.8	90
3.16	Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 3 (Ec. 3.5)	93
3.17	Gráficas de contornos sobre la producción de glucosa (a) y xilosa (b) a partir de la hidrólisis enzimática del BSD deslignificado analizando los efectos del Tiempo (h) vs Bagazo (g)	94
3.18	Gráficas de superficie de respuesta del contenido de glucosa y xilosa en la hidrólisis enzimática: (a) Tiempo (h) vs Bagazo (g)	95

	para la producción de glucosa y (b) Tiempo (h) vs Bagazo (g) para la obtención de xilosa	
3.19	Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 4 (Ec. 3.6)	97
3.20	Contenido de glucosa en la hidrólisis enzimática: Tiempo (h) vs Bagazo (g)	98
3.21	Consumo de glucosa vs producción de etanol durante la fermentación	100

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.1	Propiedades de algunos oxigenados de alto octanaje (Cortínez-Villalobos, 2010)	13
2.1	Parámetros para la caracterización del bagazo de sorgo dulce	42
2.2	Diseño Box Behnken para la hidrólisis enzimática del BSD	44
2.3	Preparación de muestras con diferentes cantidades de enzima	56
2.4	Diseño de experimentos Box Behnken utilizando dos enzimas diferentes	57
2.5	Componentes para el medio de activación y preparación en la fermentación del hidrolizado enzimático a partir de bagazo de sorgo dulce	58
3.1	Comparación del contenido de fibra del BSD crudo	63
3.2	Resultados obtenidos a partir del primer diseño experimental para la obtención de glucosa considerando la carga enzimática, tiempo y masa de celulosa	65
3.3	Análisis de Varianza (ANOVA) del diseño de experimentos Box-Behnken para la hidrólisis enzimática del BSD	67
3.4	Condiciones óptimas de producción de glucosa a partir de BSD	71
3.5	Resultados obtenidos a partir del segundo diseño experimental para la obtención de glucosa considerando la carga enzimática, tiempo y masa de celulosa	74
3.6	Análisis de Varianza (ANOVA) del diseño de experimentos Box-Behnken para la hidrólisis enzimática del BSD en base húmeda	76
3.7	Comparación de las concentraciones de xilosa obtenidas por diversos autores	84
3.8	Concentraciones de Glucosa y Xilosa obtenidas a partir de tres diferentes combinaciones enzimáticas (CTec3 y HTec3)	90

3.9	Resultados obtenidos a partir del tercer diseño experimental para la obtención de glucosa y xilosa considerando la carga enzimática, tiempo y masa de bagazo	92
3.10	Resultados obtenidos a partir del cuarto diseño experimental para la obtención de glucosa y xilosa considerando: carga enzimática, tiempo y masa de bagazo (modo continuo)	96
3.11	Consumo de glucosa y producción de etanol a distintos tiempo de fermentación	99

NOMENCLATURA

Símbolo	Significado
Ton	Toneladas
ha	Hectárea
L	Litros
m ³	Metros cúbicos
BSD	Bagazo de sorgo dulce
g	Gramos
mm	Milímetros
AFEX	Explosión de fibra amoniaco
°Brix	Grados Brix
DMF	Dimetilfurano
HE	Hidrólisis enzimática
°C	Grados Celcius
min	Minutos
Kg	Kilogramos
v/v	Volumen – volumen
mg	Miligramos
h	Horas
μL	Microlitros
mL	Mililitros
rpm	Revoluciones por minuto
SSF	Fermentación en estado sólido
SF	Fermentación sumergida
p/v	Peso – volumen
p/p	Peso – peso
RLS	Relación líquido sólido

INTRODUCCIÓN

La necesidad de soluciones ante los altos índices de contaminación así como el agotamiento de los combustibles fósiles obliga a investigar la forma de producir menos contaminantes, reducir la generación de desechos y al mismo tiempo a tratar de generar energía más limpia. Una alternativa está enfocada en la producción de biocombustibles de segunda generación, es decir, aquellos que son producidos gracias a los residuos lignocelulósicos, siendo la principal limitante para su aplicación la remoción de la lignocelulosa presente. (Cardona, 2009). La incertidumbre relacionada con la disponibilidad de fuentes de petróleo a largo plazo y la fluctuación de los precios del mismo, ha inclinado la balanza hacia el uso de etanol como un aditivo de la gasolina.

Dentro de las materias primas alternativas que está alcanzando importancia mundial para la producción de bioetanol se encuentra el sorgo dulce, definido como un cultivo bioenergético promisorio por su gran producción de masa verde, mínimos requerimientos generales y su tolerancia a enfermedades, sequías e inundaciones (Montes *et al.*, 2010a). El auge de los biocombustibles, su crecimiento acelerado y muchas veces desmedido, hace que el mundo se replantee los caminos a seguir para su producción. La subespecie sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L) *Moench*), en la actualidad está ganando la atención mundial como una de las materias primas alternativas para la producción de etanol. Estas variedades azucaradas de sorgo, se desarrollan bien en terrenos alcalinos en presencia de carbonato cálcico, lo que aumenta el contenido en sacarosa alcanzando entre los 16 y los 23 °Brix niveles comparables a los de la caña de azúcar (Montes *et al.*, 2010b).

La lignina y la hemicelulosa actúan como una barrera de protección de la celulosa. Para hidrolizar la celulosa y posteriormente realizar la fermentación de los azúcares presentes, es necesario tratar el material lignocelulósico, en este caso el sorgo dulce, para modificar su estructura, eliminando la lignina y la hemicelulosa, dejando a la

celulosa expuesta a un posterior ataque enzimático. El pretratamiento con peróxido de hidrógeno (agente oxidante), aumenta la susceptibilidad de la hidrólisis enzimática al eliminar cantidades superiores al 50 % de la lignina (Azzam, 1989). La remoción de la hemicelulosa, puede llevarse a cabo mediante una hidrólisis con ácido diluido, ácido concentrado o enzimáticamente, mientras que la celulosa puede ser tratada enzimáticamente de acuerdo a las condiciones específicas de trabajo de la enzima en cuestión a emplear, después de ser tratada la materia prima y removida la hemicelulosa y la lignina, la enzima involucrada en el tratamiento de la celulosa será una celulasa, sin embargo, existe una posibilidad de únicamente eliminar la lignina presente y posteriormente tratar la materia prima con una hemicelulasa y una celulasa utilizadas simultáneamente, lo cual producirá dos tipos de azúcares xilosa y glucosa.

Actualmente las necesidades en cuanto a la producción de este biocombustible van más allá de las simples pruebas a nivel laboratorio por lo que la presente investigación consistió en optimizar el proceso de la hidrólisis enzimática a partir del bagazo del sorgo dulce, aplicando dos pretratamientos previos (ácido y alcalino) a la materia prima y escalando toda la línea experimental, siendo una planta piloto un medio idóneo para comprobar que tan eficiente es el desarrollo de este proceso a escala semi industrial, teniendo como objetivo principal obtener las condiciones óptimas de trabajo, las cuales permitan maximizar los rendimientos en cuanto a la obtención de glucosa potencialmente fermentable y corroborar la eficiencia de la enzima utilizada (Cellic CTec3 de Novozymes).

Como parte adicional se experimentó el uso de dos diferentes enzimas utilizadas simultáneamente en el bagazo de sorgo dulce (Cellic CTec3 y HTec3) con el objetivo de monitorear y observar las concentraciones de glucosa y xilosa generadas para finalmente comparar las ventajas y desventajas que trae consigo cada una de las líneas experimentales realizadas.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Materiales lignocelulósicos

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 remoción de la lignocelulosa. Actualmente, los materiales lignocelulósicos son considerados como recursos potenciales para la producción de bioetanol debido a su alto contenido de fibra, entre los sustratos más utilizados para la producción de biocombustibles se encuentran la caña de azúcar y el maíz, siendo Brasil el mayor productor de bioetanol a partir de caña de azúcar y Estados Unidos el segundo más importante empleando maíz; las fuentes celulósicas potencialmente utilizables son los residuos de cosechas (bagazos), hierbas, cascarillas de cereales, etc. (Cardona, 2009).

1.1.1 Sorgo dulce

Para México donde las reservas de petróleo están escaseando, es prioridad producir biocombustibles y obtener una energía más económica y sustentable. El sorgo dulce, debido a su rápida tasa de crecimiento oscilante de 120-180 días, su alto valor energético (12-18 °Brix) y su gran adaptabilidad resulta ser una excelente fuente de producción de etanol. Además, es un cultivo que presenta una importante producción de grano, despunte de hojas y bagazo (residuo por extracción de los azúcares) cuyo destino puede ser la producción de un biocombustible de segunda generación o bien ser utilizado para generar energía durante la producción de etanol.

El sorgo dulce (Figura 1.1) produce altas cantidades de biomasa total, la cual varía de acuerdo a la localidad y al modo de cultivo, sin embargo en evaluaciones realizadas en California, USA, la producción de biomasa ha llegado a las 118 ton/ha con una producción de tallo de 98 ton/ha, suficientes para producir de 3750 a 4800 L

de etanol. Si bien existen muchas prácticas de manejo de sorgo dulce, estas fueron realizadas con variedades con un potencial de rendimiento limitado. En los últimos años este cultivo ha recibido un impulso formidable como fuente renovable de energía (Montes *et al.*, 2010a).



Figura 1.1 Sorgo dulce

1.1.2 Ventajas comparativas del sorgo dulce

El sorgo dulce además de su rápido crecimiento, alta eficiencia en el uso del agua y bajos requerimientos de fertilizante, presenta ventajas en relación a otros cultivos usados comúnmente para la obtención de biocombustibles. Estas ventajas son:

- Presenta un ciclo vegetativo de alrededor de 4 meses y un requerimiento de agua de 4000 m³ por ciclo de cultivo, mientras que la caña de azúcar tiene un ciclo vegetativo de 12 a 16 meses y un requerimiento de agua mucho mayor alcanzando los 36000 m³ por ciclo
- El costo de producción del sorgo dulce es tres veces menor que el de la caña de azúcar
- Se propaga por semilla
- Su cultivo se adapta fácilmente al uso de maquinarias evitando mano de obra

- La calidad de quemado del etanol es superior al de la gasolina, ya que contiene menos azufre

1.1.3 Sorgo dulce para producción de etanol

El auge de los biocombustibles, su crecimiento acelerado y muchas veces desmedido, hace que el mundo se replantee los caminos a seguir para su producción. La subespecie sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L) *Moench*), en la actualidad está ganando la atención mundial como una de las materias primas alternativas para la producción de etanol. Estas variedades azucaradas de sorgo, se desarrollan bien en terrenos alcalinos en presencia de carbonato cálcico, lo que aumenta el contenido en sacarosa en tallos y hojas (Montes *et al.*, 2010b).

El sorgo dulce es un cultivo con un tallo rico en azúcares fermentables entre los 12-18 °Brix, por lo que es comparable con la caña de azúcar. En la Figura 1.2 se muestra la distribución de °Brix que se puede encontrar comúnmente en el tallo del sorgo dulce, su cosecha es un multipropósito que puede ser utilizada para la alimentación del ganado, la alimentación humana y la producción de energía y azúcar. Dado que este cultivo produce alimento además de combustible es llamado "cultivo inteligente". También se le denomina "el camello de los cultivos de campo" por su gran producción de masa verde con mínimos requerimientos generales y su tolerancia a enfermedades, sequías e inundaciones.

Se destaca que las etapas de producción de etanol a partir del sorgo dulce, coinciden con las de su obtención a partir de la caña de azúcar, por lo que se reporta que se puede utilizar la misma maquinaria industrial para ambas materias primas. La India en años recientes, ha incrementado el interés en la utilización de esta planta para la producción de etanol, por la amplia adaptabilidad y rápida cosecha de este cultivo. Desde Junio del 2007, en dicho país está en funcionamiento la primer planta comercial de 20000 L de etanol diarios a partir de sorgo (215 toneladas de sorgo diarias), obteniéndose hasta 94 L de etanol por tonelada (Bueno *et al.*, 2009).

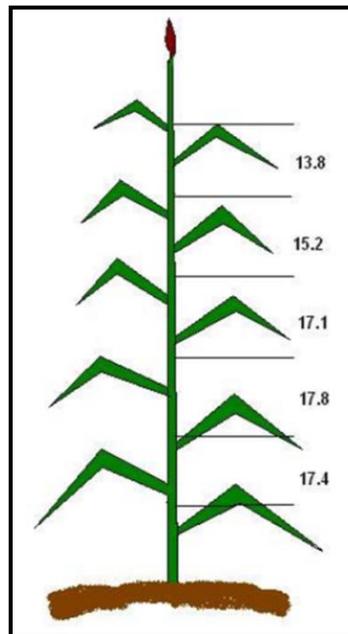


Figura 1.2 Distribución de °Brix en el tallo del sorgo dulce

1.1.4 Componentes del sorgo dulce

En el caso de las variedades de sorgo dulce, los tallos maduros contienen alrededor de un 73% de humedad y los sólidos se pueden dividir en carbohidratos estructurales y no estructurales. El jugo que se obtiene de los tallos, está compuesto básicamente por sacarosa, glucosa y fructosa, en proporciones que dependen de la variedad, temporada de cosecha, etapa de madurez, lugar de cultivo, entre otros factores.

Si se compara la composición química del jugo de sorgo dulce con el jugo de caña de azúcar, el contenido de azúcares totales puede llegar a ser semejante, sin embargo en la caña, el porcentaje de sacarosa en la relación a glucosa y fructosa es generalmente más alto (90, 4 y 6 % respectivamente). En el mundo, el país que dedica más superficie fértil para el sorgo es la india con 7.7 millones de hectáreas, que representa 4.5 veces más superficie que la destinada en México al mismo cultivo (35 % de los 22 millones de hectáreas agrícolas en nuestro país). En México la producción en 2009 fue de 6.1 millones de toneladas y para el 2011 aumento a 6.9 millones (Chuck *et al.*, 2011).

En el caso de los carbohidratos estructurales, el sorgo está compuesto principalmente por celulosa y hemicelulosa, los cuales a su vez pueden ser hidrolizados y usados como sustrato para la producción de bioetanol. La composición química varía de acuerdo a diversos factores, entre los que destacan el tipo y variedad de sorgo así como la madurez del cultivo y las condiciones climatológicas. En la Figura 1.3 se muestra la composición promedio de los tallos de sorgo dulce. La hemicelulosa, celulosa y lignina representan el 12 % del peso total del tallo, es posible afirmar que en promedio un 15 % del tallo del sorgo corresponde a la porción fibrosa en un rango que va del 12 al 17 %. (FAOSTAD, 2011).

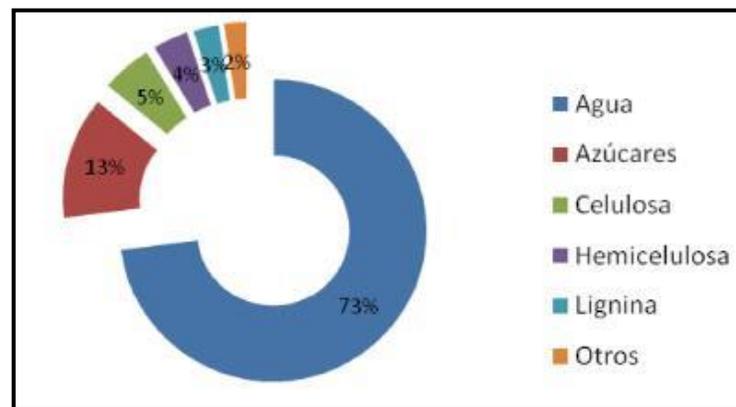


Figura 1.3 Composición química promedio de tallos de sorgo dulce (FAOSTAD, 2011)

1.2 Bagazo de sorgo dulce

El bagazo de sorgo dulce (BSD) es un residuo agroindustrial con una alta composición en fibra. Actualmente dicho cultivo está tomando fuerza en cuanto a la producción de biocombustibles de segunda generación, es decir, aquellos que se obtienen gracias a los residuos de la planta y no del jugo de esta. Si se realizan los tratamientos físicos y químicos adecuados al BSD y empleando enzimas de alta tecnología, es posible obtener un líquido rico en azúcares potencialmente fermentables, de los cuales se puede obtener etanol después de un proceso de destilación y deshidratación. En el sorgo dulce el tallo actúa como un órgano de reserva de grandes concentraciones de azúcares y carbohidratos. Al aumentar la

madurez del tallo también aumentan los porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina. La altura de la planta y el porcentaje de tallos tiene un porcentaje directo con el contenido de fibra detergente ácido y la digestibilidad (Bueno *et al.*, 2009)

El BSD es un claro ejemplo de biomasa lignocelulósica y bajo el término de biomasa se incluye a toda la materia orgánica que tiene su origen inmediato en un proceso biológico. No es sorpresa que el interés en la utilización de este tipo de sorgo se haya incrementado en los últimos años. En el sorgo dulce al igual que en la caña de azúcar, el diámetro del tallo y el área foliar de las hojas superiores de las variedades mejoradas se ha incrementado drásticamente, logrando incrementar considerablemente el tamaño de la planta, lo cual propicia a tener una mayor cantidad de bagazo con valores mucho más altos de azúcar que los que una planta común tiene (Valadez *et al.*, 2011).

Actualmente diversas investigaciones realizadas por Montes *et al.*, (2010a) han generado cultivos con tallos de hasta un 79 % del peso total de la planta, mientras que las hojas solo representan el 11.5 % y la panoja el 9.5 %. De esta manera el sorgo dulce tiene la oportunidad a través de la ingeniería genética como en el caso del arroz, y el maíz de convertirse en “el grano del futuro” (Montes *et al.*, 2010a).

1.2.1 Composición del bagazo de sorgo dulce

Si se analiza el BSD, o el residuo que se obtiene después de extraer el jugo azucarado, se tiene que los rangos de celulosa, hemicelulosa y lignina varían desde un 34-44 %, 25-27 % 18-20 % respectivamente. En la Figura 1.4 se muestra la composición química del BSD comparado con los residuos de caña de azúcar, rastrojo de maíz, trigo y arroz. (Salcedo *et al.*, 2011).

1.3 Biocombustibles

Diversificar la oferta energética e incrementar el uso de energías renovables es conveniente para México por razones estratégicas, económicas y ambientales. Los

biocombustibles pueden jugar un papel destacado en este esfuerzo, pero es importante que su producción y su uso se apeguen a estrictos criterios de sustentabilidad. Usando bien los biocombustibles México puede contribuir a resolver los problemas globales y jugar un papel de liderazgo demostrando el uso responsable de sus recursos (Cardona, 2009).

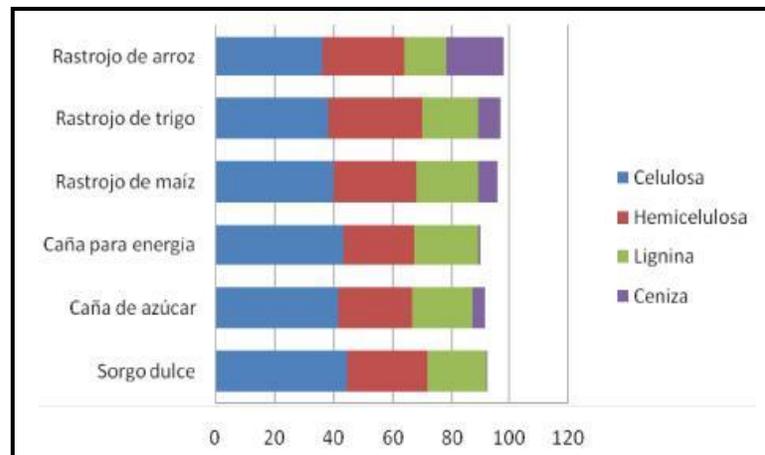


Figura 1.4 Contenido comparativo de celulosa, hemicelulosa, lignina y ceniza como porcentaje de fibra presente en diversos materiales lignocelulósicos (FAOSTAD, 2011)

En México, para que el uso de biocombustibles sea benéfico para la sociedad y para el medio ambiente, es necesario garantizar que:

- Contribuya al bienestar económico regional y nacional
- No impacte indebidamente a la calidad del aire, el agua y el suelo
- Reduzca realmente la emisión neta de gases de efecto invernadero

Biocombustibles de primera generación

La mayor parte sus 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. Ejemplos de estas materias son el jugo de la caña de azúcar, granos de maíz, jugo de la remolacha o betabel, aceite de ricino, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de maní o cacahuete, entre otros.

Los biocombustibles son producidos empleando tecnología convencional como la fermentación (para azúcares y carbohidratos), transesterificación (para los aceites y grasas), y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos). De estos procesos se obtiene etanol, metanol y n-butanol (a partir de azúcares), biodiesel (a partir de los aceites), y biogás (obtenido a partir de residuos orgánicos) que es una mezcla de metano y anhídrido carbónico, también conocidos como gas natural y dióxido de carbono respectivamente (Salinas y Gasca, 2009).

Las ventajas de estos biocombustibles son su facilidad de procesamiento, sus bajas emisiones de gases de efecto invernadero (excepto en el caso del maíz, donde el balance de estas emisiones es casi nulo) y un balance positivo en dichas emisiones, pero tiene como desventaja el desvío de recursos alimenticios hacia la producción de energéticos.

Biocombustibles de segunda generación

Son combustibles producidos a partir de materias primas que no son fuentes alimenticias, para lo cual se utilizan tecnologías que todavía están en etapas de investigación y desarrollo. 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 (Medina *et al.*, 2011).

Los procesos de producción tienen un nivel de complejidad más alto que los de primera generación. Mediante los procesos de segunda generación se fabrica etanol, metanol, gas de síntesis (mezcla de anhídrido carbonoso, mejor conocido como monóxido de carbono, e hidrógeno), biodiesel, 2.5-dimetilfurano (DMF), entre otros. La ventaja principal en la producción de estos biocombustibles es la inexistencia de desviaciones de alimentos provenientes de la agricultura hacia el sector energético, utilizando únicamente los residuos existentes (Salinas y Gasca, 2009).

Biocombustibles de tercera generación

Los biocombustibles de tercera generación, también conocidos como biocarburantes avanzados proceden de la biomasa obtenida de especies no comestibles o desechos, incluyendo también en esta categoría a las microalgas. La diferencia con los de segunda generación es la biotecnología utilizada, como las técnicas de biología molecular, mejorando la transformación de la biomasa en biocarburantes.

Uno de los argumentos que más se usan para impulsar el uso de biocombustibles es su contribución a resolver el problema del calentamiento global resultante de la emisión de gases de efecto invernadero. Este aspecto ha sido motivo de gran controversia, pero lo que está claro hoy en día, es que no cualquier biocombustible contribuye realmente a disminuir la cantidad de gases de efecto invernadero en la atmósfera. Un ejemplo de ello es el etanol producido a partir de maíz, el cual, no contribuye a resolver el problema, y el obtenido a partir de la caña de azúcar que sólo tiene un efecto positivo si se obtiene en forma muy eficiente y se aprovechan íntegramente los subproductos (González y Brugués, 2010).

1.3.1 Bioetanol

El bioetanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) es una especie de alcohol etílico producido gracias a una fermentación de la materia orgánica contenida en diversas plantas o cultivos. Bajo condiciones ordinarias, el bioetanol es volátil, inflamable y se encuentra en estado líquido, incoloro, miscible en agua y en solventes no polares.

La producción de etanol tiene dos rutas: química y biológica. La producción química es llevada a cabo a través de una reacción catalítica de hidratación de etileno en fase vapor. El etanol producido con este proceso es mayormente usado como solvente (60%) y como reactivo químico (40%). El etanol producido a través de una fermentación es la otra ruta y corresponde al 93% del total de producción de etanol en el mundo. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo más popular usado para su producción ya que con él se obtienen altos rendimientos de

este alcohol y posee una gran tolerancia a altas concentraciones de etanol. (Cortínez-Villalobos, 2010).

1.3.2 Bioetanol como combustible

El uso del bioetanol como combustible se remonta al origen de los vehículos mismos. Por ejemplo, cuando Henry T. Ford diseñó el Modelo T en 1908, el combustible utilizado era etanol. En tanto, en Alemania, Rudolf Diésel tenía entre sus bocetos un motor que podía funcionar con aceites vegetales.

El bioetanol es usado como combustible en vehículos tanto puro o mezclado con gasolina. Las propiedades fisicoquímicas de algunos oxigenados de alto octanaje son mostrados en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Propiedades de algunos oxigenados de alto octanaje (Cortínez-Villalobos, 2010)

Propiedades	Gasolina	Metanol	Etanol	MTBE
Densidad a 15.6 °C (Kg/m ³)	719 – 779	794	792	742
Calor (KJ/Kg)				
Combustión	41.80 – 44.20	19.934	26.749	35.123
Evaporación	349	1.104	839	326
Punto de Flash (°C)	-42.8	6.5	12	-28
Número de octanos	90 – 100	107	108	116
Presión de vapor (KPa)	55 – 103	32	16	54

Entre las distintas opciones de biocombustibles, el etanol constituye una alternativa particularmente interesante dado que:

- ✓ Es una fuente más limpia de combustibles ya que al ser mezclado con gasolina aumenta el octanaje promoviendo una mejor combustión y por lo tanto reduce la necesidad de incorporar aditivos altamente tóxicos como el benceno

- ✓ Es virtualmente utilizable en todos los vehículos, siendo fácil de producir y almacenar
- ✓ Su combustión sólo produce CO₂ y agua. El CO₂ producido es principalmente neutro (sin impurezas) y dependiendo de la ruta de conversión de la biomasa en combustible y mediante el uso de aditivos, este puede ser utilizado y vendido comercialmente
- ✓ Reduce las emisiones de CO₂ al quemarse con la gasolina, pero el impacto total depende del proceso de destilación y la eficiencia de los cultivos
- ✓ Reduce las emisiones de CO₂ de un 25 % a 30 % con tan solo el 10 % de etanol en la mezcla
- ✓ Su combustión en motores aporta los menores niveles de gases de efecto invernadero (entre un 12 y un 26 %), siendo el transporte el sector económico generador del mayor porcentaje de este tipo de gases a escala global
- ✓ Es una fuente renovable y por lo tanto inagotable (Castillo *et al.*, 2012).

La producción de bioetanol de segunda generación está aumentando en importancia debido a los beneficios en cuanto al medio ambiente se refiere, sin embargo, el hecho de provenir de materiales lignocelulósicos dificulta la acción eficiente de los pretratamientos aplicados para la obtención de celulosa. Por ejemplo, en la hidrólisis ácida o enzimática de los materiales lignocelulósicos una de las limitaciones más importantes es la presencia de lignina, que constituye una barrera física para la penetración del ácido o las enzimas celulósicas. Además la cristalinidad de las moléculas de celulosa dificulta físicamente aún más la acción de las enzimas, requiriéndose una modificación de su estructura mediante un pretratamiento que permita aumentar los rendimientos de azúcares los cuales, pueden ser posteriormente convertidos en etanol mediante fermentación (Álvarez *et al.*, 2012).

1.4 Estructura lignocelulósica

La lignocelulosa que forma parte del BSD, es una red compleja de polímeros entrelazados formados por celulosa, hemicelulosa y lignina, la cual debe ser

fraccionada eficientemente en sus diferentes partes para aprovechar los azúcares simples a los que se reduce esta estructura. A pesar de la gran variedad y cantidad de biomasa lignocelulósica, no toda se puede aprovechar eficientemente, por causa de su disponibilidad, concentración y otros factores, que pueden hacer inviable su aprovechamiento (Agbor *et al.*, 2011).

1.4.1 Celulosa

La celulosa (Figura 1.5) es el carbohidrato más abundante en la naturaleza, estando presente en cantidades de 20-40% de la materia seca de todas las plantas superiores. Es insoluble en agua y está constituida por cadenas lineales que contienen de tres a cinco mil residuos de glucosa unidos y constituye el esqueleto que da soporte a las otras moléculas de la pared celular primaria.

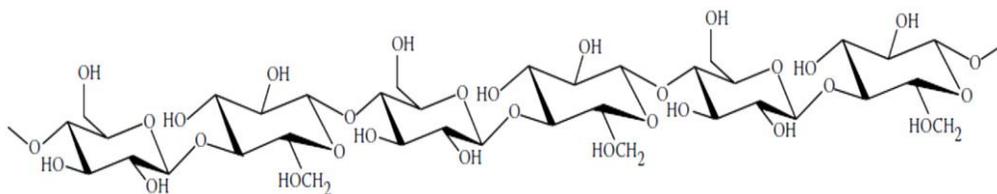


Figura 1.5 Estructura de la celulosa (Harris, 2012)

La celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa. Los múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo, que se establecen entre las distintas cadenas de glucosa, originan fibras compactas de mayores dimensiones denominadas microfibrillas que constituyen la pared celular de las células vegetales. Las regiones donde las microfibrillas presentan una estructura altamente ordenada se llaman regiones cristalinas y las regiones con una estructura menos ordenadas se denominan amorfas, por ello la celulosa se considera un polímero semicristalino.

Por otra parte la estructura molecular de la celulosa y las estructuras de las microfibrillas son aspectos muy importantes que condicionan la posterior hidrólisis de la celulosa. Las diferencias en el grado de polimerización y peso molecular también

influyen en el comportamiento de la celulosa durante la hidrólisis, ya sea mediante el uso de enzimas o productos químicos. Cuanto más ordenada y cristalina es la celulosa es menos soluble y más difícil de degradar. En general, la estructura de la celulosa en los materiales lignocelulósicos, consta de zonas cristalinas y zonas amorfas (Agbor *et al.*, 2011).

Dándose estas condiciones, para romper o penetrar esta estructura se requieren severos tratamientos en específico, que permitan aumentar la accesibilidad de la celulosa. La estructura de la celulosa no es el único factor que limita su accesibilidad, existen también otros componentes que están íntimamente vinculados a ella y forman parte del vegetal, como son la lignina y la hemicelulosa, los cuales dificultan la acción de los diferentes tratamientos o bien el ataque de las diferentes enzimas que pueden utilizarse (Álvarez *et al.*, 2012).

1.4.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa (Figura 1.6), es un grupo de polisacáridos que constituyen la parte principal de los componentes esqueléticos de las paredes celulares de las plantas y se parecen a la celulosa, aunque son más solubles y se extraen y descomponen con mayor facilidad. Consta de polímeros formados por más de un tipo de azúcares tales como la D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, etc, y por varios ácidos urónicos, como el ácido glucurónico. Su función principal es proporcionar la unión entre la celulosa y la lignina (Castillo y Siqueiros, 2011).

Se conocen diferentes tipos de hemicelulosas en las plantas; xilanos, mananos, glucanos, galactanos y galacturanos. Los xilanos y mananos, son los grupos de hemicelulosas más importantes presentes en los materiales lignocelulósicos. En general, las hemicelulosas tienen bajos grados de polimerización, generalmente <200 (Harris, 2012).

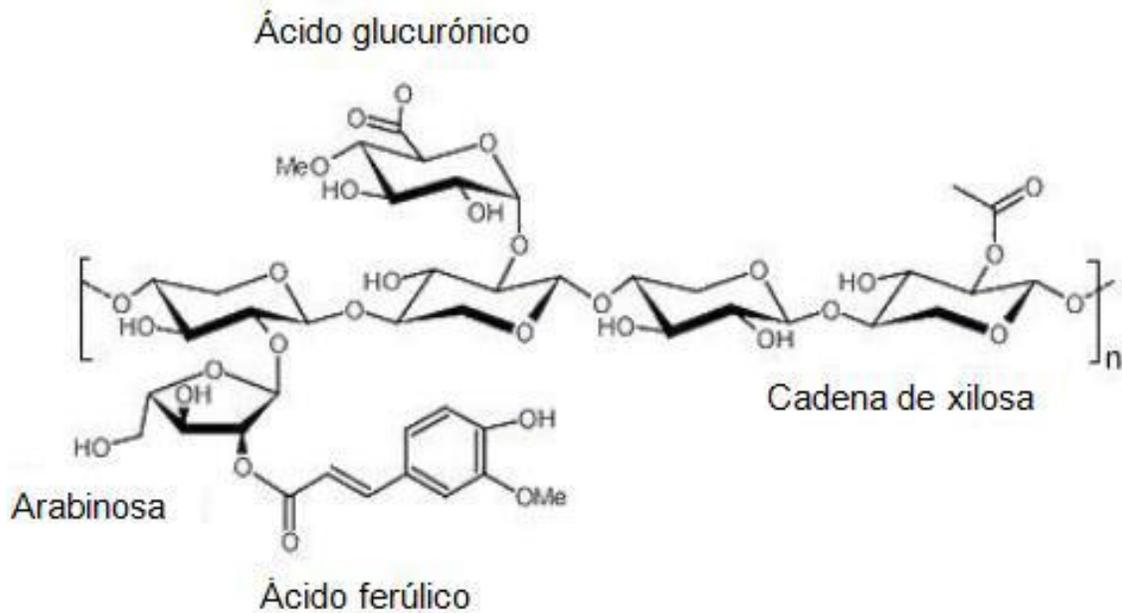


Figura 1.6 Estructura de la hemicelulosa

Existen diferencias en la composición y estructura de las hemicelulosas entre los diferentes tipos de biomásas. En las maderas duras el xilano es el polímero más abundante, está altamente sustituido por grupos acetilo y puede representar hasta un 30% del peso total. Por el contrario, el polímero más abundante en las hemicelulosas de las maderas blandas es el galactoglucomanano y presenta mayor cantidad de unidades de manosa y galactosa que las maderas duras (Medina *et al.*, 2011)

En los residuos agrícolas, el componente hemicelulósico es muy parecido al de las maderas duras pero presentando, al igual que las maderas blandas, menor proporción de grupos acetilo. Las diferencias en la composición de azúcares, la presencia de cadenas más cortas y las ramificaciones de las cadenas principales hacen que la estructura hemicelulósica sea mucho más fácil de hidrolizar que la celulosa (Castillo y Siqueiros, 2011).

1.4.3 Lignina

La lignina es otro componente de los materiales lignocelulósicos, es un polímero de alto grado de carbono, es uno de los mayores componentes de algunas paredes secundarias. No está constituido por azúcares y aparece impregnando a las paredes celulares de ciertos tejidos como, por ejemplo, las células del xilema y del esclerénquima, dándoles rigidez, resistencia, cohesividad e hidrofobicidad.

El contenido en lignina, al igual que en el caso de las hemicelulosas, difiere entre los diferentes materiales lignocelulósicos. La lignina de las maderas blandas está formada principalmente por unidades G (Figura 1.7), mientras que la lignina de las maderas duras está formada por unidades S y G (Chávez y Domine, 2013).

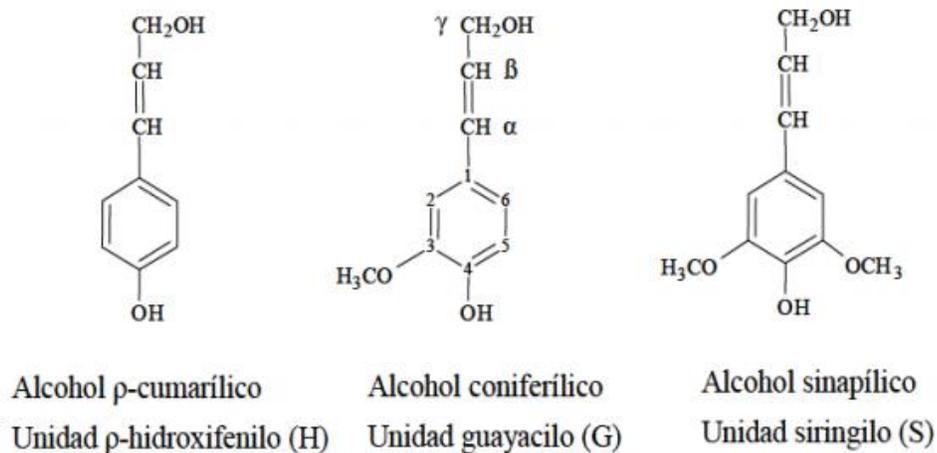


Figura 1.7 Alcoholes cinamílicos precursores de la lignina

A su vez, los materiales herbáceos, son ricos en unidades S, G y H. En el caso concreto de la paja de trigo, la lignina contiene unidades H, G y S en unas proporciones aproximadas de 5, 49 y 46% respectivamente. La estructura química de la lignina de las maderas ha sido ampliamente estudiada, sin embargo en el caso de los materiales herbáceos como la paja, su estructura y las interacciones entre su pared celular no son todavía bien conocidas (Chávez y Domine, 2013).

1.4.4 Influencia de la biomasa lignocelulósica en su procesamiento

La estructura del material lignocelulósico, fuente de origen, edad, características morfológicas y características químicas y estructurales de sus componentes químicos, celulosa, hemicelulosa y lignina, tienen una influencia fundamental en los procesos empleados para la transformación por vía química, física o enzimática del material lignocelulósico en diferentes productos.

Es de gran importancia realizar una caracterización completa del material, para conocer de manera detallada su estructura, características químicas del mismo y sus componentes, de tal forma de poder diseñar los tratamientos más eficaces para lograr una transformación eficiente del material. Otro aspecto de gran importancia a tener en cuenta en el aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos es su manipulación y almacenamiento. Al ser materiales biodegradables, las condiciones de almacenamiento y manipulación, son de gran importancia para la conservación del material en las condiciones adecuadas para su procesamiento, evitando las pérdidas que se pueden producir por procesos de fermentación (de acuerdo a los materiales con alto contenido de azúcar) y degradación incontrolados, que pueden afectar seriamente las propiedades del material y disminuir sensiblemente su rendimiento (Zumalacárregui *et al.*, 2014).

1.5 Pretratamientos

En esta etapa es donde se requiere la utilización de los carbohidratos que constituyen la biomasa, siendo necesario el rompimiento de la estructura lignocelulósica a través de un pre-tratamiento, con el fin de separar la fracción hemicelulósica, rica en xilosa y parte de la lignina (Agbor *et al.*, 2011).

Además es una etapa muy importante para mejorar la eficiencia del proceso de fraccionamiento de la celulosa, estos materiales son poco susceptibles a ataques enzimáticos y microbianos por su composición y estructura físico-química. Esto se debe a la estrecha relación estructural que existe entre la celulosa, hemicelulosa y

lignina (Figura 1.8) que forman una estructura no accesible a las enzimas y a otros agentes químicos y a la cristalinidad de la celulosa.

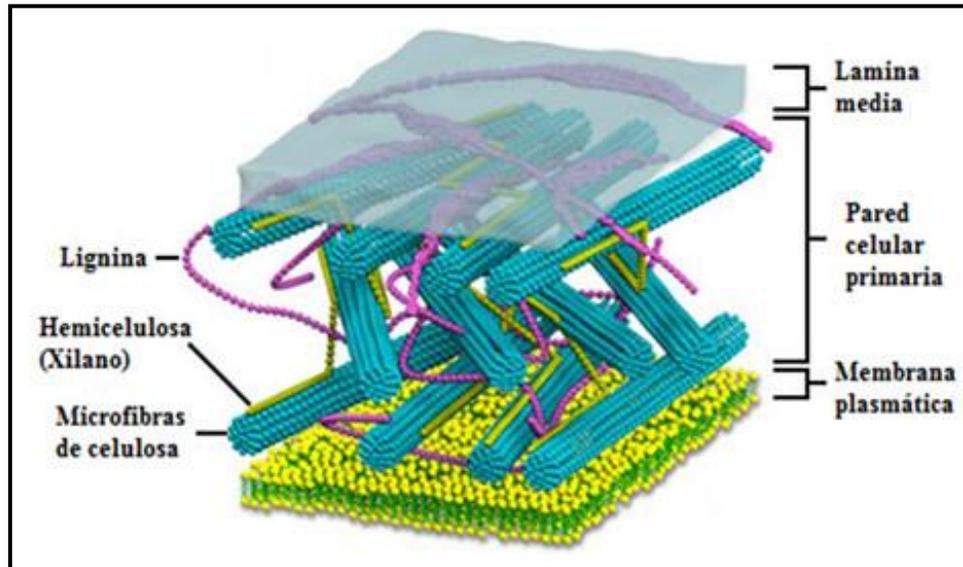


Figura 1.8 Fibrillas de celulosa, rodeadas de hemicelulosa y lignina (Harris, 2012)

1.5.1 Características de un pretratamiento efectivo

Existen varios aspectos importantes a considerar para un proceso de pretratamiento efectivo y a bajo costo, a continuación se mencionan los más importantes:

- ✓ Alta digestibilidad del sólido pretratado

La celulosa derivada del pretratamiento debería ser altamente digerible con rendimientos cercanos al 90 %, también el tiempo de hidrólisis enzimática no debe sobrepasar los 3 días ni cargas enzimáticas de 10 FPU/g de celulosa.

- ✓ Mínima cantidad de compuestos tóxicos.

El hidrolizado líquido derivado del pretratamiento debe ser fermentable y producido a un bajo costo. Las condiciones severas durante el pretratamiento degradan parcialmente la hemicelulosa, generando compuestos tóxicos productos de la descomposición de azúcares que podrían afectar las etapas subsecuentes de

fermentación. Los productos de degradación de los residuos agroindustriales tienen la siguiente clasificación: ácidos carboxílicos, derivados del furano y compuestos fenólicos. Los principales derivados del furano son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural, los cuales provienen de la degradación de pentosas y hexosas respectivamente. En su mayoría, los ácidos débiles son principalmente el acético, fórmico y el levulínico y para el caso de los compuestos fenólicos, se incluyen a los alcoholes, aldehídos y cetonas.

- ✓ Reducción del tamaño de partícula innecesaria. La molienda o el triturado del residuo agroindustrial para reducir su tamaño de partícula previamente al pretratamiento, demanda grandes cantidades de energía, además de encarecer el proceso.
- ✓ Recuperación de la lignina. Los productos de oxidación de la lignina como los alcoholes aromáticos, deben ser recuperados y convertidos a productos de valor comercial.
- ✓ Bajos requerimientos de energía. La demanda de calor y energía para el pretratamiento debe ser baja o compatible con el proceso térmicamente integrado (Viñals *et al.*, 2012).

1.5.2 Pretratamientos físicos

El astillado, el triturado y la molienda son los diferentes métodos de reducción de tamaño de partícula para mejorar la digestibilidad de los residuos agroindustriales. Estos tratamientos aumentan el área superficial disponible y reducen el grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa. El astillado reduce el tamaño de la biomasa hasta 10-30 mm mientras que el triturado y la molienda reducen a un tamaño de partícula hasta 2-0.2 mm. Sin embargo, se ha demostrado que una reducción menor a 0.4 mm no produce efectos en la velocidad y rendimiento de la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica (Agbor *et al.*, 2011).

Los requerimientos de energía para el proceso mecánico en la reducción de tamaño de biomasa lignocelulósica depende tanto de las características de la biomasa, como del tamaño de partícula final requerido. Evidentemente las maderas duras requieren mayor demanda energética que los residuos agroindustriales. Comúnmente se emplea la reducción de tamaño de los residuos agroindustriales para incrementar la eficiencia de la hidrólisis enzimática, sin embargo poca información es proporcionada con respecto a las características del sustrato y la energía consumida en el proceso (Gómez *et al.*, 2013)

Lameda *et al.*, (2011) demostraron que la molienda incrementa los rendimientos de los procesos para obtener bioetanol, biogás y biohidrógeno, no obstante, tomando en consideración los altos requerimientos de energía para escalar el proceso a nivel industrial, así como el incremento en los costos, es improbable que la molienda sea económicamente viable.

1.5.3 Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos en su mayoría han sido asociados a la acción de hongos que son capaces de producir enzimas que degradan lignina, hemicelulosa y polifenoles. Los hongos blancos y suaves de la pudrición han sido reportados como microorganismos degradadores de materiales lignocelulósicos, siendo los más efectivos para el pretratamiento de la biomasa. Los hongos café de la pudrición atacan principalmente a la celulosa, mientras que los hongos blancos y suaves atacan tanto a la lignina como a la celulosa a través de la producción de enzimas tales como la lignina peroxidasa, polifenol oxidasa, manganeso peroxidasa dependiente y lacasas que degradan lignina (Agbor *et al.*, 2011).

Rojas *et al.*, (2011) evaluaron la obtención de azúcares fermentables a partir de fibra de palma prensada a partir de un pretratamiento biológico con los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*, realizando posteriormente una hidrólisis enzimática aplicando celulasa+ β -glucosidasa, encontrando un porcentaje de

sacarificación de 18.4 g de glucosa en la HE/100 g de glucosa potencial en la fibra pretratada lo cual presenta ventajas económicas y ambientales.

Es evidente que la velocidad del pretratamiento biológico es muy lenta para propósitos industriales. El tiempo de residencia de 10 a 14 días, los requerimientos de condiciones controladas de crecimiento y los grandes espacios necesarios para efectuar el pretratamiento biológicos son las desventajas que muestran a este método menos atractivo para su aplicación a escala industrial. El hecho que una fracción de los carbohidratos sea consumida por los microorganismos también es una desventaja.

En base a esta investigación es posible afirmar que los hongos son capaces de degradar celulosa, hemicelulosa y lignina en las plantas debido a un complejo enzimático que producen, que incluyen celulasas, hemicelulasas y ligninasas. Morell *et al.*, (2014) señalaron que los géneros más reportados en la última década incluyen cepas de *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

Analizando el impacto de los pretratamientos biológicos del hongo blanco de la pudrición llevados a cabo en combinación con otros más, se concluyó que tal combinación de pretratamientos ahorró el 15 % de la electricidad requerida para la producción de etanol a partir de la madera, antecediendo al pretratamiento bioorganosolv (Cuervo *et al.*, 2009).

1.5.4 Pretratamientos químicos

Los tratamientos químicos son generalmente empleados para remover el contenido de lignina a los residuos agroindustriales. El uso de agentes alcalinos o ácidos son empleados comúnmente en la industria del papel para la recuperación de celulosa y producción del mismo. Estos procesos tienden a incrementar el costo del proceso, es por eso que se deben seleccionar agentes químicos que permitan la posterior recuperación y aprovechamiento de los subproductos generados. El uso de

hidróxido de sodio es un método químico común que tiene el efecto particular de incrementar el área superficial del residuo agroindustrial debido al hinchamiento y disolución de la lignina (Dopico *et al.*, 2014).

La necesidad de aparatos resistentes a la corrosión, una estrategia efectiva de lavado y la disposición final de los reactivos químicos son las desventajas de los pretratamientos químicos para la remoción de lignina. A continuación se enlistan los agentes químicos más importantes con potencial de recuperación de los productos solubilizados en ellos.

Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

Es usado como pretratamiento de residuos agroindustriales a temperaturas operacionales mayores a los 100 °C en soluciones alcalinas, los aniones de hidroperóxido reaccionan con la lignina presente en la pulpa actuando como nucleófilo y como oxidante, a estas temperaturas, ciertos agentes quelantes son formados para disminuir la velocidad de descomposición. En la industria del papel, se emplea principalmente para propósitos de deslignificación (para mejorar el brillo de la pulpa del papel conforme reacciona con el grupo carbonilo de la estructura de la lignina que le confiere ese color café oscuro).

Las investigaciones de Cuervo *et al.*, (2009), señalan que la descomposición del H₂O₂ en condiciones alcalinas es rápida y como consecuencia se generan radicales más reactivos como los grupos hidroxilo (OH⁻) y los aniones superóxidos (O₂⁻) los cuales son los responsables de la degradación de la lignina. De acuerdo a Medina *et al.*, (2012), el proceso de oxidación se vuelve inestable a altas temperaturas particularmente en el caso de la presencia de ciertos metales de transición como el manganeso (Mn), hierro (Fe) y cobre (Cu), requiriendo la adición de agentes quelantes para reducir la velocidad de descomposición.

La deslignificación de este proceso a escala industrial por lo consiguiente puede ser costosa. A 25 °C en solución alcalina de 1% de H₂O₂, aproximadamente la mitad de la hemicelulosa y lignina del rastrojo de trigo es solubilizado obteniendo un sólido insoluble rico en celulosa que puede ser convertido a glucosa.

Este tratamiento oxidativo de residuos lignocelulósicos, como el rastrojo de trigo, incrementa la susceptibilidad estructural del material para ser digerido por microorganismos presentes en el tracto digestivo de los rumiantes. Llegando a tener buenos efectos tanto en la parcial deslignificación de las paredes de la planta como en la despolimerización de la microfibrillas de celulosa.

Actualmente la investigación realizada por Cuervo *et al.*, (2009), se ha enfocado en el estudio de la reducción de los requerimientos de energía a rangos de 20 °C a 25 °C (temperatura ambiente), empleando bajas relaciones líquido sólido de 1 a 2 % de H₂O₂ con tal de oxidar en gran medida a la lignina remanente del material.

Ácidos diluidos

Los pretratamientos que utilizan ácido diluido resultan en la hidrólisis de una cantidad significativa de la fracción hemicelulósica de la biomasa, obteniendo altos rendimientos de azúcares solubles provenientes de la hemicelulosa, principalmente xilosa. El proceso caliente, que es una variación del pretratamiento con ácido diluido involucra el lavado y la separación de los sólidos pretratados, lo que evita la precipitación de la lignina, así como de los xilanos que se han solubilizado bajo las condiciones de pretratamiento. La remoción completa de la hemicelulosa del residuo agroindustrial durante el pretratamiento es un requisito necesario para la eficiente hidrólisis enzimática de la fracción celulósica. La remoción de la hemicelulosa incrementa la porosidad del sustrato lignocelulósico, aumentando la accesibilidad a la celulosa. El ácido diluido es un pretratamiento viable para todos los tipos de sustratos lignocelulósicos como el rastrojo de maíz, trigo, cebada, bagazo de caña, etc. para obtener altos rendimientos de xilosa en el hidrolizado (Mateus *et al.*, 2012).

En este proceso se emplea ácido sulfúrico, clorhídrico o nítrico en cantidades diluidas. El ácido sulfúrico diluido (0.5-1.5 %) a temperaturas superiores a los 160 °C alcanza altos rendimientos de xilosa (75-90 %) y son las condiciones más adecuadas para aplicaciones industriales. El tratamiento con ácido sulfúrico de 1 a 2 % y a temperaturas menores de 220 °C por pocos minutos reduce el grado de polimerización de la celulosa, mientras que el grado de cristalinidad no decrece (Islas *et al.*, 2012)

Ozono

El ozono ha sido utilizado restrictivamente como pretratamiento de los sustratos lignocelulósicos porque no solo ataca a la molécula de la lignina, sino que también degrada los componentes de la celulosa. La lignina se comporta como una barrera durante el pretratamiento, ya que la lignina consume la mayor parte del ozono durante la degradación de los carbohidratos de los residuos, esta particularidad es benéfica ya que reduce la cantidad de ozono disponible para la degradación de la celulosa, promoviendo la formación de radicales hidroxilo. La degradación de celulosa es atribuida a la oxidación mediada por radicales de los grupos hidroxilo en la glucosa. Los radicales hidroxilos son formados durante la ozonización y a pesar de que la lignina es atacada a mayor velocidad, la celulosa también es degradada cuando la capa protectora de lignina ha sido removida (Tudare *et al.*, 2013)

Organosolventes

Varios solventes orgánicos, así como mezclas de solventes han sido utilizados incluyendo el metanol, etanol, acetona, etilenglicol y alcohol tetrahidrofurfurílico a fin de solubilizar la lignina proporcionando al mismo tiempo celulosa susceptible al ataque enzimático. En comparación con otros procesos químicos, la principal ventaja del proceso organosolv es la recuperación de la lignina en estado puro como un subproducto. En algunos estudios, estas mezclas de solventes son combinados con catalizadores ácidos (HCl, H₂SO₄, oxálico o salicílico) para romper los enlaces de la hemicelulosa. Un alto rendimiento de xilosa puede ser obtenido a través de la adición

de ácidos. No obstante, tal adición de ácido podría ser evitada para una satisfactoria deslignificación al incrementar la temperatura por encima de los 185 °C (Sánchez y Cardona, 2005).

El proceso organosolv ha sido sugerido en combinación con una hidrólisis ácida previa para separar la hemicelulosa y la lignina en 2 etapas de fraccionamiento. Alta remoción de lignina (70 %) y mínima degradación de celulosa (menor al 2 %) es alcanzada (Cuervo *et al.*, 2009).

La remoción de solventes del sistema es necesaria mediante técnicas de separación y extracción como la evaporación y condensación, al mismo tiempo los solventes deberían ser reciclados para reducir los costos operacionales. Los agentes químicos deben ser separados porque podrían inhibir la hidrólisis enzimática y a los microorganismos fermentadores. El alto costo comercial de los solventes es otro factor importante a considerar para aplicaciones industriales. Por razones económicas, entre toda la variedad de solventes, los alcoholes con bajo peso molecular y alta presión de vapor como el metanol y etanol son los más favorecidos (Sánchez y Cardona, 2005).

Explosión a vapor con adición de SO₂

La explosión a vapor puede ser efectuada con la adición de dióxido de azufre, el objetivo de la adición es mejorar la recuperación de las fracciones de celulosa y hemicelulosa. El tratamiento puede ser agregando de 1-4 % de SO₂ (peso/peso de sustrato) en un rango de 160 a 230 °C por 10 min. Polo *et al.*, (2007) estudiaron el proceso de explosión a vapor del sauce adicionando SO₂ o H₂SO₄ con el fin de recuperar la hemicelulosa y la celulosa. El máximo rendimiento de glucosa fue del 95 % cuando el sauce se trató con 1 % de SO₂ a 200 °C. Sin embargo el rendimiento de recuperación de xilosa con SO₂ no fue tan alto comparando con el pretratamiento empleando únicamente ácido sulfúrico.

Explosión de fibra amoniaco (AFEX)

El proceso AFEX es un pretratamiento fisicoquímico alcalino. En este caso la biomasa es expuesta a amoniaco en estado líquido en un rango de 90 a 100 °C por un periodo de 30 min, seguido de una drástica reducción de presión. Los parámetros efectivos del proceso AFEX son la carga de amoniaco, temperatura, cantidad de agua, caída de presión, tiempo y número de tratamientos (Guarnizo *et al.*, 2012).

El AFEX produce únicamente un sólido pretratado, mientras que otros procesos como el de explosión a vapor producen una pasta que puede ser separada en fracciones líquidas y sólidas. El proceso AFEX modifica y reduce efectivamente la fracción de lignina de los materiales lignocelulósicos, mientras que la hemicelulosa y la celulosa permanecen intactas. Las condiciones óptimas del AFEX dependen principalmente de la composición del residuo agroindustrial, por ejemplo para el pretratamiento del pasto (*Panicum virgatum*) se reportan las siguientes condiciones: 100 °C, carga de amoniaco de 1:1 Kg de amoniaco/Kg de materia seca y 5 min de acuerdo a Guarnizo y Martínez, (2009). Una de las mejores ventajas del AFEX es que no conlleva a la formación de compuestos inhibidores los cuales son producidos en otros procesos como el furfural y el 5 hidroximetilfurfural.

Tratamiento con agua caliente

Es uno de los pretratamientos hidrotérmicos más aplicados desde hace décadas en la industria del papel. Agua a alta presión penetra fácilmente en la biomasa, hidrata a la celulosa, y remueve totalmente a la hemicelulosa y parte de la lignina. Una de los mayores beneficios de este método es la no adición de agentes químicos, así como la no dependencia de quipos de proceso resistentes a la corrosión, tampoco se requiere reducción de tamaño del material. Se destaca que a diferencia de procesos como la hidrólisis ácida, en este caso no se requiere neutralizar el hidrolizado que contiene a la xilosa. Los carbohidratos como la hemicelulosa son fácilmente disueltos como oligosacáridos solubles y pueden ser separados de las fracciones insolubles (celulosa y lignina). Pretratamientos como la explosión a vapor así como el de agua

caliente a altas presiones son idóneos para una alta recuperación de pentosas, así como una baja formación de compuestos inhibitorios (Cortes-Ortiz, 2014).

1.6 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis de la celulosa es efectuada a través de las enzimas denominadas celulasas, las cuales son altamente específicas. Usualmente, los productos de la hidrólisis son azúcares reductores, incluyendo celulosa y glucosa. Tanto las bacterias como los hongos son capaces de producir enzimas para la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos. Estos microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios, mesófilo o termófilos, sin embargo, los anaerobios tienen una velocidad de crecimiento lento, así como requerimientos de crecimiento de acuerdo a su condición, es por eso que la mayor parte de la investigación de producción de enzimas ha sido a partir de hongos (González *et al.*, 2011).

1.6.1 Función de las celulasas

Las celulasas se refieren a un grupo de enzimas que contribuyen a la hidrólisis de la celulosa a glucosa. Es comúnmente aceptado que la mayoría de las celulasas provenientes de los hongos consisten en las siguientes enzimas: I) Endo-1,4- β -glucanasa, II) Exo-1,4- β -glucanasa y III) β -glucosidasa. Debido al uso frecuente de estos términos, una forma común de referirse a las anteriores es endoglucanasa, exoglucanasa y beta glucosidasa (Guarnizo *et al.*, 2009).

Las endoglucanasas atacan los enlaces β -1,4 glucosídicos de la celulosa en una acción aleatoria, mientras que las exoglucanasas remueven las unidades de celobiosa de los extremos no reductores de la cadena principal. Cabe destacar que la acción aleatoria de la endoglucanasa incrementa la disponibilidad de los extremos de la cadena principal del glucano. Finalmente la beta glucosidasa digiere la celobiosa para reducirla a monómeros de glucosa (Giorgio *et al.*, 2013).

1.6.2 Etapas de la hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa puede ser dividida en 2 etapas generales:

- ✓ Reacciones externas que ocurren en la superficie de la partícula del sustrato
- ✓ Reacciones internas que ocurren en la parte interna de los poros de la partícula

La primera etapa involucra las siguientes etapas:

- a) Adsorción de las enzimas en la superficie de las partículas
- b) Formación del complejo enzima-sustrato
- c) Transferencia de moléculas de agua hacia los sitios activos del complejo enzima-sustrato
- d) Degradación de la superficie de la celulosa promovida por la enzima
- e) Transferencia de masa de los productos de reacción hacia la totalidad del fluido
- f) Hidrólisis de los celo-oligómeros solubles a glucosa por acción de la beta glucosidasa en fase acuosa (Nochebuena-Morando, 2012).

1.6.3 Transferencia de masa durante la hidrólisis enzimática

La fase inicial de la reacción de hidrólisis comienza por difusión externa de las enzimas a través de la película del líquido estancado alrededor del sustrato. Las enzimas difundidas se adsorben sobre la superficie del sustrato para comenzar la reacción catalítica. En esta fase inicial, las enzimas se adsorben rápidamente sobre la superficie externa de la celulosa, ocupando algunos de los sitios accesibles a la superficie del sustrato. Conforme progresa la reacción, las partículas de celulosa son fraccionadas y como resultado, el número de sitios disponibles disminuye. Este proceso continúa hasta agotar los sitios desocupados, al mismo tiempo la superficie del sustrato es cubierta por complejos de celulasas activas e inactivas. Además de la reacción superficial externa, las enzimas penetran el interior de los poros del sustrato, lo cual promueve la reacción dentro de los mismos, causando cambios estructurales en la materia en proceso de degradación.

Cabe destacar que trabajar en un régimen de agitación intensiva en el proceso de hidrólisis, reduce la resistencia a la transferencia de masa externa, acelerando todo el proceso. Sin embargo, se ha generalizado que las celulasas entran en riesgo de desactivación al ser expuestas a esfuerzos cortantes en la zona de reacción (Salcedo *et al.*, 2011).

1.6.4 Cellic CTec3

La Cellic CTec3 es un coctel de múltiples enzimas utilizado en la producción de biocombustibles, es capaz de romper o degradar la celulosa contenida en la biomasa en azúcares simples que pueden ser fermentados en etanol. Dicho complejo energético ha demostrado ser altamente eficaz trabajando con una variedad de materias primas incluyendo mazorcas de maíz, tallos de paja de trigo, residuos de sólidos urbanos, bagazo de caña, astillas de madera y cultivos bioenergéticos.

El complejo enzimático Cellic CTec3 realiza un trabajo 5 a 1 veces mejor que su productor antecesor en el mercado (Cellic CTec2). Se estima según su proveedor (Novozymes) que se necesitan aproximadamente 50 Kg de esta enzima para lograr convertir una tonelada de biomasa a etanol, lo cual es un buen parámetro comparado a la Cellic CTec2 de la cual eran necesarios 250 Kg de enzima para lograr la conversión de la misma cantidad de biomasa (Novozymes, 2014).

1.7 Trabajos relacionados realizados por otros autores

López *et al.*, (2008) evaluaron la producción de etanol de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña. Compararon el desempeño de dos agentes químicos para el pretratamiento del residuo agroindustrial, hidróxido de calcio y peróxido de hidrógeno alcalino para mejorar la susceptibilidad del bagazo de caña en la acción enzimática. Condiciones suaves de temperatura, presión y ausencia de ácidos fueron escogidos para disminuir los costos y evitar la degradación de azúcares y la consiguiente formación de inhibidores. El bagazo fue utilizado tal cual proviene del ingenio, sin pasar por un proceso de reducción de tamaño, la hidrólisis fue efectuada a una baja

carga enzimática, se emplearon 3.5 unidades de papel filtro de celulosa por gramo de biomasa seca pretratada y 1 unidad de celobiosa de β -glucosidasa por gramo de biomasa seca pretratada. El pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino llevó al rendimiento de glucosa de 691 mg/g de bagazo pretratado después de la hidrólisis del material sometido a 1 h de pretratamiento a 25 °C con 7.35 % v/v de peróxido. La fermentación de los hidrolizados provenientes de los dos pretratamientos se llevó a cabo y se compararon con la fermentación de una solución de glucosa. El rendimiento de etanol de los hidrolizados fue similar al obtenido por la fermentación de la solución de glucosa.

Tejeda *et al.*, (2010), obtuvieron etanol a partir de residuos de naranja y piña para lo cual llevaron a cabo una hidrólisis ácida de dichos residuos aplicando un pretratamiento alcalino con una solución de NaOH 0.1 N por 3 h, para después tratar dichos residuos con 50 mL de H₂SO₄ al 5 % por cada 100 g de cáscaras (piña o naranja) mediante autoclave a 125 °C y 15 min de tiempo. Como resultado determinaron cantidades diferentes de glucosa siendo 80 g/L para la naranja y 45 g/L para la piña, las mayores concentraciones de glucosa obtenidas para estas frutas. Aunque se puede observar que la cantidad de azúcares potencialmente fermentables es baja, es importante reconocer que las cáscaras son unos residuos que ya no son aprovechados y por lo tanto no tiene costo.

Chen *et al.*, (2010) reportaron que tratando el bagazo de caña de azúcar con microondas y temperaturas entre 170-190 °C durante 5 y 10 min se puede lograr un material adecuado para la hidrólisis enzimática posterior, ya que se rompe la estructura cristalina de la celulosa, además cuando se añade ácido sulfúrico se remueven alrededor del 95 % de las hemicelulosas presentes en el bagazo.

González *et al.*, (2011), realizaron la optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades determinando la composición química de la mezcla y sometiéndola a un pretratamiento alcalino con

NaOH a 3 diferentes relaciones líquido-sólido para posteriormente ser atacada por una mezcla enzimática de celulasa y β -glucosidasa (Celluclast Novozymes, 188). Encontraron las mejores condiciones de procesamiento enzimático a las 48 h a expensas de una pérdida del 15 % del rendimiento final aunque esto se ve compensado en comparación a las 160 h iniciales a las cuales se realizaba el proceso, lo cual representaba un tiempo demasiado extenso. Obtuvieron un rendimiento de glucosa de entre el 75 % y el 80 %.

Tejeda *et al.*, (2011), realizaron un proceso de hidrólisis enzimática a partir de virutas de madera blanca (álamo) aplicando un pretratamiento con ácido sulfúrico al 1.25 %, utilizando Celluclast 1.5 y β -glucosidasa para la parte enzimática, ambas enzimas producidas por Novozymes las condiciones de trabajo utilizadas fueron de 200 rpm y un tiempo de 96 h. Obtuvieron como resultado una producción de 18 g/L de glucosa y 1.4 g/L de xilosa a las 48 h de reacción, mientras que a las 96 h, los resultados obtenidos fueron de 42 g/L de glucosa y 3.4 g/L de xilosa. La conversión de celulosa a glucosa final fue del 96 % aproximadamente después de 96 h.

Bonifacino-Buttiglione (2012) evaluó la deslignificación del bagazo de caña de azúcar por *P. ostreatus*, *P. crysosporium* y *T. versicolor*. Para ello comparó la cinética de producción de las enzimas Lacasa, Manganese Peroxidasa, Lignino Peroxidasa y Carboximetilcelulasa por fermentación en estado sólido (SSF) y fermentación sumergida (SF) del bagazo de caña de azúcar la mayor actividad de todas las enzimas se logró con *P. crysosporium* a los 7 días de incubación mediante el proceso SSF. La evaluación de los procesos de deslignificación se realizó determinando la facilidad a la hidrólisis de la celulosa obtenida mediante el pretratamiento. Se realizó la hidrólisis enzimática al bagazo de caña pretratado para lo cual se utilizó una celulasa comercial caracterizada previamente sobre un sustrato óptimo. Luego de hidrolizar el bagazo de caña de azúcar pretratado, se pudo determinar que el tratamiento con *P. crysosporium* mediante el proceso SSF durante 14 días, permitió un aumento del 20.81 % en la producción de azúcares

fermentables. Posteriormente se evaluaron las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática de bagazo de caña, y se determinó que la concentración del bagazo debe ser de 5 % (p/v), y que el tiempo de incubación a 36 °C debe ser de 36 horas.

Nochebuena-Morando (2012) realizó la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar con un pretratamiento ácido utilizando H_2SO_4 al 2 % y uno alcalino utilizando H_2O_2 al 4.7 % en una RLS de 17:1 con un tiempo de reacción de 45 h, posteriormente utilizó Celulasa Celluclast marca Sigma Aldrich y β -glucosidasa (Novozyme 188) para llevar a cabo la etapa enzimática utilizando una RLS de 1:9 en agitación constante de 200 rpm y 20 °C empleando también el Tween 80. Encontró las mejores condiciones de operación con una adición de 900 μ L de Tween 80 y una carga enzimática de 485.7 μ L de celulasa y 630 μ L de β -glucosidasa por cada gramo de bagazo en un tiempo de reacción de 96 h para lograr obtener 54.4 g/L de glucosa.

Dopico *et al.*, (2014) realizaron un pretratamiento ácido combinado con irradiación por microondas a tres tipos de madera para demostrar que disminuyen los tiempos de reacción y que se mantiene un calentamiento uniforme en la mezcla de reacción. Los mejores rendimientos de azúcares (expresados como glucosa libre después de la hidrólisis) fueron obtenidos realizando el pretratamiento con microondas a las maderas suaves y hierbas a 140 °C por 30 min y una concentración de H_2SO_4 de 0.82 %, lo que demuestra que no es necesario utilizar altas concentraciones de ácido ni altas temperaturas. Las maderas suaves y otras plantas son más fáciles de hidrolizar que las duras.

Rodríguez-Molina (2014), llevó a cabo el proceso de optimización de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña utilizando las mismas condiciones de pretratamiento ácido empleadas por Nochebuena (2012) pero reduciendo el tiempo de exposición del bagazo en el medio alcalino a tan solo 27 h. Para la etapa enzimática empleó Celulasa Celluclast marca Sigma Aldrich y β -glucosidasa (Novozyme 188). Obtuvo un valor máximo de producción de glucosa de 45.45 g/L diferencia que se puede

justificar a que en este trabajo el bagazo hidrolizado fue 5 veces mayor al tratado por Nochebuena (10 g), el tiempo de la etapa enzimática fue reducido a tan solo 72 h de reacción, empleando 200 rpm y 50 °C.

Viveros *et al.*, (2014) realizaron la optimización de la hidrólisis acida del bagazo de sorgo dulce, utilizando ácido sulfúrico mediante un diseño experimental Box Behnken, teniendo como variables independientes: concentración de H₂SO₄ (1, 1.5 y 2 % v/v), tiempo de pretratamiento (20, 30 y 40 min) y relación líquido-sólido (4, 5 y 6 mL/) y como variable de respuesta la concentración de xilosa (g/L). Los resultados mostraron durante la etapa de la hidrólisis ácida rendimientos de aproximadamente 68 % de azúcares provenientes de la hemicelulosa (principalmente xilosa).al utilizar una concentración de H₂SO₄ de 1.5 %, tiempo de 40 min y RLS de 4:1, obteniendo una concentración de 39.58 g/L de xilosa, resultado superior al óptimo obtenido de 38.92 g/L a partir del modelo de regresión cuadrática generado.

Meléndez *et al.*, (2015) realizaron el análisis de dos diferentes tipos de pretratamientos para dos tipos de bagazo de caña (natural e hidrolizado): el primer pretratamiento consiste en una autohidrólisis a 121 °C y el segundo en un pretratamiento alcalino-oxidativo. Los productos de los dos tipos de pretratamiento se utilizaron para realizar una hidrólisis enzimática utilizando el complejo comercial Accellerase 1500, donde se encontró que el mejor pretratamiento fue el alcalino-oxidativo donde se obtuvieron hasta 12 g/L de glucosa para el bagazo hidrolizado (78.68 % g/g) y 9.9 g/L para el bagazo natural (60.20 % g/g), mientras que en la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado mediante la autohidrólisis se obtuvieron concentraciones de 0.704 g/L para el bagazo natural (6.67 % g/g) y de 1.899 g/L para el bagazo hidrolizado (19.65 % g/g). Comprobaron que el tamaño del material no es tan influyente como la temperatura del proceso de autohidrólisis, debido a que realizaron este tratamiento con bagazo molido pero a una temperatura de 121 °C (proceso con temperaturas optimas de entre 130 a 200 °C) obteniendo resultados menos favorables que los obtenidos a temperaturas mayores.

1.8 Planta piloto

Se define como Planta Piloto al proceso que consiste en partes específicas ensambladas que operan como un todo armónico con el propósito de reproducir a escala procesos productivos. En estos procesos intervienen fenómenos, simples o complejos, de interés para la ingeniería química, permitiendo el análisis de las interacciones presentes en operaciones tales como la termodinámica, el flujo de fluidos, la transferencia de masa y energía, las reacciones químicas, la biotecnología, el control de procesos, entre otras. También facilita la posterior operación y aplicación a nivel industrial o en algún área de trabajo determinada; sirve además para la confrontación de la teoría (modelos) con la práctica y la experimentación en las áreas del conocimiento antes mencionadas. El uso de plantas de proceso a escala piloto tiene como propósitos principales:

- ✓ Predecir el comportamiento de una planta a nivel industrial, operando la planta piloto a condiciones similares a las esperadas. En este caso los datos obtenidos serán la base para el diseño de la planta industrial.
- ✓ Estudiar el comportamiento de plantas industriales ya construidas, en donde la planta piloto es una réplica y estará sujeta a condiciones de operación previstas para la planta industrial. En este caso a la planta piloto se le llama modelo y tiene como función principal mostrar los efectos de los cambios en las condiciones de operación de manera más rápida y económica que si se realizaran en la planta original (Anaya y Pedroza, 2008).

1.8.1 Escalamiento

El concepto de escalamiento es el proceso mediante el cual se desarrollan los criterios y las reglas de asignación numérica que determinan las unidades de medida significativas para llevar de un tamaño dado a otro tamaño mayor o menor una operación u objeto (Anaya y Pedroza, 2008).

Escalar un proceso o equipo, es convertirlo de su escala de investigación (laboratorio o piloto) a escala industrial (producción). En la actualidad, la complejidad de las necesidades humanas así como el avance tecnológico hacen cada vez más complicadas las operaciones de escalamiento pues ya no sólo se desea escalar hacia las grandes naves industriales sino también hacia la microescala y la nanoproducción. Ya no son sólo la química y la física (si bien aún fundamentales) las únicas disciplinas que intervienen en el escalamiento, ahora se tienen a la biología y la robótica, entre otras., todas ellas trabajando en conjunto para lograr dar ese salto hacia la producción a nivel industrial (Figura 1.9).

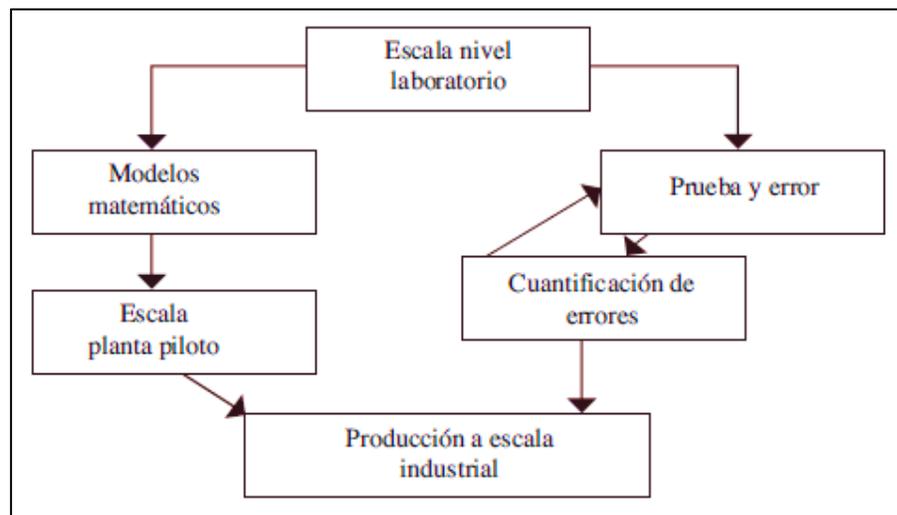


Figura 1.9 Procedimiento para el escalamiento a nivel industrial

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología realizada en esta investigación se presenta de manera resumida y ordenada a través de la Figura 2.1.

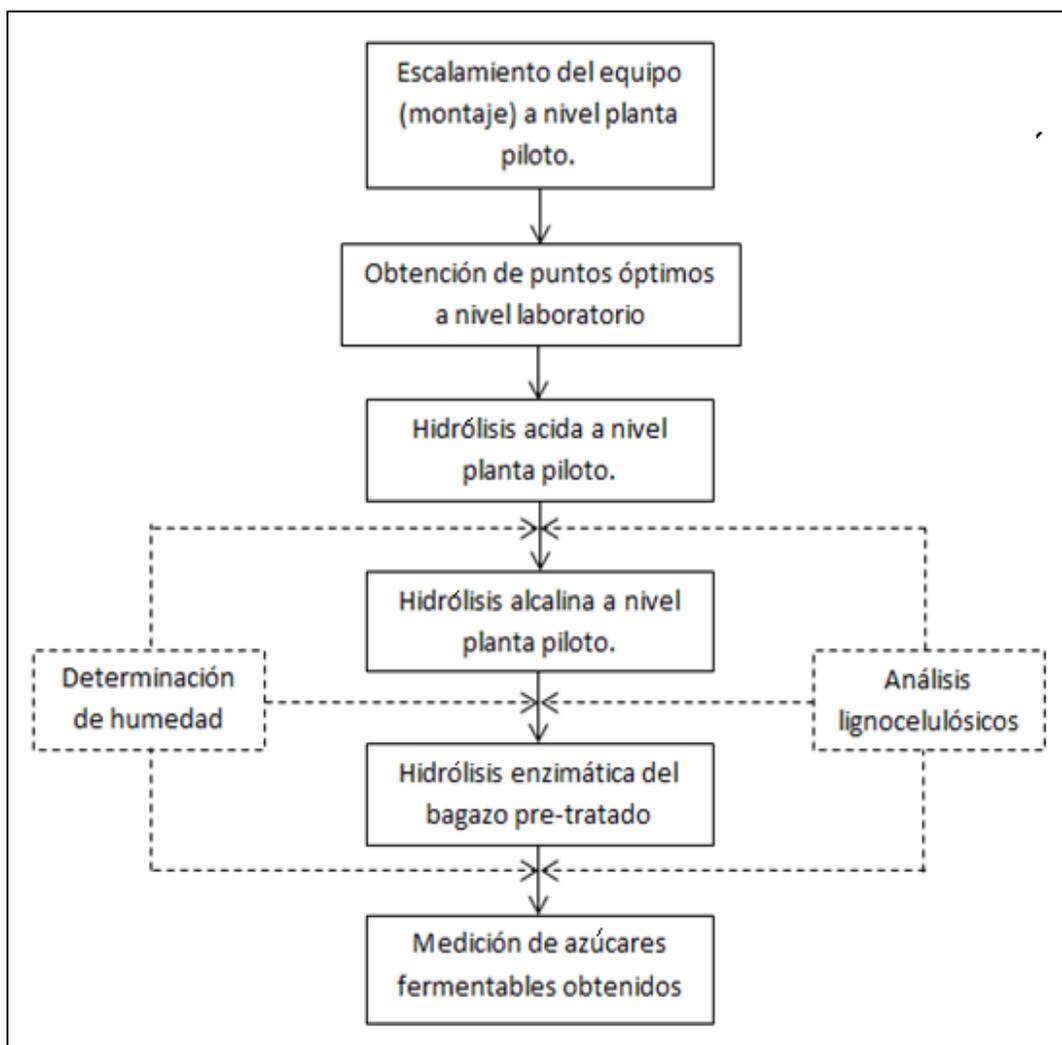


Figura 2.1 Metodología para la hidrólisis enzimática a nivel planta piloto del BSD pretratado

2.1 Obtención y acondicionamiento del bagazo de sorgo dulce

La obtención del BSD comienza desde la recepción de la caña de sorgo dulce en una variedad denominada “RB cañero”, el cual fue proporcionado por el Instituto Nacional

de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el municipio de Cotaxtla perteneciente al estado de Veracruz. Una vez que la caña llega a la planta piloto del Instituto Tecnológico de Veracruz es sometida a un proceso de molienda con lo cual se logra separar la fase sólida (Bagazo) de la líquida (jugo), el jugo es almacenado en tanques de semilla para después ser fermentado, mientras que el bagazo es separado en contenedores para su posterior tratamiento.

Después del proceso de molienda el BSD presenta una estructura alargada, tamaño dependiente de la caña) lo que hace necesario someterlo a una reducción de tamaño, a fin de incrementar la eficiencia de los pretratamientos (ácido y alcalino). Mediante una cortadora manual el bagazo es sometido a un juego de seis cuchillas que cortan el bagazo hasta un tamaño moderado, posteriormente a la misma cortadora se la adapta una malla y el bagazo vuelve a pasarse por las cuchillas logrando que el tamaño de la muestra obtenida sea igual o menor al tamaño de la malla tamiz (1 cm).

Una vez que se tiene todo el BSD cortado (120 Kg), se acomoda en lonas y se expone a secado solar hasta eliminar la mayor cantidad de humedad presente en él, es importante mencionar que también se almacenó en refrigeración una muestra de 8 Kg de BSD húmedo, es decir sin pasar por el proceso de secado pues la experimentación a realizar contempla comparar ambos procedimientos tanto en base seca como en base húmeda para posteriormente realizar una comparación en cuanto a los rendimientos, el tiempo y los reactivos gastados en ambos procesos.

El proceso de secado de aproximadamente 48 h (Figura 2.2) es realizado como una alternativa para la conservación de la materia prima pues el BSD al salir del proceso de molienda contiene un alto porcentaje de humedad ($\pm 70\%$) lo cual favorece la proliferación de microorganismos que pueden afectar a los pretratamientos previos a la hidrólisis enzimática o bien descomponer el material (proceso de putrefacción).



Figura 2.2 Secado por radiación solar del bagazo de sorgo dulce (BSD)

2.2 Caracterización del bagazo de sorgo dulce

La caracterización del BSD consiste en un análisis composicional para determinar: humedad, contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Es importante mencionar que previo a la etapa de hidrólisis ácida, el BSD fue totalmente mezclado para homogenizar el tamaño de partícula, con el fin de reducir la variabilidad, consecuencia de la etapa de molienda en el proceso de separación del jugo de sorgo dulce y del BSD.

La caracterización del BSD se realizó de acuerdo a las normas AOCS (American Oil Chemists' Society) y el método tecnológico de ANKOM establecidos en la Tabla 2.1, estas determinaciones fueron realizadas en el laboratorio de nutrición animal ubicado en el campo experimental "La Posta", perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en el municipio de Paso del Toro, Veracruz.

Tabla 2.1 Parámetros para la caracterización del bagazo de sorgo dulce

Prueba	Método	Anexo
Humedad	Termobalanza	A1
Hemicelulosa	Fibra detergente neutro y ácido (ANKOM)	A2 A3
Celulosa y lignina	Fibra detergente ácido-lignina (ANKOM)	A4

2.3 Obtención de puntos óptimos de la hidrólisis enzimática a nivel laboratorio (base seca)

En la optimización del proceso de hidrólisis enzimática del BSD, es necesario proporcionar los tratamientos ácido y alcalino a la materia prima con la finalidad de obtener un mejor ataque enzimático a la celulosa obtenida. Para este punto se trabajó a nivel laboratorio, exponiendo al BSD a una etapa de secado solar de 48 h al término de cada pretratamiento, es por ello que únicamente se emplearon 2 Kg iniciales, previo análisis de humedad para conocer con certeza la cantidad neta de bagazo que se está aplicando y considerar el porcentaje de agua presente en la materia prima al momento de preparar los reactivos empleados en cada etapa del proceso.

2.3.1 Condiciones de la hidrólisis ácida

De acuerdo a Domínguez *et al.*, (2011) el BSD se sometió a un pretratamiento ácido utilizando H_2SO_4 al 1.5 % en una relación líquido sólido (RLS) de 5:1, utilizando matraces de 500 mL en un autoclave marca AESA modelo CV-250 a una presión de 15 psia (1.2 Kg/cm^2) durante 33 min, cuando el proceso estuvo completo, el bagazo fue prensado y lavado 2 veces con agua común en una RLS de 5:1, pesando el bagazo húmedo obtenido y secándolo mediante radiación solar durante 48 horas.

El tiempo de calentamiento de la resistencia de la autoclave es de 35 min, mientras que el tiempo de enfriamiento es de 25 min haciendo un tiempo total de 93 min invertidos en el proceso (calentamiento + sostenimiento + enfriamiento).

2.3.2 Condiciones de la hidrólisis alcalina

Transcurridas 48 h de secado solar del bagazo, se analizó la humedad aun contenida mediante una termobalanza marca precisa modelo XM 50 y en base a ese dato se prosiguió a realizar el pretratamiento alcalino utilizando H_2O_2 al 4 % en una RLS de 16:1, ajustando el pH a 11.5 utilizando NaOH 10 M, cuando el pH se encuentra ajustado, la reacción se deja llevar a cabo por 45 h para finalmente separar la fracción líquida de la sólida, mediante un prensado manual, y a esta última realizarle 2 lavados con agua del grifo en una RLS de 5:1 a fin de eliminar los rastros de lignina presentes. Nuevamente se aplicó secado solar para continuar con la siguiente etapa.

2.3.3 Evaluación de factores para el diseño de experimentos

Para la etapa enzimática, se planteó un diseño experimental Box Behnken de 3 variables, el cual es una alternativa a los diseños factoriales 3^k , y que se forma a través de la combinación de factoriales 2^k con bloques incompletos. El resultado es un diseño rotatable que hace uso eficiente de las unidades experimentales, además de implementar modelos de segundo orden a partir de los 3 niveles para cada factor que son considerados en el diseño. El número total de corridas experimentales para este diseño es de 15, número menor a los 20 experimentos de un diseño central compuesto de 3 variables y 27 requeridos de un diseño 3^3 sin réplica. El diseño Box-Behnken solamente requiere de 3 niveles para cada factor. Se consideraron como variables independientes a tres niveles: la carga enzimática en relación p/p (5, 6 y 7 %), la relación líquido-sólido (5:1, 7:1 y 9:1) y el tiempo de reacción (24, 48, y 72 h) y como variable de respuesta la concentración de glucosa (g/L). Como resultado de ello se obtuvo el diseño de experimentos Box Behnken propuesto mediante la Tabla 2.2. Es importante mencionar que la enzima se encuentra en estado líquido por lo cual primero se calcula el % (p/p) en relación con la cantidad de bagazo tratado y posteriormente se divide entre la densidad de la enzima (1.2 g/mL) para conocer los mL de enzima necesarios para cada prueba.

Tabla 2.2 Diseño Box Behnken para la hidrólisis enzimática del BSD

Experimento	VARIABLES CODIFICADAS			VARIABLES NATURALES		
	Enzima (% p/p)	Tiempo (h)	RLS	Enzima (% p/p)	Tiempo (h)	RLS
1	-1	-1	0	4	24	7:1
2	1	-1	0	6	24	7:1
3	-1	1	0	4	72	7:1
4	1	1	0	6	72	7:1
5	-1	0	-1	4	48	5:1
6	1	0	-1	6	48	5:1
7	-1	0	1	4	48	9:1
8	1	0	1	6	48	9:1
9	0	-1	-1	5	24	5:1
10	0	1	-1	5	72	5:1
11	0	-1	1	5	24	9:1
12	0	1	1	5	72	9:1
13	0	0	0	5	48	7:1
14	0	0	0	5	48	7:1
15	0	0	0	5	48	7:1

2.3.4 Hidrólisis enzimática a nivel laboratorio

Una vez obtenida la celulosa, se procedió a realizar la hidrólisis enzimática, utilizando como enzima la Celulasa Cellic CTec3 de Novozymes y como fase líquida CH_3COONa 0.05 M, ajustando el pH a 5 mediante NaOH 10 M y CH_3COOH glacial. La experimentación se realizó en matraces de 250 mL, siendo importante mencionar que la fase líquida de CH_3COONa siempre fue de 100 mL, por lo cual, lo que se varía en cada matraz es la cantidad de bagazo. El proceso fue desarrollado en una incubadora marca Lab Tech (Figura 2.3) que fue programada a 250 rpm y 50 °C, dos de las condiciones óptimas de trabajo de la Cellic CTec3, el tiempo de reacción fue diferente en cada matraz dependiendo al diseño propuesto.



Figura 2.3 Incubadora Lab Tech

Al terminar la hidrólisis enzimática, la fracción líquida fue separada de la celulosa que no se degradó en cada matraz, la cual es una pequeña mezcla de celulosa cristalina y celulosa amorfa, para de esta manera medir los °Brix a la solución con un refractómetro modelo ATC de 0-30 °Brix. Las muestras de hidrolizado restantes se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, a continuación se les aplicó un pretratamiento para precipitar las impurezas que consiste en aplicar 125 mL de óxido de bario 0.3 M y 125 mL de sulfato de zinc al 5 % p/v a 1 mL de muestra, la mezcla se colocó en tubos eppendorf, dejando reposar 12 min y centrifugando durante 10 min para posteriormente analizarlos por HPLC marca Waters modelo 2414 (Figura 2.4). El HPLC cuenta con una columna Shodex SH1011 que utiliza como fase móvil H_2SO_4 concentración 5 mM a un flujo de 0.6 mL/min a 55 °C y detector índice de refracción a 50 °C. Los datos proporcionados por el HPLC deben ser introducidos al software NCSS como la variable de respuesta, a partir de la cual el programa proporcionará las condiciones óptimas de trabajo.



Figura 2.4 Equipo HPLC Waters para cuantificación de productos

2.3.5 Optimización de la respuesta de la hidrólisis enzimática en base seca

Las condiciones óptimas proporcionadas por el software NCSS, así como la respuesta del modelo matemático arrojado, pueden ser comprobadas mediante un posterior análisis canónico. De acuerdo a Montgomery (1991), puede obtenerse una solución general para el punto estacionario del modelo de la hidrólisis enzimática en base seca, de acuerdo a la notación matricial para el modelo de segundo orden se tiene la ecuación 2.1.

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + x'b + x'Bx \quad (2.1)$$

En donde:

$$X = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ X_k \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_1 \\ \hat{\beta}_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \hat{\beta}_k \end{bmatrix} \quad y \quad B = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_{11}, & \hat{\beta}_{12}/2, & \dots, & \hat{\beta}_{1K}/2 \\ & \hat{\beta}_{22}, & \dots, & \hat{\beta}_{2K}/2 \\ \text{sim} & & & \hat{\beta}_{KK} \end{bmatrix}$$

El punto estacionario está dado por la ecuación 2.2 que se muestra a continuación.

$$x_0 = -\frac{1}{2}B^{-1}b \quad (2.2)$$

Sustituyendo la Ec. (2.2) en la Ec. (2.1) se determina la respuesta predicha en el punto estacionario, obteniendo la ecuación 2.3.

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \frac{1}{2}x_0'b \quad (2.3)$$

Mientras que el análisis canónico se puede representar mediante la ecuación 2.4

$$\hat{y} = \hat{y}_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (2.4)$$

2.3.6 Cinética de la hidrólisis enzimática

A partir de los resultados obtenidos de la hidrólisis enzimática y considerando las condiciones óptimas proporcionadas por el NCSS, en cuanto a tiempo, cantidad de enzima y RLS, se preparó una muestra y su respectiva replica respetando dichas condiciones y realizando un muestreo a las 4, 8, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84 y 92 horas con muestras de aproximadamente de 1 mL guardadas en tubos ependorff. Todas las muestras fueron almacenadas y sometidas a congelación para conservar las diferentes concentraciones de glucosa (g/L) presentes en ellas, las cuales se cuantificaron mediante HPLC.

2.4 Obtención de puntos óptimos a nivel laboratorio (base húmeda)

La determinación de puntos óptimos en base húmeda se realizó de manera idéntica a las determinaciones hechas en la sección 2.3 en base seca, eliminándose todas las etapas de secado aplicadas entre cada una de las fases del proceso. Al finalizar las 45 h el bagazo alcalino comenzó su etapa enzimática aplicando el mismo diseño de experimentos de la Tabla 2.2. Las determinaciones de °Brix y de glucosa se realizaron de igual forma que en el experimento en base seca. Al ser un proceso continuo, es importante determinar la cantidad de humedad al final de cada etapa debido a que esta misma cantidad de agua puede ser considerada al instante en que se preparan las soluciones utilizadas en cada uno de los tratamientos.

Es importante destacar que la experimentación en base húmeda debe de llevarse a cabo en proceso continuo debido a que la presencia de humedad favorece a la proliferación de microorganismos indeseables y la descomposición de la materia prima (BSD) en su etapa inicial es decir la putrefacción de este, o bien, mantener el BSD refrigerado hasta el comienzo de los pretratamientos.

2.5 Adaptación del equipo a nivel planta piloto para la hidrólisis enzimática

En la presente investigación el equipo utilizado para las hidrolisis enzimáticas a nivel planta piloto fue un tanque de acero inoxidable de 60 L, el cual forma parte del laboratorio de bioingeniería del ITVer, en este proceso se modificó el sistema de agitación, implementando un motor con flecha capaz de producir una agitación de hasta 1500 rpm, lo cual a su vez maximiza el contacto entre la celulosa, la fase móvil y la enzima, produciendo una mayor interacción entre estos tres factores ocasionando una mejor degradación del material y consecuentemente una producción de azúcares alta, para alcanzar la temperatura deseada (50 °C), se empleó un recirculador de agua el cual cuenta con un serpentín de calentamiento, además de aislar todo el tanque con unicel y tiras de neopreno para evitar las pérdidas de calor hacia el exterior y disminuir el gasto energético.

Se trabajó con una masa de 4 Kg de celulosa neta a hidrolizar, considerando las condiciones que se obtuvieron del Diseño de experimentos (RLS, % enzima y tiempo) de la etapa desarrollada en la sección 2.3.4, destacando que la experimentación a mayor escala sobre el bagazo de sorgo dulce llevada a cabo en el laboratorio, únicamente ha alcanzado 1 Kg de celulosa como máximo.

2.6 Pretratamiento ácido a nivel planta piloto

Se hidrolizaron 30 Kg de BSD en lotes de 3 Kg, el tratamiento inicia con la preparación de una solución de H_2SO_4 al 1.5 %, la cual debe mezclarse con el bagazo a fin de obtener un contacto previo al proceso del autoclave, la RLS establecida para este tratamiento es de 5:1, para esto es indispensable realizar el análisis de humedad con la finalidad de conocer la cantidad de agua aun contenida en el material, misma cantidad que será descontada en el momento de preparar la solución de ácido, logrando el mínimo desperdicio de reactivos.

Los hidrolizados ácidos fueron llevados a cabo en vasos de vidrio refractarios con una capacidad de almacenar hasta 1 Kg de bagazo, el tratamiento se realizó en una autoclave marca AESA modelo CV-250 a una presión de 15 psia (1.2 Kg/cm^2) durante 33 min, siendo estos independientes al tiempo en que el autoclave tarda en alcanzar la presión establecida (aproximadamente 35 min) y al tiempo en que se enfría (aproximadamente 25 min).

Todo el bagazo pre hidrolizado se guardó en un contenedor hasta completar los primeros 15 Kg de BSD crudo. Posteriormente se realizó un prensado manual del material para tratar de extraer la mayor cantidad de líquido posible el cual se almacenó en garrafones con una capacidad de 20 L cada uno, dicha fracción líquida recuperada contiene glucosa y xilosa por lo que es un medio idóneo para desempeñar una fermentación y una siguiente destilación.

El bagazo prensado se pesó para calcular la relación de agua que se debe utilizar en los lavados, recordando que la RLS utilizada es 5:1, depositándolo en una marmita de acero inoxidable junto con el agua, homogenizando la mezcla para lograr una mayor remoción de la hemicelulosa aun presente, la mezcla se dejó reposar durante 10 min, separando la fase líquida (agua de lavado) de la sólida (bagazo), exprimiendo únicamente con las manos y colocando el bagazo en un recipiente adecuado, el agua de lavado es almacenada en garrafones de 20 L y guardada para la siguiente parte del proceso ya que gracias a su pH bajo esta tiene la capacidad de disminuir el pH de la hidrólisis alcalina.

Cuando se ha terminado el primer lavado, el bagazo exprimido es vertido nuevamente en la marmita y se procede a realizar el segundo lavado con la misma relación de agua que en el primer lavado, finalmente se vuelven a separar ambas fases y esta vez el bagazo debe de exprimirse perfectamente para lograr eliminar la mayor cantidad de agua posible. Cuando el proceso ha terminado, el bagazo se extiende en una lona y se expone a radiación solar durante 72 h (Figura 2.5), para así finalmente obtener un bagazo con un porcentaje alto en cuanto a remoción de hemicelulosa y con la menor cantidad de humedad presente (base seca).



Figura 2.5 BSD pre hidrolizado con H_2SO_4 expuesto a secado solar

De esta manera es posible continuar con el tratamiento ácido hasta finalizar los 30 Kg de BSD necesarios, recordando que es de vital importancia cuantificar la totalidad de la fase líquida (prehidrolizado ácido) recuperada, medir los °Brix de dicha solución, y pesar el bagazo obtenido al final del pretratamiento.

2.7 Pretratamiento alcalino a nivel planta piloto

El procedimiento comienza vertiendo los 2 Kg de BSD pretratados obtenidos de la sección 2.6 dentro de la marmita, posteriormente se agrega el H₂O₂ al 4 %, preparado de acuerdo a la cantidad y humedad del material (la cantidad de agua presente en el material es equivalente a la cantidad de agua que se debe de descontar en el momento de preparar la solución para la reacción, representando un ahorro considerable en el agua de proceso, disminuyendo los efluentes líquidos finales), en una RLS 16:1.

La mezcla se agita para homogenizar y lograr un mejor contacto entre el BSD y la fase líquida, dejando reposar durante 10 min para que todo el BSD pueda humedecerse perfectamente bien. Transcurrido este tiempo, se procede a ajustar el pH de la reacción a 11.5 de acuerdo a lo reportado por Nochebuena-Morando (2012), el ajuste se realiza con NaOH 10 M. Las mediciones de los cambios de pH se realizaron por medio de un potenciómetro marca Thermo scientific modelo A211. Una vez que la mezcla ha alcanzado el pH óptimo, se debe de dejar llevar a cabo la reacción por un tiempo estimado de 45 h con una agitación ocasional de 5 min por cada hora durante el día y un reposo completo durante la noche.

Al finalizar las 45 h, es necesario separar la fase sólida de la líquida, empleando mallas o tamices que faciliten el filtrado de la mezcla pues al tratarse de cantidades grandes y del alto nivel de degradado del bagazo, este proceso suele ser tardío. Durante este procedimiento no existe el prensado de la fase sólida, pues únicamente se exprime con las manos. Una vez obtenida toda la celulosa, es necesario exponer

a secado solar durante 48 h, con la finalidad de eliminar la máxima cantidad de agua posible en el material tal como se muestra en la Figura 2.6.



Figura 2.6 Celulosa expuesta a secado mediante radiación solar

La primera fase líquida recuperada tiene un pH relativamente alto y es por este motivo que todo este líquido se debe de almacenar en garrafones, para ser utilizados posteriormente ya que en la planta piloto para producción de bioetanol de primera generación del Tecnológico de Veracruz cuenta con un tanque receptor de almacenamiento y tratamiento de vinazas por lo cual todo este residuo alcalino recuperado puede emplearse en el ajuste de pH de estas últimas, con ello una vez más se evita la generación de efluentes residuales aprovechando al máximo cada uno de los productos y los residuos generados durante el proceso.

Es importante mencionar que la marmita empleada para el proceso alcalino es capaz de almacenar hasta 4 Kg de material incluyendo la fase líquida utilizada, sin embargo el ajuste de pH (NaOH con el H_2O_2) produce una reacción exotérmica, lo que incrementa el volumen hasta el doble del original (ver Figura 2.7), por esta razón el equipo destinado para este proceso se debe de utilizar únicamente al 50 % de su

capacidad manteniendo espacio libre para la espuma originada durante la estabilización de la reacción.



Figura 2.7 Incremento de volumen durante la reacción alcalina

2.8 Hidrólisis enzimática a nivel planta piloto

Una vez obtenida la celulosa, se le determinó su humedad mediante una termobalanza y se procedió a realizar la hidrólisis enzimática empleando la enzima Celulasa Cellic CTe3 de Novozymes.

Para la preparación de dicha hidrólisis es necesario contar con la fase líquida la cual consta de acetato de sodio 0.05 M, la cantidad de esta solución será definida en base al valor óptimo en cuanto a RLS obtenido mediante el diseño Box Behnken en base seca presentado en la Tabla 2.2, valor proporcionado mediante el software NCSS.

De acuerdo a las condiciones de trabajo, la preparación de la mezcla inicial fue de 4.32 Kg de celulosa con una humedad del 7.5 %, obteniendo como resultado neto 4.0 Kg de celulosa seca, la fase líquida empleada fue de 20 L de CH_3COONa 0.05 M

siguiendo la RLS de 5:1, mientras que la cantidad de celulosa agregada fue de 166.66 mL tomando como referencia la densidad de la Cellic CTec3 (1.2 g/mL). La reacción debe realizarse a un pH de 5.0, para lo cual se utiliza NaOH 10 M en caso de que se encuentre un pH demasiado ácido o ácido acético glacial para un pH muy alcalino, una vez establecido el pH la reacción se deja llevar a cabo durante 51 horas.

2.8.1 Inactivación de la enzima

Al finalizar el tiempo de reacción, es necesario inactivar la enzima, el proceso provoca un choque térmico en la reacción presente. Para ello es necesario detener la agitación y la temperatura proporcionada al tanque, vaciar el contenido de la mezcla en un recipiente adecuado y someterla a baño maría con agua corriente a una temperatura de entre 95 y 100 °C durante 10 min, transcurrido este tiempo realizar un baño de hielo durante 10 min. Lo anterior detendrá la actividad enzimática obteniéndose una mezcla compuesta de los azúcares y celulosa que no se degrada durante el proceso conformado de celulosa cristalina y celulosa amorfa siendo esta última de un aspecto altamente viscoso.

Una vez inactivada la enzima, es posible proceder a la separación de ambas fases, a la totalidad de la fase líquida se le cuantifican los °Brix, mediante el uso de un refractómetro. Los °Brix proporcionan un indicio aproximado de los g/L de glucosa a determinar en el HPLC, siendo 1 °Brix equivalente a 10 g/L de glucosa. El líquido obtenido aun contiene trazas de celulosa diluidas, que es necesario removerlas completamente mediante un proceso de filtración para finalmente separar ambas fases. El líquido total obtenido será de aproximadamente 20 L, el cual debe ser almacenado en congelación para una mejor conservación de los azúcares y un posterior análisis mediante HPLC cuantificando los g/L de glucosa obtenidos.

2.9 Tratamiento utilizando dos enzimas diferentes (base seca)

Durante toda la primera fase de la experimentación, se emplearon dos pretratamientos para remover la hemicelulosa y la lignina, utilizando finalmente la enzima Cellic CTec3 para degradar la celulosa obtenida del BSD.

En esta segunda fase, se estudió el comportamiento de dos enzimas diferentes utilizadas simultáneamente, siendo una celulasa (Cellic CTec3) y una hemicelulasa (Cellic HTec3) las enzimas estudiadas. Para ello se requiere que el BSD se encuentre deslignificado, logrando esto mediante una reacción alcalina. Para encontrar las condiciones óptimas de trabajo, se consideró 1 Kg de BSD que fue tratado con una solución de H₂O₂ al 4 % en una RLS de 16:1, ajustando el pH a 5.0 con NaOH 10 M, durante 45 h, posteriormente se separó la fase sólida de la líquida, realizándole a la primera 2 lavados con agua corriente a fin de eliminar los rastros de lignina que aun pudiera contener, el material se expuso inmediatamente a un periodo de secado durante 48 h mediante radiación solar, finalizando la etapa de deslignificación con la determinación de humedad mediante la termobalanza.

2.9.1 Relación a utilizar de celulasa y hemicelulasa

A partir de los fundamentos teóricos encontrados, en el BSD la cantidad de hemicelulosa presente es menor que la celulosa, lo cual indica que la cantidad de enzimas a emplear es diferente. Para encontrar un parámetro óptimo entre el porcentaje de ambas enzimas a considerar se realizaron 3 diferentes combinaciones en relación peso/peso con la finalidad de usar el menor contenido enzimático obteniendo un buen desdoblamiento de azúcares.

La preparación de las 3 muestras (con réplica) se realizó en una RLS de 5:1, utilizando como fase líquida 100 mL acetato de sodio 0.05 M en 20 g de material deslignificado, el pH se ajustó a 5.0 utilizando ácido acético glacial debido a que el material proviene de una reacción alcalina y por ello trae consigo un pH entre 9.5 y

10, a continuación es necesario adicionar ambas enzimas de acuerdo a las cantidades mostradas en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Preparación de muestras con diferentes cantidades de enzima

Matraz	Bagazo deslignificado (g)	% de hemicelulasa	% de celulasa	Cellic HTec3 (mL)	Cellic CTec3 (mL)
1	20	3	5	0.5	0.833
2	20	4	5	0.666	0.833
3	20	5	6	0.833	1.000

Una vez que a las muestras se les ha agregado la enzima correspondiente, se llevaron los matraces a incubación durante 48 h, manteniéndolos a una temperatura de 50 °C y 250 rpm, transcurrido ese tiempo, se retiraron los matraces de la incubadora, inactivándose la enzima, mediante el proceso de los 10 min a baño maría en agua hirviendo y 10 min en baño de hielo para finalmente medir los °Brix, separar la fase líquida de la sólida y guardar el líquido azucarado mediante congelación para su posterior análisis mediante HPLC y un análisis posterior de resultados determinando que muestras son las que proporcionan los mejores resultados.

La muestra que arrojó los mejores resultados, se toma como punto central para el planteamiento de un diseño de experimentos Box Behnken teniendo como variables independientes: RLS, tiempo y carga enzimática en este caso de ambas enzimas, de acuerdo a lo presentado en la Tabla 2.4.

Para cada experimento, es necesario realizar el proceso de inactivación de la enzima y la obtención de una muestra líquida para su posterior análisis mediante HPLC, dichos resultados (g/L de glucosa y xilosa) son la variable de respuesta la cual al ser

analizada estadísticamente mediante el software NCSS proporcionará los valores óptimos en cuanto a tiempo, RLS y carga enzimática.

Tabla 2.4 Diseño de experimentos Box Behnken utilizando dos enzimas diferentes

Experimento	VARIABLES CODIFICADAS			VARIABLES NATURALES		
	Enzima (% p/p)	Tiempo (h)	RLS	(% p/p) CTec3 : HTec3	Tiempo (h)	RLS
1	-1	-1	0	4 : 2	24	7:1
2	1	-1	0	6 : 4	24	7:1
3	-1	1	0	4 : 2	72	7:1
4	1	1	0	6 : 4	72	7:1
5	-1	0	-1	4 : 2	48	5:1
6	1	0	-1	6 : 4	48	5:1
7	-1	0	1	4 : 2	48	9:1
8	1	0	1	6 : 4	48	9:1
9	0	-1	-1	5 : 3	24	5:1
10	0	1	-1	5 : 3	72	5:1
11	0	-1	1	5 : 3	24	9:1
12	0	1	1	5 : 3	72	9:1
13	0	0	0	5 : 3	48	7:1
14	0	0	0	5 : 3	48	7:1
15	0	0	0	5 : 3	48	7:1

2.9.2 Tratamiento utilizando dos enzimas diferentes (base húmeda)

Una vez estimada la mejor combinación de ambas enzimas, es posible proceder con un tratamiento en base húmeda, llevando a cabo el mismo proceso descrito en la sección 2.9, planteando como única diferencia que no existe ningún proceso de secado y que las determinaciones de humedad son fundamentales debido a que la

cantidad de agua estimada en el bagazo durante cada etapa, será agua tomada en cuenta al momento de realizar la preparación de cada una de las fases líquidas existentes, reduciendo el uso de agua durante todo el proceso.

2.10 Fermentación

La fermentación se realizó empleando un medio de cultivo sintético de activación y un medio de preadaptación utilizando el hidrolizado enzimático de bagazo de sorgo dulce obtenido en la experimentación a nivel planta piloto y empleando como levadura la *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01.

2.10.1 Medio de preparación y preadaptación

Los medios se prepararon en matraces Erlenmeyer de 250 mL cada uno de acuerdo a las concentraciones establecidas en la Tabla 2.5, y esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min, de igual manera se esterilizaron dos muestras de 300 mL de hidrolizado enzimático para ser utilizados posteriormente en el desarrollo de la fermentación. En el medio de preadaptación, no es necesario adicionar glucosa tal como se hace en el medio de preparación, en base a que el microorganismo obtiene su fuente de alimentación a partir de la glucosa contenida en el hidrolizado enzimático.

Tabla 2.5 Componentes para el medio de activación y preparación en la fermentación del hidrolizado enzimático a partir de bagazo de sorgo dulce

Clasificación	Medio de activación		Medio de preparación	
	Componente	g/L	Componente	g/L
F. Alimentación	Glucosa	20		
Nutrientes	KH ₂ PO ₄	5	KH ₂ PO ₄	5
	[NH ₄] ₂ SO ₄	2	[NH ₄] ₂ SO ₄	2
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4
Microorganismo	Extracto de Levadura	1	Extracto de Levadura	1

2.10.2 Condiciones de precultivo y preinóculo

Para activar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01, se tomaron 3 asadas de la caja Petri en la cual la levadura se encuentra sembrada y se incubaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio sintético con un pH de 5.5 durante 12 h, 250 rpm y 30 °C. Transcurrido este tiempo, se inocularon 3×10^6 células viables/mL al medio del preinóculo de hidrolizado enzimático de BSD enriquecido con nutrientes de acuerdo a las relaciones presentadas en la Tabla 2.5, a un pH de 5.5 en incubándolo durante 12 h, 250 rpm y 30 °C.

2.10.3 Medio de fermentación

Los matraces destinados para las cinéticas fueron inoculados con 3×10^6 células viables/mL en 300 mL de hidrolizado enzimático de bagazo de sorgo dulce muestreando cada hora durante las primeras 8 h y posteriormente cada 2 h hasta alcanzar un tiempo de fermentación de 14 horas con la finalidad de observar la producción de etanol a lo largo del tiempo.

Durante el seguimiento de la fermentación, se realizó un conteo celular mediante el empleo de la cámara de Thoma. Las muestras fueron diluidas de tal manera que el número de células viables/mL durante la cuenta en la cámara se encuentre en un rango entre 30 y 300 células. Cada conteo se realizó a partir de 5 cuadros grandes (0.25 mm), sabiendo que el volumen de cada cuadro es de 4×10^6 mL.

El conteo de células viables de levadura es llevado a cabo mediante un conteo al microscopio de una suspensión celular previa tinción con azul de metileno en una preparación 1:1, después de 10 min de reposo. Determinando como células vivas a aquellas que no presentaron color mientras que las células muertas se tiñen de un color azul tal como se aprecia en la Figura 2.8.

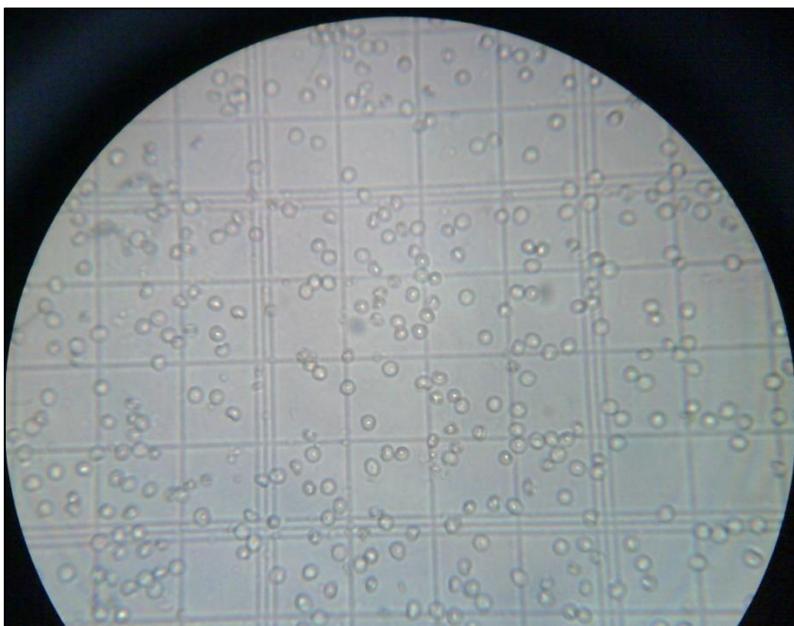


Figura 2.8 Conteo celular observado al microscopio

El teñido azul puede atribuirse a dos razones: 1) la membrana de las células muertas se debilita, permitiendo que el azul de metileno penetre en la célula, a diferencia de las células vivas, las cuales conservan la permeabilidad de su membrana; 2) siendo el azul de metileno un colorante oxido-reducción, sea reducido por una hidrogenasa y este se vuelva incoloro (forma reducido) si la célula está viva (Gutiérrez, 2011).

La solución de azul de metileno es preparada con 1 g de azul de metileno disuelto en 1 L de solución de tricitrato de sodio trihidratado al 2 % (p/v), filtrado por una membrana de nitrocelulosa (0.22 μm) marca Millipore. La solución debe conservarse en refrigeración en ausencia de luz. Durante cada toma de muestra, se tomaron lecturas de pH, con el objetivo de revisar la estabilidad del fermentado, centrifugando durante 10 min muestras de aproximadamente 1 mL las cuales fueron almacenadas en congelación para su posterior análisis mediante HPLC.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan los resultados que abarcan desde la obtención de las condiciones óptimas de trabajo a nivel laboratorio, el escalamiento de los pretratamientos, su posterior hidrólisis enzimática a nivel planta piloto y finalmente los resultados de la fermentación del hidrolizado enzimático obtenido. El pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, tiene como principal objetivo remover la mayor cantidad de hemicelulosa presente en el BSD obteniendo como subproducto una corriente líquida con un alto contenido de xilosa. Así también se presentan los resultados de la búsqueda de puntos óptimos en la hidrólisis enzimática utilizando dos enzimas durante el proceso (celulasa y hemicelulasa), y las diferencias en cuanto a tratamientos que esto conlleva, para finalmente analizar el comportamiento de la hidrólisis enzimática a nivel planta piloto mediante el uso de una celulasa como enzima degradadora (Cellic CTec3) obteniendo la mayor cantidad de glucosa (g/L) realizando un análisis estadístico con el fin de correlacionarlas y observar el comportamiento del proceso.

3.1 Obtención y caracterización del BSD

De la cantidad inicial tratada (800 Kg) de caña de sorgo, se obtuvieron 320 Kg de bagazo húmedo, dicha cantidad de materia prima se redujo a 121.60 Kg después de 72 h de secado solar eliminándose aproximadamente un 62 % de humedad. La humedad final determinada en el BSD seco (13 %) se encuentra por encima del 10 %, por lo cual se decidió someter a un proceso de secado en estufa a 60 °C por 24 h para remover la mayor cantidad de agua contenida y garantizar su conservación y poca influencia en los procesos posteriores, así como la inhibición de posibles microorganismos.

La caracterización lignocelulósica se realizó empleando el método de ANKOM. El contenido de fibra del BSD se muestra a partir de la Figura 3.1, en la cual es posible apreciar que la fracción mayor corresponde a la celulosa con un 39.54 % del total.

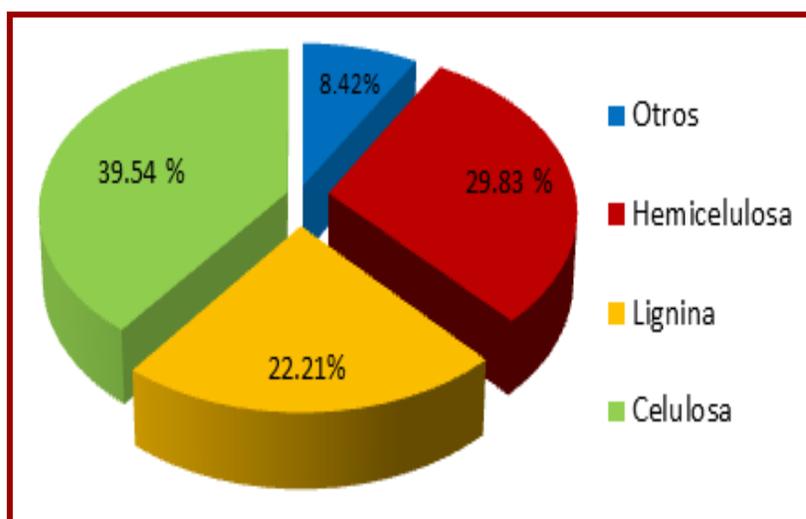


Figura 3.1 Contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce crudo (RB cañero)

La cantidad de fibra determinada presenta una composición similar a las obtenidas por otros autores (Prasad *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007) en cuanto a celulosa, hemicelulosa y lignina, además de estar dentro de los rangos establecidos por Montes *et al.*, (2010a). Por lo cual es necesario utilizar dos pretratamientos diferentes a fin de remover el mayor contenido de hemicelulosa y lignina facilitando el ataque enzimático posterior a la celulosa obtenida (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Comparación del contenido de fibra del BSD crudo

Autores	Contenido de Fibra (%)			
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Otros
Prasad <i>et al.</i>, (2007)	46	27	20	3 – 5
Kim <i>et al.</i>, (2007)	44.8	25.9	20.1	9.2
Montes <i>et al.</i>, (2010a)	35 – 50	15 – 25	20 – 30	-----
Presente Trabajo	39.54	29.83	22.21	8.42

3.2 Optimización de la hidrólisis enzimática a nivel laboratorio (Base seca)

En esta etapa se empleará la enzima celulasa (Cellic CTec3) de Novozymes posterior a la remoción de hemicelulosa y lignina.

3.2.1 Hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce

La fracción líquida (pre hidrolizado ácido), presentó una conversión de xilosa de 47.173 g/L, la cual es superior en un 58 % a la obtenida por Chen *et al.*, (2010) y en un 19 % a la reportada por Viveros *et al.*, (2014) de 29.84 y 39.59 g/L respectivamente, además de reportar presencia de 4.96 g/L de ácido acético y 0.60 g/L de furfural, lo cual demuestra que hubo degradación de azúcares, sin embargo, no superan el contenido máximo de inhibidores 6 y 1 g/L respectivamente para la producción de xilitol (Rangel *et al.*, 2009).

La formación de ácido acético es una consecuencia de la desacetilación de las cadenas laterales de la hemicelulosa por efecto de la hidrólisis ácida, mientras que la aparición de furfural se le atribuye a la descomposición térmica de las pentosas debido a la prolongada exposición de los azúcares a temperaturas superiores a los 120 °C (Jeevan *et al.*, 2011).

3.2.2 Hidrólisis alcalina del bagazo de sorgo ácido

Empleando las condiciones indicadas en la sección 2.3.2, se obtuvo una concentración de glucosa de 15.75 g/L, lo que representa un 7.25 % más de lo obtenido por Viveros *et al.*, (2014) que fue de 11.24 g/L, indicando una remoción del 88 % de lignina que facilitará el acceso de las enzimas al sustrato.

3.2.3 Condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática

El objetivo principal de la hidrólisis enzimática es desdoblar la mayor parte de la celulosa tratada obteniendo índices altos de glucosa, que es un azúcar que puede ser fermentada para posteriormente obtener etanol. Los resultados obtenidos de este estudio se presentan en la Tabla 3.2. La celulosa desdoblada es generada a partir

del bagazo de sorgo dulce pretratado, después de la remoción de la hemicelulosa y la lignina.

Tabla 3.2 Resultados obtenidos a partir del primer diseño experimental para la obtención de glucosa considerando la carga enzimática, tiempo y masa de celulosa

Muestra	VARIABLES NATURALES			RESULTADOS
	Celulosa (g)	Enzima (mL)	Tiempo (h)	Glucosa (HPLC g/L)
1	14.29	0.44	24	63.77
2	14.29	0.66	24	71.94
3	14.29	0.44	72	86.36
4	14.29	0.66	72	71.81
5	20	0.62	48	95.11
6	20	0.95	48	99.60
7	11.11	0.34	48	62.13
8	11.11	0.51	48	63.86
9	20	0.77	24	88.50
10	20	0.77	72	88.46
11	11.11	0.43	24	55.42
12	11.11	0.43	72	67.45
13	14.29	0.55	48	77.04
14	14.29	0.55	48	78.24
15	14.29	0.55	48	75.49

Se puede observar que las conversiones de glucosa oscilaron en un rango de 55.42 a 99.60 g/L, lo cual significa un incremento del 79.71 % comparado a los resultados obtenidos por Nochebuena-Morando, (2012) a partir de bagazo de caña que fueron de 55.42 g/L. Siendo las pruebas 5 y 6 con las que se obtuvo la mayor conversión 95.11 y 99.60 g/L respectivamente ambas con un tiempo de reacción de 48 h.

3.2.4 Análisis de regresión en función de la carga enzimática, tiempo y masa de celulosa

Empleando el software estadístico NCSS, se realizó un análisis de regresión, con el fin de generar un polinomio que represente el mejor comportamiento del proceso.

Para dicho modelo se considera en variables naturales la carga enzimática en relación p/p (CE), tiempo (t) y masa de celulosa (MC), y como variable de respuesta la producción de glucosa (g/L). El modelo presentado en la ecuación 3.1 presenta un ajuste del 95.05 % garantizando la reproducibilidad del proceso.

$$\begin{aligned} \text{Glucosa (g/L)} = & -28.3414 - 26.1480 * \text{CE} + 2.2764 * t + 12.1709 * \text{MC} + 3.3816 * \text{CE}^2 \\ & - 0.011864 * t^2 - 0.3316 * \text{MC}^2 - 0.2336 * \text{CE} * t + 0.2646 * \text{CE} * \\ & \text{MC} + 0.0087304 * t * \text{MC} \end{aligned} \quad (3.1)$$

La Figura 3.2 muestra la gráfica de residuos para el modelo obtenido (Base seca).

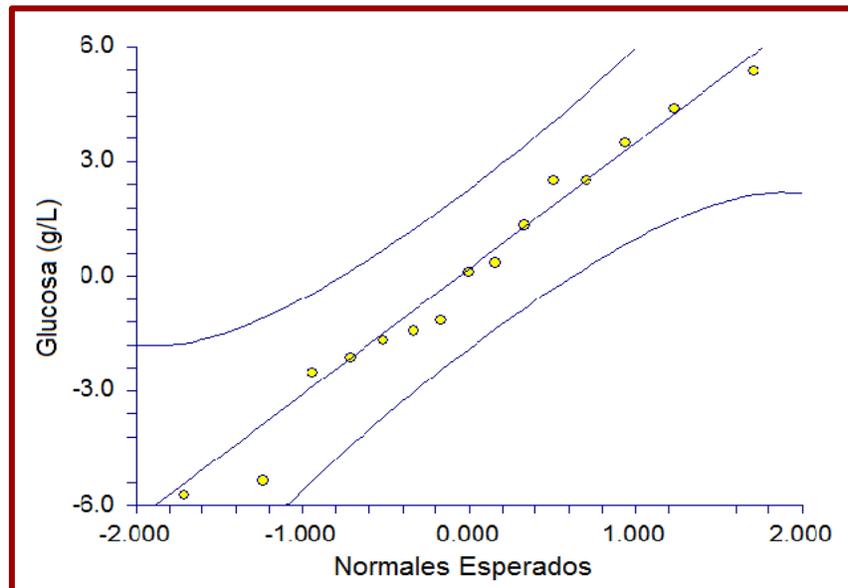


Figura 3.2 Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 1 (Ec. 3.1)

Se puede observar que todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos aleatoriamente con una ligera dispersión del 4.95 % de los datos, los cuales no ajustan uniformemente sobre la línea recta la cual representa el modelo propuesto. Por lo tanto las diferencias entre los valores de la variable dependiente observados y los valores predichos a partir de la recta de regresión aplica para el 95.05 % de los datos experimentales.

El análisis de varianza sobre la producción de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática del BSD empleando una celulasa, aplicando el estadístico de prueba de distribución “F” y utilizando un nivel de significancia del 1%, se muestra en la Tabla 3.3. Este análisis indica que los tres factores involucrados como lo son el tiempo (t), la carga enzimática (CE) y masa de celulosa (MC) resultan ser significativos, es decir, son valores que pueden garantizar la reproducibilidad de un proceso.

Tabla 3.3 Análisis de Varianza (ANOVA) del diseño de experimentos Box-Behnken para la hidrólisis enzimática del BSD

Parámetro	Coefficiente de regresión	Error estándar	T- Radio	Nivel de probabilidad
Intercepción	-28.3414			
Enzima	26.1480	30.7488	-0.85	0.43
Tiempo	2.2764	0.8439	2.70	0.04
Celulosa	12.1709	6.5440	1.86	0.12
Enzima²	3.3816	2.8779	1.18	0.29
Tiempo²	-1.1864E-02	4.9964E-03	-2.37	0.06
Celulosa²	-0.3316	0.1866	-1.78	0.13
Enzima*Tiempo	-0.2366	0.1152	-2.05	0.09
Enzima*Celulosa	0.2646	0.6557	0.40	0.70
Tiempo*Celulosa	8.7304E-03	2.7322E-02	0.32	0.76

3.2.5 Establecimiento de las mejores condiciones para la producción de glucosa a partir del bagazo de sorgo dulce

A partir del modelo de segundo orden obtenido, se genera una gráfica de contornos, la cual es una proyección de una superficie tridimensional sobre un plano bidimensional. Los valores de la superficie ajustada en términos de la variable z son graficados en forma de regiones o patrones cuya coloración varía a través del plano x - y conforme se maximiza o minimiza la variable dependiente. A través de la gráfica de contornos se permite localizar la zona donde se encuentra el punto estacionario que puede ser un punto de respuesta máxima, mínima o punto de silla.

Mediante las gráficas de contornos se presentan las diferentes combinaciones de los efectos, respecto a la variable de respuesta que es la concentración de glucosa en g/L. Se puede apreciar que aunque existen regiones donde los contornos se cierran, estos no están delimitados por valores altos para la cantidad de glucosa a generar, motivo por el cual los valores fueron sustituidos por una masa de celulosa de 20 g correspondiente a una RLS de 5:1, tiempo de 51 h y carga enzimática de 5 % p/p los cuales representan las condiciones óptimas de trabajo proporcionadas por el software estadístico NCSS en el modelo obtenido mediante regresión cuadrática el cual arroja un valor de 97.072 g/L de producción de glucosa, 27.66 % inferior al obtenido experimentalmente que fue de 125.208 g/L.

La Figura 3.3 (a) muestra una superficie en color rojo, la cual se encuentra delimitada por un tiempo alrededor de las 51 h y 20 g de celulosa (Bagazo pretratado) (RLS 5:1), datos que son coincidentes a los valores óptimos obtenidos, mientras que la Figura 3.3 (b) presenta un contorno cerrado en color azul con una carga enzimática del 5 % y 18.5 g de celulosa (RLS de 5.4:1) sin embargo la concentración de glucosa no es la máxima que puede llegar a alcanzarse y finalmente la Figura 3.3 (c) arroja un contorno en color verde el cual se encuentra situado entre una carga enzimática del 5 % pero con tiempo de 71 h, y una concentración de apenas 70 g/L de glucosa siendo una región descartable.

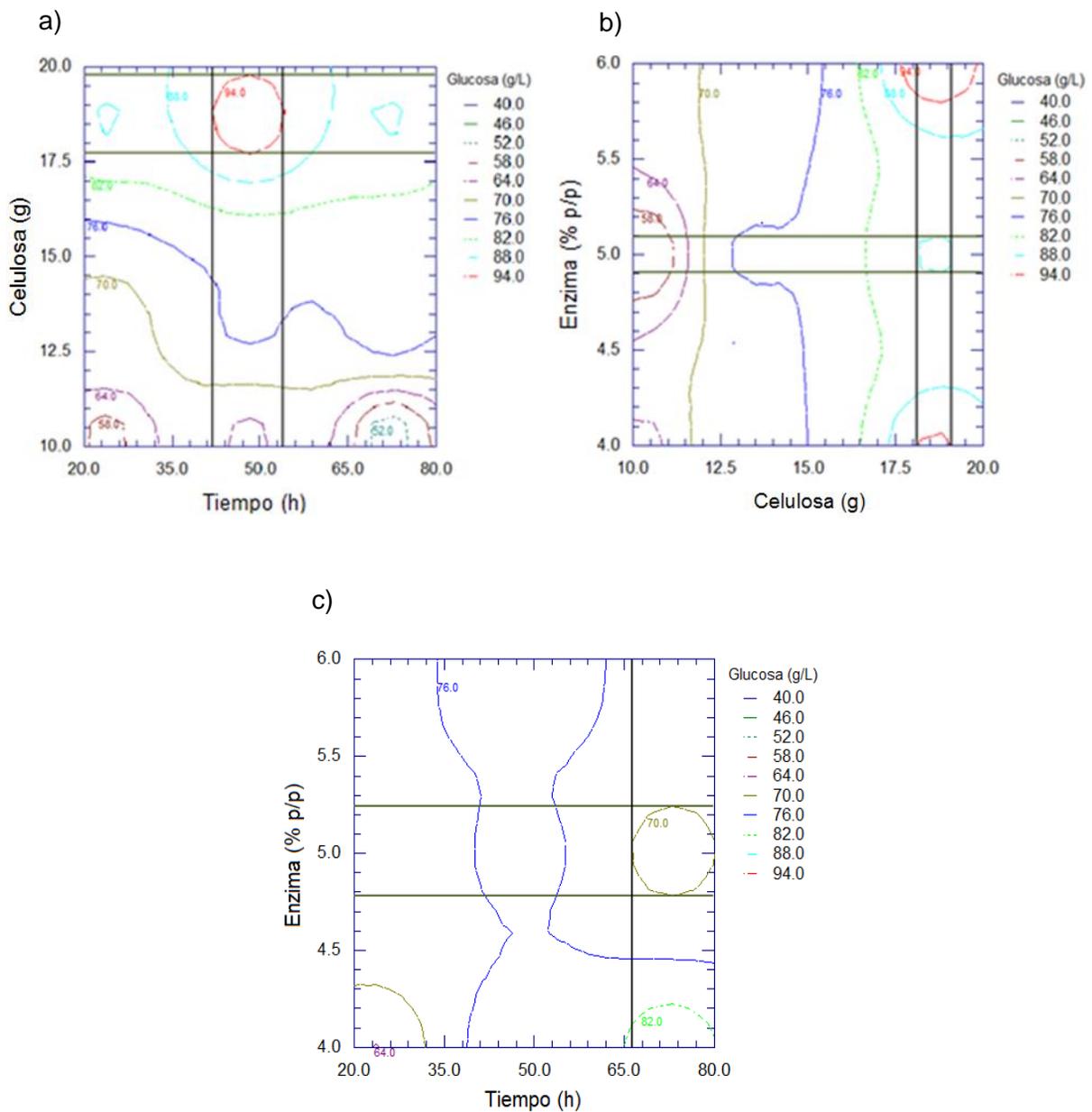


Figura 3.3 Gráfica de contornos del contenido de Glucosa en la hidrólisis enzimática del efecto de: (a) Celulosa (g) vs Tiempo (h), (b) Enzima (% p/p) vs Celulosa (g) y (c) Enzima (% p/p) vs Tiempo (h)

La Figura 3.4 representa las gráficas de superficie de respuesta con las diferentes combinaciones de los efecto, a través de los cuales se puede apreciar que la mayor conversión de glucosa se observa con 20 g de celulosa, correspondiente a una RLS

de 5:1 (5 mL/g), además de que a partir de las 50 h, ya no existe un incremento considerable de glucosa, ocurriendo lo mismo con la carga enzimática en la cual maximizar una carga del 6 % p/p incrementa aproximadamente 8.8 % de glucosa siendo insignificante si se toma en cuenta que el costo de la enzima es alto.

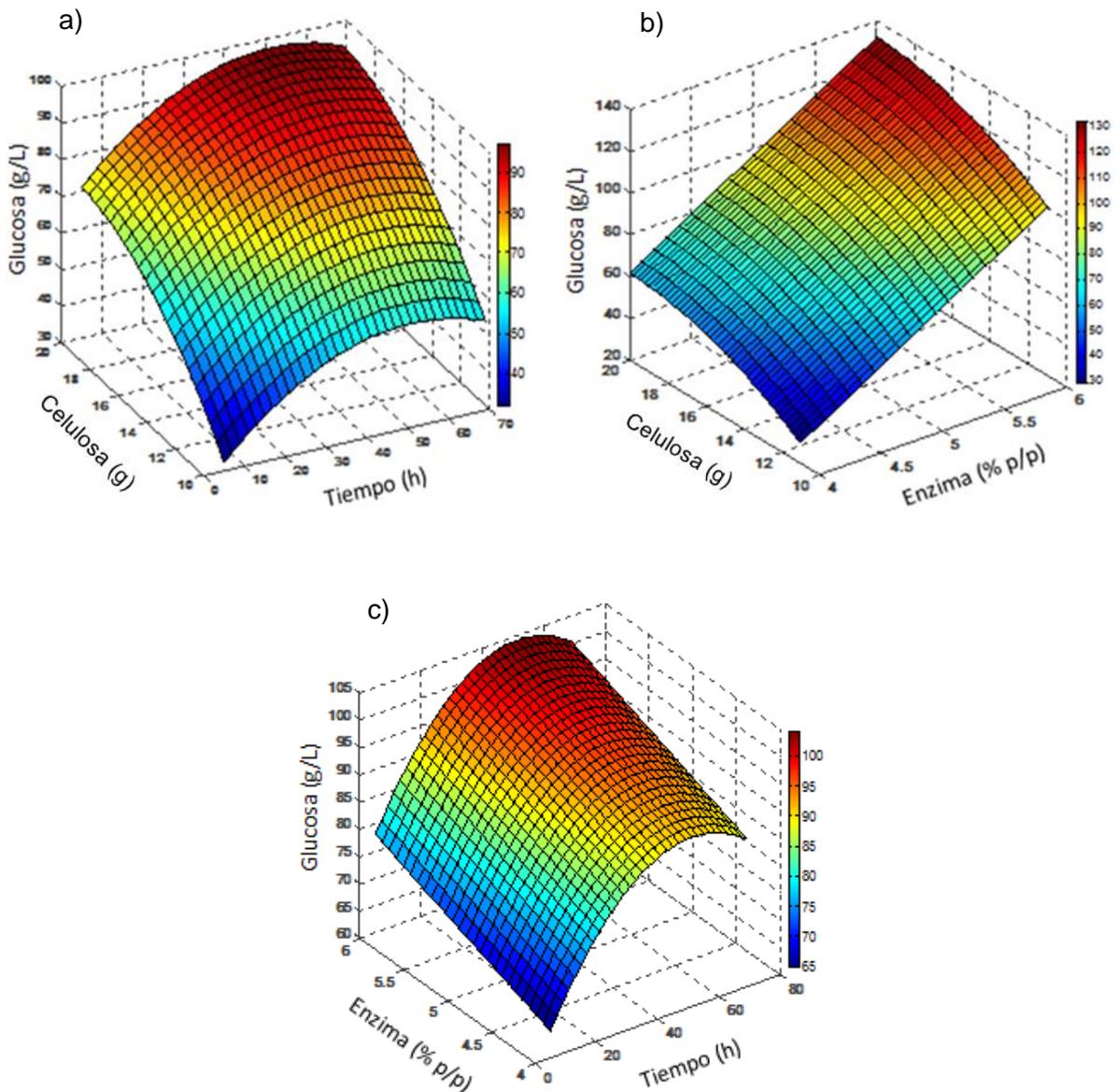


Figura 3.4 Gráficas de superficie de respuesta del contenido de glucosa en la hidrólisis enzimática: (a) Tiempo (h) vs Celulosa (g), (b) % de Enzima (p/p) vs Celulosa (g) y (c) % de Enzima (p/p) vs Tiempo (h)

Los valores óptimos (RLS 5:1, Tiempo 51 h y carga enzimática de 5 % p/p) se comprobaron de manera experimental, realizando una prueba con su respectiva replica, obteniendo concentraciones de 126.36 g/L y 124.281 g/L, con una producción final de 125.208 g/L como resultado del promedio de ambos datos, con lo que se valida el modelo matemático obtenido. Nochebuena-Morando, (2012) consiguió obtener 55.42 g/L de glucosa mediante la optimización de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar utilizando una celulasa y una β -glucosidasa, el presente trabajo comprueba la eficiencia de la enzima empleada en el proceso enzimático que fue la celulasa “Cellic CTec3” de Novozymes al obtener concentraciones elevadas de glucosa.

Los diferentes pretratamientos químicos secuenciales a los que fue sometido el BSD, (ácido y alcalino) así como el análisis estadístico de la etapa enzimática, permite definir los mejores parámetros de operación para la producción de glucosa de BSD, logrando así obtener una concentración final de 125.208 g/L a las 51 h de hidrólisis. En la Tabla 3.4 se resumen las condiciones de operación de las etapas a fin de producir la concentración de glucosa generada en este trabajo.

Tabla 3.4 Condiciones óptimas de producción de glucosa a partir de BSD

Hidrólisis	Reactivo	RLS (mL/g)	Temperatura (°C)	Tiempo
Ácida	H ₂ SO ₄ al 1.5 %	5:1	125	33 min
Alcalina	H ₂ O ₂ al 4 %	16:1	Ambiente	45 h
Enzimática	Enzima 5 % p/p	5:1	50	51 h

3.2.6 Optimización de la respuesta de la hidrólisis enzimática en base seca

Aplicando todo el procedimiento establecido en la sección 2.3.5 a la ecuación 3.1 (modelo matemático establecido), se generan las siguientes matrices para el cálculo del punto estacionario.

$$b = \begin{bmatrix} -26.1480 \\ 2.2764 \\ 12.1709 \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} 3.3816 & -0.1183 & 0.1323 \\ -0.1183 & 0.01186 & 0.004365 \\ 0.1323 & 0.004365 & -0.3316 \end{bmatrix}$$

$$x_0 = -\frac{1}{2} \begin{bmatrix} 3.3816 & -0.1183 & 0.1323 \\ -0.1183 & 0.01186 & 0.004365 \\ 0.1323 & 0.004365 & -0.3316 \end{bmatrix}^{-1} * \begin{bmatrix} -26.1480 \\ 2.2764 \\ 12.1709 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 4.9447 \\ 51.3577 \\ 20.0401 \end{bmatrix}$$

Calculando la respuesta predicha se obtiene lo siguiente:

$$y = -28.3414 + \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 4.9447 \\ 51.3577 \\ 20.0401 \end{bmatrix}^T * \begin{bmatrix} -26.1480 \\ 2.2764 \\ 12.1709 \end{bmatrix} = 96.92 \approx 97 \text{ g/L}$$

“ x_0 ” representa los puntos óptimos determinados mediante el NCSS en cuanto a % de enzima, tiempo y masa de celulosa (5, 51 Y 20 respectivamente), en tanto “ y ” corresponde a la respuesta teórica predicha a partir del modelo matemático.

La identificación de las características del sistema y la ubicación del punto estacionario son muy importantes. La respuesta dependerá de los signos y las magnitudes de los coeficientes del modelo ya sea un máximo, mínimo o punto de silla y para caracterizarla se utiliza un análisis canónico a partir de la ecuación 2.4. Los valores propios λ_1 y λ_2 son raíces de la ecuación determinante.

$$|B - \lambda I| = 0$$

$$\begin{bmatrix} 3.3816 - \lambda & -0.1183 & 0.1323 \\ -0.1183 & 0.01186 - \lambda & 0.004365 \\ 0.1323 & 0.004365 & -0.3316 - \lambda \end{bmatrix} = 0$$

El cual se reduce a: $\lambda^3 - 3.0619\lambda^2 - 1.1167\lambda + 0.0091$

Las raíces de esta ecuación cubica son $\lambda_1 = -0.3365$, $\lambda_2 = 0.0079$ y $\lambda_3 = 3.3904$. Por lo tanto la forma canónica del modelo ajustado es:

$$\hat{y} = -28.3414 - 0.3365w_1^2 + 0.0079w_2^2 + 3.3904w_3^2$$

Los signos de las λ 's determinan la naturaleza de x_s , y la magnitud relativa de los eigenvalores los cuales ayudan a comprender mejor la respuesta del sistema.

- ✚ Si los valores de $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ son todos negativos, el punto estacionario es una respuesta máxima.
- ✚ Si los valores de $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ son todos positivos, el punto estacionario es una respuesta mínima
- ✚ Si los valores de $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ tienen signos mixtos, el punto estacionario es una silla o ensilladura.

En este estudio existe un punto de silla lo que significa que se deberá seguir explorando dentro de la región para poder encontrar un máximo.

3.3 Optimización de la hidrólisis enzimática en base húmeda (nivel laboratorio)

Aplicando la metodología propuesta en la sección 2.3 se obtuvo un hidrolizado ácido con una concentración de 46.290 g/L de xilosa, 3.88 g/L de ácido acético y 0.568 g/L de furfural, haciéndolo ideal para una posterior fermentación pues los índices de estos dos últimos no rebasan los límites permisibles de inhibidores para la producción de xilitol (6 y 1 g/L respectivamente).

Una vez terminada la hidrólisis ácida, se procedió a determinar la humedad la cual resultó de un 76 %, dicha cantidad de agua se descontó de la preparación del H_2O_2 lo cual representa un ahorro considerable de este líquido. El hidrolizado alcalino presentó resultados de 52.33 g/L de glucosa al ser analizados en el HPLC.

3.3.1 Condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática

La diferencia principal de la hidrólisis enzimática en base húmeda es que se consideró el 73.82 % de humedad proveniente de la etapa alcalina. Los resultados obtenidos de este estudio se presentan a continuación mediante la Tabla 3.5. Los g de celulosa corresponden al BSD pretratado (ácida y alcalinamente), calculados de acuerdo a las distintas RLS propuestas en el diseño de experimentos inicial (Tabla 2.2), empleando en todas las pruebas realizadas una fase líquida de 100 mL de acetato de sodio 0.05 M.

Tabla 3.5 Resultados obtenidos a partir del segundo diseño experimental para la obtención de glucosa considerando la carga enzimática, tiempo y masa de celulosa

Muestra	VARIABLES NATURALES			RESULTADOS
	Celulosa (g)	Enzima (mL)	Tiempo (h)	Glucosa (HPLC g/L)
1	50.76	0.44	24	95.25
2	50.76	0.66	24	113.25
3	50.76	0.44	72	130.82
4	50.76	0.66	72	117.52
5	71.04	0.62	48	147.45
6	71.04	0.95	48	112.85
7	39.47	0.34	48	86.82
8	39.47	0.51	48	96.65
9	71.04	0.77	24	110.55
10	71.04	0.77	72	156.12
11	39.47	0.43	24	85.12
12	39.47	0.43	72	92.86
13	50.76	0.55	48	95.04
14	50.76	0.55	48	120.87
15	50.76	0.55	48	118.29

A partir del segundo diseño se puede observar que las conversiones de glucosa oscilaron en un rango de entre 85.12 y 156.12 g/L, lo cual representa un incremento del 53.15 % en comparación con los resultados obtenidos en base seca (55.42 a 99.60 g/L), obteniéndose las concentraciones de glucosa más altas en las muestras 5 y 10. Lo que representa una concentración de glucosa 15.6 % superior a la respuesta teórica del modelo de la hidrólisis enzimática en base seca.

Un aspecto destacable del proceso continuo fue la coloración verde que presentó el hidrolizado enzimático (Figura 3.5), color totalmente distinto al beige que presenta el hidrolizado en base seca, esto se puede atribuir a la presencia de clorofila que se conserva en la materia prima al omitir la etapa de secado, lo cual beneficia al proceso, pues de acuerdo a Pernalet *et al.*, (2008) las plantas verdes disponen de un mecanismo por medio del cual son capaces de utilizar el agua como fuente de hidrógeno, siendo benéfico para algunos microorganismos. La humedad parece facilitar la penetración de la enzima además de incrementar la actividad entre la biomasa y la fase líquida aumentando la velocidad de reacción.



Figura 3.5 Hidrolizado enzimático en base húmeda (proceso continuo)

3.3.2 Análisis de varianza de la hidrólisis enzimática en base húmeda

Aplicando el software NCSS 2007, se realizó un análisis de varianza sobre la producción de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática del BSD en base húmeda, aplicando el estadístico de prueba con distribución “F” con un nivel de significancia del 1 % el cual se muestra en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Análisis de Varianza (ANOVA) del diseño de experimentos Box-Behnken para la hidrólisis enzimática del BSD en base húmeda

Parámetro	Coefficiente de regresión	Error estándar	T- Radio	Nivel de probabilidad
Intercepción	-239.0517			
Enzima	39.4384	53.1628	0.74	0.49
Tiempo	0.5265	1.4592	0.36	0.73
*Celulosa	7.4919	2.9638	2.53	*0.05
Enzima²	1.2935	4.9757	0.26	0.80
Tiempo²	2.6298E-03	8.6384E-03	0.30	0.77
Celulosa²	-3.3396E-02	2.2133E-02	-1.51	0.19
Enzima*Tiempo	-0.3260	0.1991	1.64	0.16
Enzima*Celulosa	-0.7400	0.2968	-2.49	0.05
Tiempo*Celulosa	2.5209E-02	1.2369E-02	2.04	0.09

Este análisis indica que el único factor significativo fue la masa de celulosa (MC), mientras que la carga enzimática en % p/p (CE) y el tiempo (t) resultaron no ser tan significativas, lo cual indica que en base húmeda el grado de desdoblamiento de la celulosa para la posterior producción de glucosa es fuertemente dependiente de la RLS a emplear durante el proceso.

3.3.3 Análisis de regresión en función de la carga enzimática, tiempo y Celulosa

En base a los resultados experimentales y utilizando el software estadístico NCSS, se realizó un análisis de regresión, para determinar el modelo matemático que se

ajuste al mejor comportamiento del proceso en base húmeda. Para dicho modelo se considera en variables naturales la carga enzimática en relación p/p (CE), tiempo (t) y masa de celulosa (MC), y como variable de respuesta la producción de glucosa (g/L). El modelo presentado en la ecuación 3.2 presenta un ajuste del 92.62 % garantizando la reproducibilidad del proceso.

$$\begin{aligned} \text{Glucosa (g/L)} = & -239.0517 + 39.4384 * \text{CE} + 0.5265 * t + 7.4919 * \text{MC} + 1.2935 * \\ & \text{CE}^2 + 0.00263 * t^2 - 0.0334 * \text{MC}^2 - 0.3260 * \text{CE} * t - 0.7400 * \text{CE} * \\ & \text{MC} + 0.02521 * t * \text{MC} \end{aligned} \quad (3.2)$$

La Figura 3.6 muestra la gráfica de residuos. Se puede observar que aunque la mayoría se encuentran dentro de la normalidad y están distribuidos uniformemente, existen datos inusitados, es decir fuera de los valores normales esperados, debido probablemente a errores de tipo experimental o de tipo humano al realizar diversas lecturas, así también ligeras variaciones en el tiempo podrían conllevar a la obtención de estos valores fuera de la tendencia representada por la línea recta del modelo.

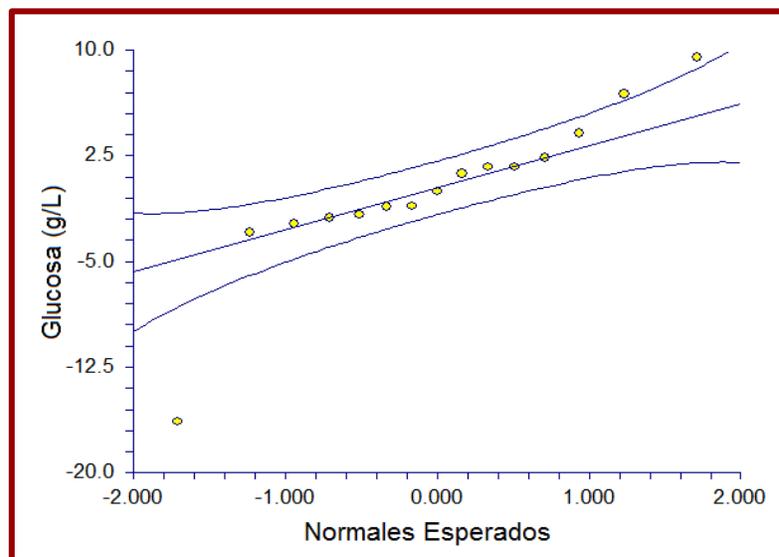


Figura 3.6 Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 2 (Ec. 3.2)

3.3.4 Análisis de contornos de la hidrólisis enzimática

En la Figura 3.7 (a) se observa una región de trabajo delimitada por un contorno de color rojo que permite obtener una concentración de glucosa superior a 150 g/L pero muestra un tiempo de reacción de 71 h lo cual supera en un 48 % al tiempo óptimo estimado por el modelo matemático en la Ecuación 3.2 (48 h).

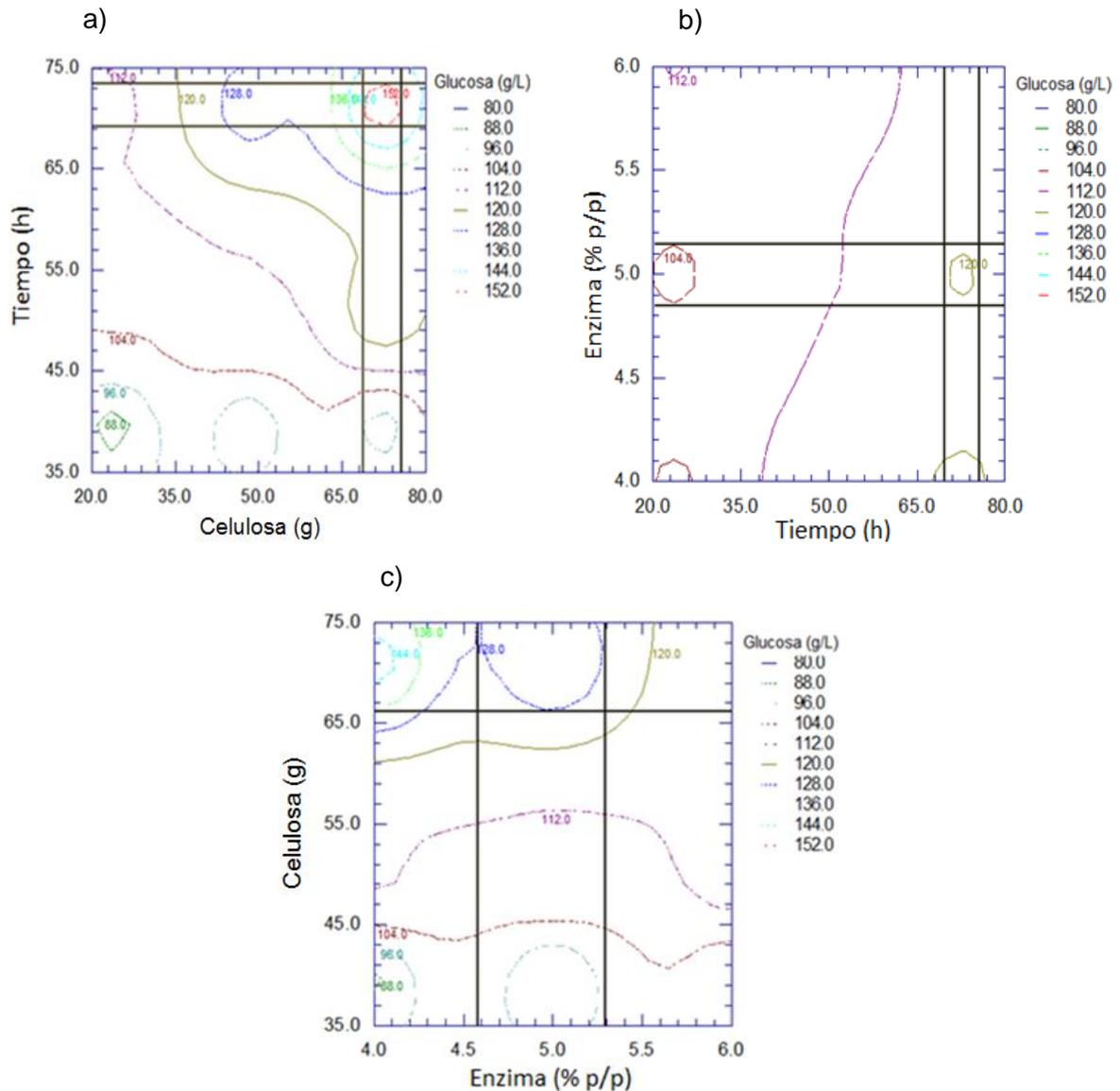


Figura 3.7 Gráfica de contornos del contenido de Glucosa en la hidrólisis enzimática del efecto de: (a) Celulosa (g) vs Tiempo (h), (b) Enzima (% p/p) vs Tiempo (h) y (c) Celulosa (g) vs Enzima (% p/p)

En tanto que en la Figura 3.7 (b) se muestra un contorno delimitado por un 5 % de enzima y una conversión de 120 g/L de glucosa pero con el mismo tiempo de reacción de 71 h, finalmente en la Figura 3.7 (c) no se logra cerrar un contorno como tal, aunque si se visualiza una región marcada en color azul con una conversión de 128 g/L de glucosa en rangos de 5 % p/p de enzima y 63-75 g de celulosa correspondiente a una RLS de 5.3:1 aproximadamente.

3.3.5 Superficie de respuesta de la hidrólisis enzimática

La Figura 3.8 muestra las superficies de respuesta, las cuales indican que el tiempo óptimo de reacción (48 h), existe una conversión de aproximadamente 120 g/L de glucosa, dicha conversión puede incrementarse en un 33 % (160 g/L) pero representaría un aumento del 66.6 % de tiempo equivalente a 32 h lo cual incrementaría el tiempo de reacción hasta 80 h, representando un gasto enorme de energía durante el desarrollo de la reacción. Lo mismo ocurre con la carga enzimática pues a partir de la Figura 3.8 (b) se observa claramente que entre un 5 % y un 6 % de enzima existe una diferencia de conversión de 130 a 140 g/L de glucosa lo que significa un incremento del 7.8 % valor que no es significativo si se considera el costo de la enzima y lo complejo de su obtención. La tercera superficie de respuesta correspondiente a la Figura 3.8 (c) presenta una conversión de 130 g/L de glucosa con un 5 % de enzima y un tiempo de 48 h, la cual puede incrementarse hasta en un 30.76 % (170 g/L) sin embargo esto implicaría usar una carga enzimática del 6 % p/p e incrementar en un 50 % el tiempo de reacción (72 h).

3.3.6 Optimización de la respuesta de la hidrólisis enzimática en base húmeda

El análisis de optimización mediante el NCSS determinó un máximo de conversión de glucosa de 130 g/L para las siguientes condiciones óptimas: carga enzimática de 5 % p/p, tiempo de 48 h y masa de celulosa de 74.48 g, al considerar la humedad de la celulosa la cual fue del 73 %, la cantidad real de material óptimo es de 20.10 g de bagazo en un medio líquido de 100 mL lo cual representa una RLS de 5:1 como el caso de la experimentación en base seca.

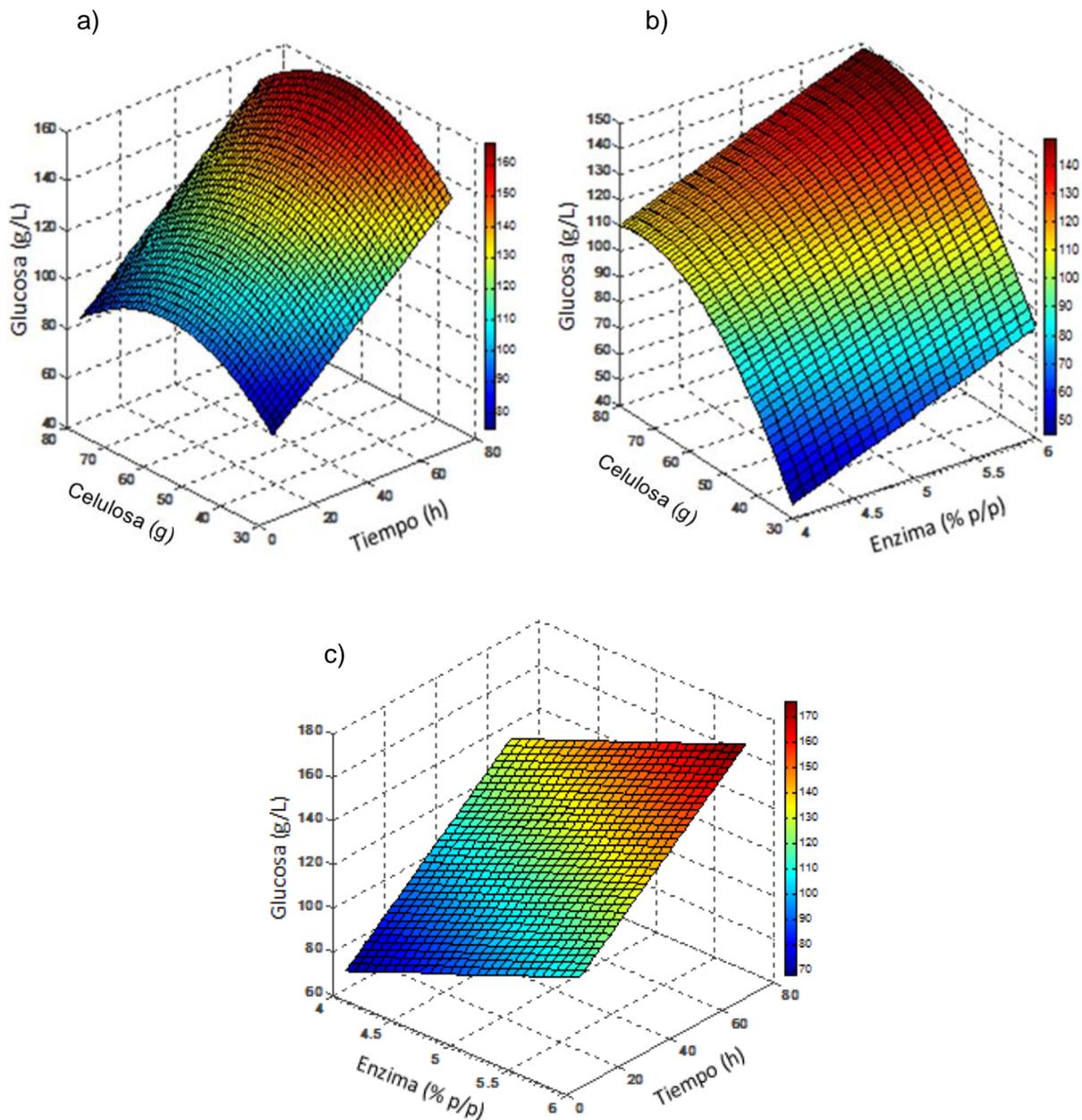


Figura 3.8 Gráficas de superficie de respuesta del contenido de glucosa en la hidrólisis enzimática en modo continuo: (a) Tiempo (h) vs Celulosa (g), (b) % de Enzima (p/p) vs Celulosa (g) y (c) % de Enzima (p/p) vs Tiempo (h)

Las condiciones de trabajo óptimas para la hidrólisis enzimática en base húmeda determinadas por el NCSS fueron comprobadas mediante experimentación,

realizando una prueba con su respectiva replica obteniendo valores de glucosa de 147.26 g/L y 150.03 g/L respectivamente, obteniendo un valor total promedio de 148.64 g/L lo cual representa un 18.71 % más de glucosa con respecto al resultado obtenido en base seca (125.50 g/L), además de la disminución del 6 % en el tiempo de reacción (3 h) dicho resultado puede atribuírsele a la presencia de agua dentro de la materia prima lo cual beneficia la actividad enzimática y su consiguiente penetración de la fase líquida dentro de la celulosa.

En ambos procesos es posible comprobar que los tiempos prolongados de reacción en la etapa enzimática son innecesarios, tal cual se muestra en la Figura 3.9, en donde se pueden observar las diversas concentraciones de glucosa obtenidas a diferentes tiempos, mostrando que entre las 52 h y las 92 h del proceso únicamente existe un incremento del 13.5 % de glucosa, pero esto conllevaría a incrementar en un 77 % más el tiempo de reacción (40 h más).

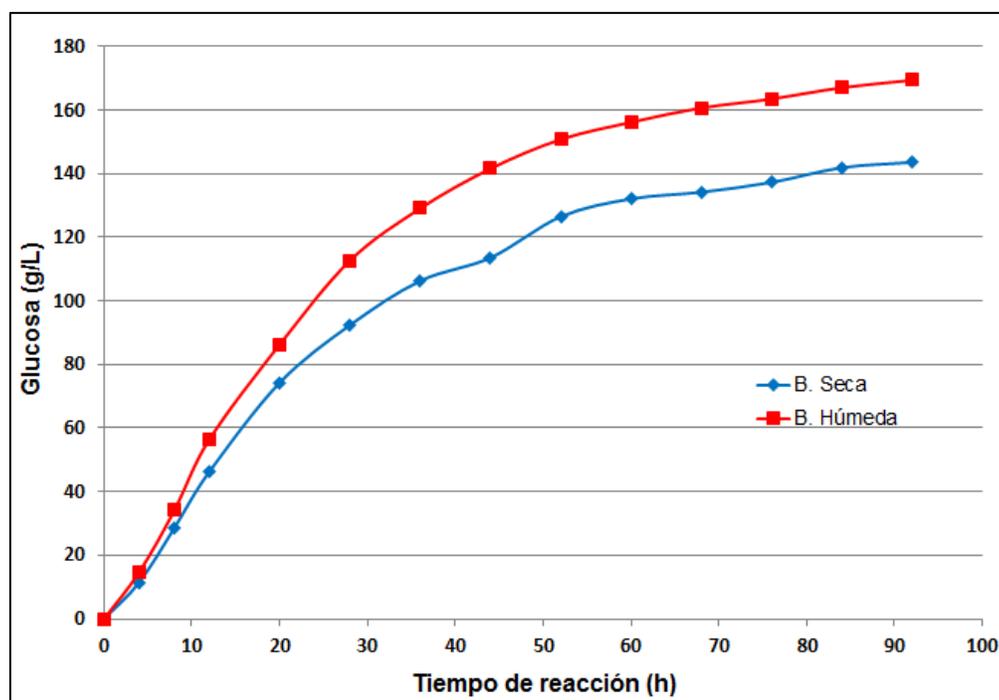


Figura 3.9 Cinéticas de la hidrólisis enzimática del BSD a distintos tiempos de reacción durante 92 horas en base húmeda y base seca

Como se puede observar el proceso enzimático del BSD tiene una mejor eficiencia cuando se realiza en base húmeda, o en modo continuo, sin embargo se declina por llevarlo a cabo en base seca debido a la falta de espacios para el almacenamiento de la materia prima la cual es susceptible a la descomposición por el ataque de microorganismos los cuales proliferan en presencia de humedad y pueden causar la putrefacción del bagazo, caso contrario al proceso en base seca el cual alarga la vida útil de la materia prima sin representar una disminución drástica en la producción de glucosa y mucho menos un aumento en el tiempo de reacción del proceso.

Debido a la gran cantidad de materia prima que se necesita para trabajar a nivel planta piloto y al poco espacio de almacenamiento, el presente trabajo tiene como objetivo original el llevar a cabo el escalamiento del proceso enzimático en base seca, conservando el BSD.

3.4 Pretratamientos a nivel planta piloto

A continuación se muestran los resultados arrojados durante cada uno de los pretratamientos (ácido y alcalino) realizados a nivel planta piloto para remover la hemicelulosa y la lignina, ambos siendo necesarios para la obtención de aproximadamente 8 Kg de celulosa.

3.4.1 Hidrólisis ácida a nivel planta piloto

El pretratamiento ácido se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones empleadas en la sección 2.6, empleando fermentadores con capacidad de 1 Kg, la cantidad de BSD crudo hidrolizado fue de 30 Kg. Una vez realizada la hidrólisis ácida del BSD, se cuantificó el contenido de fibra remanente para calcular el porcentaje de remoción de hemicelulosa. La composición hemicelulósica se muestra en la Figura 3.10.

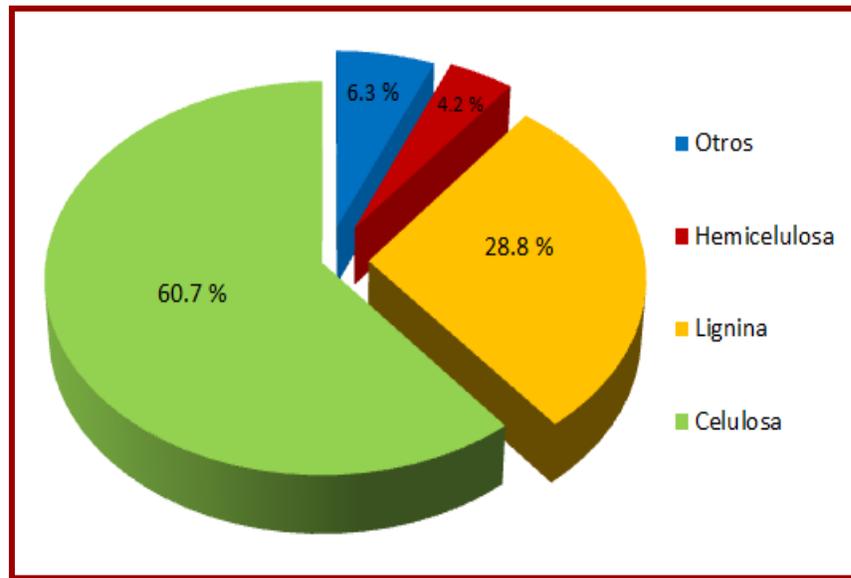


Figura 3.10 Contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado

Para determinar la efectividad de la hidrólisis ácida es necesario conocer el porcentaje de remoción de hemicelulosa, el cual es un indicativo de ello y puede ser calculado a partir de la ecuación 3.3.

$$\% \text{Remocion}_{\text{Hemicelulosa}} = \left[\frac{\% \text{hemicelulosa}_{\text{inicial}} - \% \text{hemicelulosa}_{\text{final}}}{\% \text{hemicelulosa}_{\text{inicial}}} \right] * 100 \quad (3.3)$$

Se obtuvo un promedio de 86 % de remoción de hemicelulosa, 2 % menor al porcentaje de remoción obtenido a nivel laboratorio (88 %), pero 6.17 % superior a lo reportado por Chen *et al.*, (2007) para el bagazo de sorgo dulce (121 °C, RLS de 10:1, H₂SO₄ de 1 % v/v y tiempo de 60 min), además de mejorar el porcentaje de remoción en un 16.21 %, superior al reportado por Viveros *et al.*, (2014).

La mejoría en la eliminación de la hemicelulosa en el presente trabajo se le atribuye al aumento en la concentración del H₂SO₄ empleado en relación a los trabajos anteriores. Es importante destacar que la magnitud de la degradación depende de la concentración del ácido, la temperatura y el tiempo de la hidrólisis, observándose

que a medida que actúa el ácido, el peso molecular y la viscosidad de los productos decrecen y el poder reductor aumenta. Por lo tanto los pretratamientos que utilizan ácidos diluidos dan como resultado una cantidad significativa de la fracción hemicelulósica de la biomasa, obteniendo altos rendimientos de azúcares solubles provenientes de la hemicelulosa principalmente xilosa.

Una vez terminado el proceso ácido, se procedió a cuantificar la fracción líquida recuperada la cual se generó en una cantidad abundante como consecuencia de una experimentación a nivel planta piloto, alcanzando los 116 L de prehidrolizado obtenido, el cual al ser analizado mediante HPLC presentó una concentración de xilosa, superior a la obtenida por otros autores tal como se muestra en la Tabla 3.7, además de presentar concentraciones de 4.96 g/L de ácido acético y 0.607 g/L de furfural las cuales no superan el contenido máximo de inhibidores permisibles para la producción de xilitol (6 y 1 g/L respectivamente Rangel *et al.*, 2009).

Tabla 3.7 Comparación de las concentraciones de xilosa obtenidas por diversos autores

Autor	Concentraciones obtenidas mediante HPLC (g/L)			
	Xilosa	Glucosa	Á. Acético	Furfural
Chen <i>et al.</i> , (2010)	29.84	-----	2.23	0.74
Nochebuena (2012)	21.01	2.63	4.68	0.21
Viveros <i>et al.</i> , (2014)	39.58	7.83	3.20	0
Presente Trabajo	47.17	4.93	4.96	0.60

3.4.2 Hidrólisis alcalina a nivel planta piloto

El bagazo pretratado con ácido diluido presentó una humedad del 5.75 % después de su correspondiente etapa de secado, mismo porcentaje de agua que fue tomado en consideración al momento de preparar la solución de H₂O₂ al 4 % necesaria para llevar a cabo el tratamiento alcalino. Posterior a la deslignificación del BSD

prehidrolizado, se procedió a cuantificar el contenido de fibra remante, los resultados de la composición lignocelulósica se muestran en la Figura 3.11.

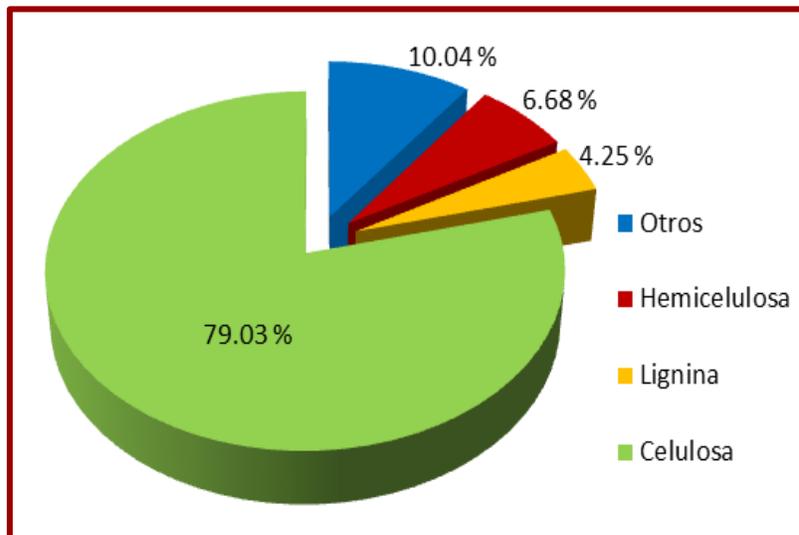


Figura 3.11 Contenido de fibra del BSD deslignificado

A partir de la Figura 3.11 es posible distinguir que después de los pretratamientos aplicados, el BSD se encuentra conformado en su mayoría por celulosa, reduciendo su contenido de hemicelulosa y lignina únicamente a un 6.68 y 4.25 %. La fase líquida del hidrolizado alcalino presentó una concentración de 48.21 g/L de glucosa y un pH de 8.6 lo que representa una disminución del 7.3 % en comparación con la concentración de glucosa obtenida en la experimentación a nivel laboratorio con un total de 228 L recuperados, finalmente mediante la ecuación 3.4 se calculó el porcentaje de remoción de lignina con el objetivo de conocer la efectividad del tratamiento realizado.

$$\% \text{Remoción}_{Lignina} = \left[\frac{\% \text{lignina}_{inicial} - \% \text{lignina}_{final}}{\% \text{lignina}_{inicial}} \right] * 100 \quad (3.4)$$

Se obtuvo un promedio del 85 % en cuanto a remoción de lignina, 17 % por arriba de lo obtenido por Viveros *et al.*, (2014). El tratamiento con peróxido de hidrógeno

(agente oxidante) aumenta la susceptibilidad de la hidrólisis enzimática al eliminar más del 80 % de la lignina y que en conjunto con la anterior eliminación de hemicelulosa, son solubilizadas liberando glucosa durante la sacarificación.

3.5 Adaptación del equipo a escala piloto

Se adaptó un tanque de acero inoxidable con un volumen de 100 L perteneciente al laboratorio de Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Veracruz, dicho tanque cuenta con una chaqueta de calentamiento, siendo necesario realizarle una limpieza interna mediante un lavado con agua a 75°C, logrando eliminar todo el polvo acumulado y los posibles rastros de óxido.

Al realizar una prueba con agua caliente recirculando dentro de la chaqueta, se observó que en el interior del equipo la temperatura era menor a la del agua caliente alimentada, atribuyéndose esta diferencia de temperaturas a las pérdidas de calor disipadas al exterior del tanque, siendo necesario aislar el calor en la chaqueta, empleando como aislante unos pequeños cortes de láminas de unisol (5 x 5 cm) y protegiéndolos con cinta industrial como se observa en la Figura 3.12.



Figura 3.12 Aislamiento de la chaqueta de calentamiento del equipo destinado para la hidrólisis enzimática a nivel planta piloto

Después del aislamiento de la chaqueta, se volvió a repetir una prueba con agua caliente, observándose una diferencia de 7 °C entre la temperatura del agua alimentada y la temperatura en el interior del tanque, esta diferencia de temperatura fue considerada al instalar el intercambiador de calor, el cual consistió en un recirculador de agua que cuenta con un serpentín de calentamiento que se programó a 57 °C logrando que la temperatura dentro del tanque se estabilizara en 50 °C que es la temperatura adecuada para la enzima.

El sistema de agitación del tanque fue implementado mediante un motor con flecha capaz de alcanzar 1500 rpm, lo cual favorece la degradación de la celulosa, pues maximiza el contacto entre esta y la enzima, no siendo necesaria una agitación constante que solo requeriría mayor uso energía eléctrica y dañaría el motor por un calentamiento excesivo. Para evitar el encendido y apagado manual del motor, se instaló un temporizador de 12 eventos programables, adaptándolo para encender el motor cada 50 min durante lapsos de 10 min. La Figura 3.13 muestra el tanque adaptado con su chaqueta de calentamiento aislada y su recirculador de agua caliente, utilizando plástico auto adherible como cubierta para evitar pérdidas por evaporación del hidrolizado enzimático.



Figura 3.13 Tanque adaptado para la hidrólisis enzimática a nivel planta piloto

3.6 Hidrólisis enzimática del BSD a nivel planta piloto

El escalamiento del proceso enzimático a partir del bagazo de sorgo dulce a nivel piloto es la parte culminante del presente trabajo mediante lo cual se busca observar el comportamiento de la celulasa empleada fuera de las condiciones laboratorio, debido a que en un gran número de procesos químicos el escalamiento representa un cambio en los resultados obtenidos a escala pequeña. Además de lograr obtener un resultado final en la concentración de glucosa que no sea drásticamente inferior al obtenido mediante la optimización a nivel laboratorio.

El proceso enzimático se realizó por duplicado, empleando como materia prima la celulosa obtenida después de los pretratamientos ácido y alcalino aplicados al BSD crudo inicial. Ambas pruebas enzimáticas se realizaron con 4 Kg de celulosa cada una, con una humedad del 7.5 % como resultado de 48 h de secado solar. Las condiciones del proceso fueron las mismas condiciones óptimas presentadas en la Tabla 3.4 (Tiempo de 51 h, % enzima p/p de 5, RLS de 5:1 y temperatura de 50 °C).

Una vez iniciada la hidrólisis, fue evidente que la gran cantidad de celulosa hacía difícil el trabajo del agitador, motivo por el cual la reacción se dejó sin agitación durante las primeras 20 h, tiempo en el que fue posible observar el buen funcionamiento de la enzima.

Después de las primeras 20 h, se instaló el agitador con su respectivo temporizador, dejando desarrollarse la reacción durante las 31 h restantes, al final del proceso la celulosa se había degradado casi completamente por lo que únicamente se visualizaba una sola fase líquida comprobándose que un sistema de agitación potente favorece el desarrollo de la reacción. Una vez terminado el proceso, se tomaron muestras del hidrolizado enzimático, presentando concentraciones de 141.50 y 143.61 g/L de glucosa corroborando que las condiciones obtenidas a escala laboratorio son completamente reproducibles a nivel planta piloto sin afectar la concentración de glucosa generada.

Si se compara la concentración más alta obtenida a nivel planta piloto respecto a la obtenida mediante el laboratorio, es posible identificar un incremento del 14.7 %, lo que se le atribuye a la velocidad de agitación del motor implementado, ocasionando un mayor contacto entre la celulosa y la enzima además de romper el material por el gran número de rpm que presenta, tal como puede apreciarse en la Figura 3.14.



Figura 3.14 Degradación de la celulosa mediante la hidrólisis enzimática a nivel planta piloto

3.7 Hidrólisis enzimática a partir de BSD deslignificado

Como una parte adicional en la presente investigación, se experimentó el uso de dos diferentes enzimas utilizadas al mismo tiempo en una hidrólisis enzimática, utilizando una celulasa (Cellic CTec3) y una hemicelulasa (HTec3).

La deslignificación del bagazo se llevó a cabo aplicando el tratamiento alcalino bajo las mismas condiciones presentadas en la sección 2.3.2 La cantidad utilizada de BSD fue de 1 Kg inicial con una humedad del 13 % (0.870 Kg BSD seco), reduciéndose después del tratamiento a 0.540 Kg con 9.36 % de humedad (0.490 Kg), recuperando una fracción líquida de 12 L.

3.7.1 Determinación de las concentraciones enzimáticas

En la Tabla 3.8 se pueden observar las diferentes concentraciones de glucosa y xilosa generadas a partir de las 3 distintas combinaciones enzimáticas planteadas en la Tabla 2.3.

Tabla 3.8 Concentraciones de Glucosa y Xilosa obtenidas a partir de tres diferentes combinaciones enzimáticas (CTec3 y HTec3)

Prueba	Glucosa (g/L)			Xilosa (g/L)		
	a	b	Promedio	a	b	Promedio
1	30.11	30.63	30.37	28.46	29.24	28.85
2	30.69	31.63	31.16	30.85	30.48	30.67
3	34.35	35.00	34.67	32.05	33.00	32.53

Las concentraciones de azúcares promedio obtenidas en cada combinación enzimática se aprecian visualmente mejor mediante la Figura 3.15.

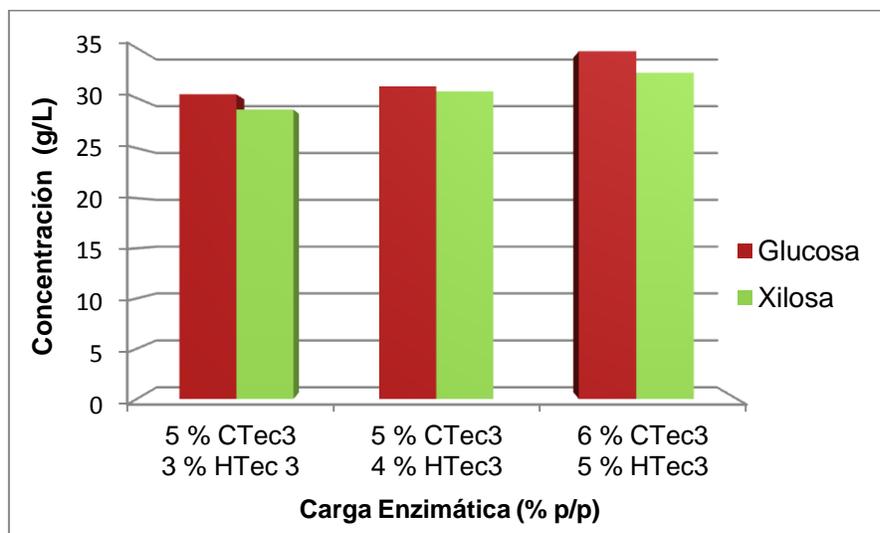


Figura 3.15 Comparación de las concentraciones obtenidas en la Tabla 3.8

De acuerdo a la Figura 3.15 es posible visualizar que entre el 3 % y el 5 % p/p de HTec3 únicamente existe un incremento del 6 % de xilosa, pero al emplear

concentraciones de 6 % de CTec3 y 5 % de HTec3 el incremento presentado es de 14.19 % de glucosa y 12.75 % de xilosa, respecto a las concentraciones obtenidas utilizando un 5 % de CTec3 y 3 % de HTec3, sin embargo representa una mayor adición de ambas enzimas especialmente en la celulasa, por lo cual se declinó por usar la combinación enzimática más baja, lo que permite disminuir el gasto de cada una de las enzimas sin que esto afecte de manera drástica las concentraciones de glucosa y xilosa obtenidas durante la hidrólisis.

3.7.2 Condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática del BSD deslignificado (Base seca)

A partir del diseño planteado en la Tabla 2.4 se desarrollaron pruebas en una fase líquida de 100 mL. La cantidad de enzima a utilizar se determinó calculando el porcentaje p/p respecto a la cantidad de bagazo a tratar y dividiendo este resultado entre la densidad de las enzimas (1.2 g/mL), mientras que los g de bagazo se calcularon de acuerdo a las RLS propuesta respecto a la fase líquida utilizada la cual se mantuvo constante en todas las pruebas (100 mL).

En la Tabla 3.9 es posible visualizar los resultados obtenidos a partir del diseño experimental Box Behnken (Tabla 2.4).

Se puede observar que las conversiones de azúcares oscilaron en un rango de 81.00 a 135.84 g/L para la glucosa y 32.17 a 80.49 g/L para la xilosa, obteniéndose los mejores resultados en las pruebas 5 y 6 (135.84 g/L de glucosa y 80.49 g/L de xilosa), concentración de glucosa 12.36 % inferior con respecto al valor óptimo obtenido experimentalmente en la hidrólisis enzimática del BSD (sección 3.3.6), sin embargo, esta diferencia se compensa con la generación de xilosa. Este tratamiento elimina la etapa ácida del proceso, aunque se recomienda profundizar con mayor énfasis en estudios posteriores con la finalidad de observar las ventajas y desventajas de esto conlleva.

Tabla 3.9 Resultados obtenidos a partir del tercer diseño experimental para la obtención de glucosa y xilosa considerando la carga enzimática, tiempo y masa de bagazo

Muestra	VARIABLES NATURALES			RESULTADOS	
	Bagazo (g)	Tiempo (h)	Enzima (mL) CTec3 : HTec3	Glucosa (HPLC g/L)	Xilosa (HPLC g/L)
1	14.29	24	0.47 : 0.23	98.23	44.46
2	14.29	24	0.71 : 0.47	105.32	52.03
3	14.29	72	0.47 : 0.23	119.93	65.75
4	14.29	72	0.71 : 0.47	104.80	52.48
5	20	48	0.66 : 0.33	130.25	75.10
6	20	48	1.00 : 0.66	135.84	80.49
7	11.11	48	0.37 : 0.18	95.43	41.08
8	11.11	48	0.55 : 0.37	95.71	43.60
9	20	24	0.83 : 0.50	121.55	67.68
10	20	72	0.83 : 0.50	123.65	68.22
11	11.11	24	0.46 : 0.27	81.00	36.24
12	11.11	72	0.46 : 0.27	92.17	32.17
13	14.29	48	0.59 : 0.35	109.85	56.96
14	14.29	48	0.59 : 0.35	110.27	57.87
15	14.29	48	0.59 : 0.35	108.13	56.91

3.7.3 Análisis de regresión en función de la carga enzimática, tiempo y masa de bagazo

A partir de los resultados obtenidos en la Tabla 3.9 se realizó un análisis de regresión empleando el software NCSS, determinando el modelo matemático que se ajuste al comportamiento de la hidrólisis enzimática del BSD deslignificado, para satisfacer la

variable de la carga enzimática únicamente se consideró la carga de celulasa empleada debido a que es la de mayor influencia entre las dos enzimas. Para dicho modelo se considera en variables naturales la carga enzimática en % p/p (CE), tiempo (t) y masa de bagazo (MB), y como variable de respuesta la producción de glucosa (g/L). El modelo presentado en la ecuación 3.5 presenta un ajuste del 93.21 % garantizando la reproducibilidad del proceso.

$$\begin{aligned} \text{Glucosa (g/L)} = & 15.1177 - 31.8375 * \text{CE} + 2.6850 * t + 10.9211 * \text{MB} + 3.6807 * \text{CE}^2 - \\ & 0.01047 * t^2 - 0.2559 * \text{MB}^2 - 0.2315 * \text{CE} * t + 0.4230 * \text{CE} * \text{MB} - \\ & 0.02469 * t * \text{MB} \end{aligned} \quad (3.5)$$

La Figura 3.16 muestra la gráfica de residuos para el modelo obtenido. Se puede observar que todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos aleatoriamente con una dispersión del 6.79 % de los datos los cuales no ajustan uniformemente sobre la línea recta la cual representa el modelo propuesto.

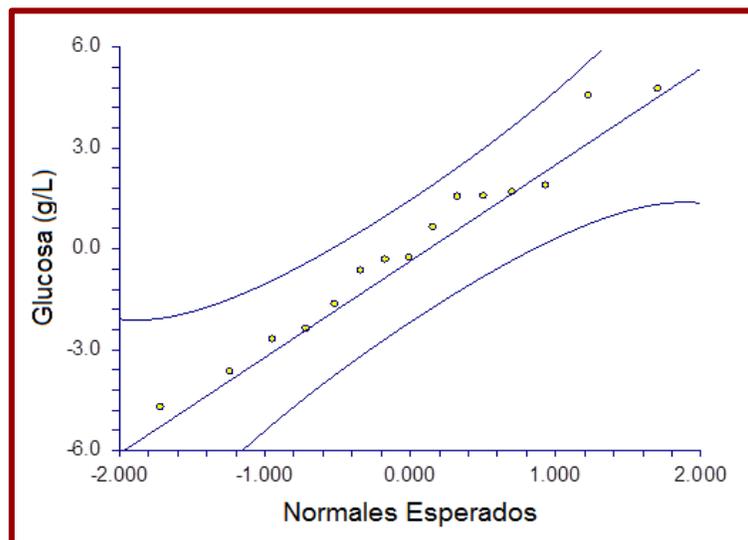


Figura 3.16 Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 3 (Ec. 3.5)

3.7.4 Análisis de contornos de la producción de glucosa y xilosa

En la Figura 3.17 (a) se aprecia una conversión de 128 g/L de glucosa con un contorno de color azul delimitado por un t de 48 h y 20 g de bagazo (RLS 5:1), mientras que la Figura 3.17 (b) presenta la máxima conversión de xilosa mediante las mismas condiciones obteniendo la respuesta máxima en el contorno de color verde.

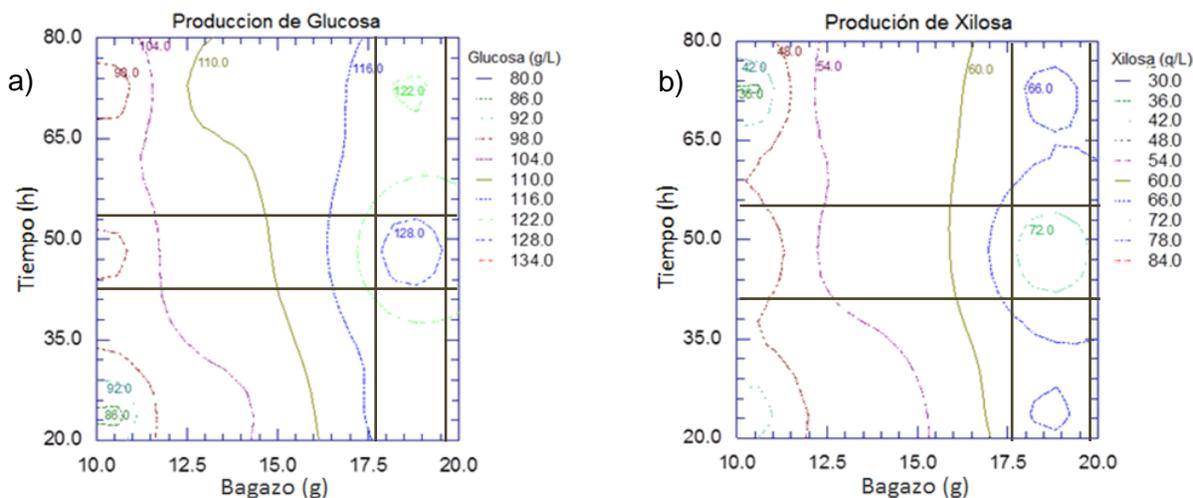


Figura 3.17 Gráficas de contornos sobre la producción de glucosa (a) y xilosa (b) a partir de la hidrólisis enzimática del BSD deslignificado analizando Tiempo (h) vs Bagazo (g)

Aun existiendo el uso de dos diferentes enzimas simultáneamente (celulasa y hemicelulasa), es evidente que hay una relación directa respecto a la máxima producción de glucosa y xilosa bajo las mismas condiciones de tiempo y RLS lo cual beneficia el proceso debido a que no se tienen que explorar rangos diferentes entre estas dos variables para cada enzima, lo cual comprueba que tomando únicamente la celulasa como variable de respuesta es posible predecir el valor óptimo de hemicelulosa que se debe emplear.

3.7.5 Análisis de superficie de respuesta de la producción de glucosa y xilosa usando BSD deslignificado en base seca

Las gráficas de superficie de respuesta presentadas en la Figura 3.18 generadas mediante el estudio de las variables de Tiempo vs Cantidad de bagazo, predicen la

mayor conversión de ambos azúcares en un tiempo de 48 h y una cantidad de Bagazo de 20 g correspondiente a una RLS de 5:1, comprobando la respuesta obtenida por los contornos.

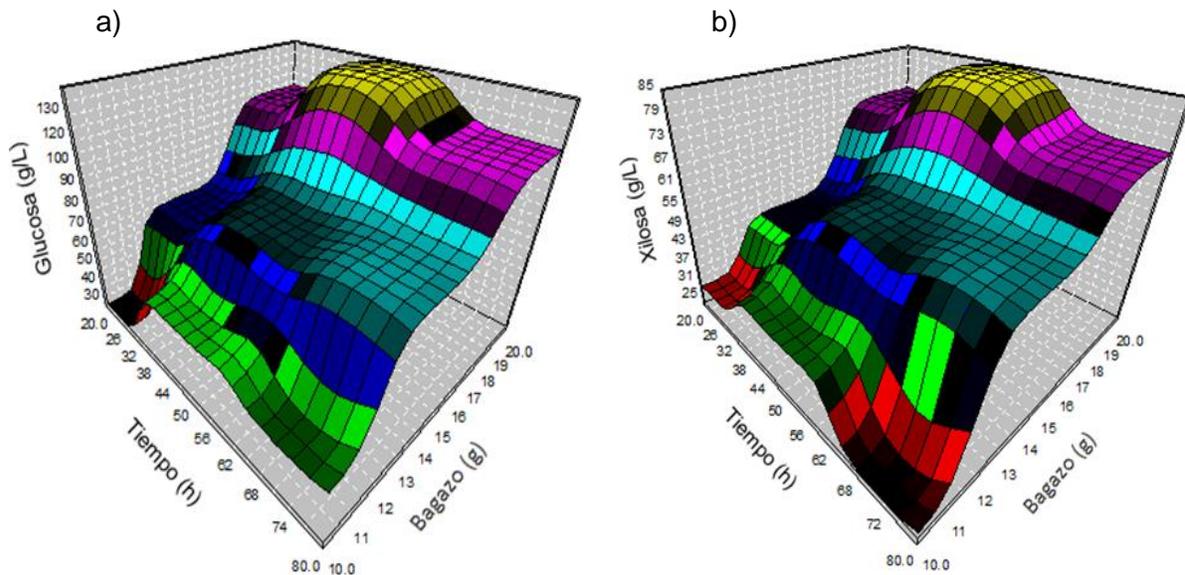


Figura 3.18 Graficas de superficie de respuesta del contenido de glucosa y xilosa en la hidrólisis enzimática: (a) Tiempo (h) vs Bagazo (g) para la producción de glucosa y (b) Tiempo (h) vs Bagazo (g) para la obtención de xilosa

3.7.6 Hidrólisis enzimática del BSD deslignificado en base húmeda

La hidrólisis enzimática del BSD deslignificado en base húmeda, presentó concentraciones de glucosa y xilosa muy similares a los obtenidas en base seca. Al no existir etapa de secado es importante mencionar que la humedad de la materia prima utilizada fue de 63.6 %, dato a partir del cual se consideraron las cantidades de BSD deslignificado a utilizar en cada prueba. Mediante la Tabla 3.10 se pueden apreciar y comparar los resultados obtenidos en el cuarto diseño experimental Box Behnken usando BSD deslignificado en proceso continuo.

Tabla 3.10 Resultados obtenidos a partir del cuarto diseño experimental para la obtención de glucosa y xilosa considerando: carga enzimática, tiempo y masa de bagazo (modo continuo)

Muestra	VARIABLES NATURALES			RESULTADOS	
	Bagazo (g)	Tiempo (h)	Enzima (mL) CTec3 : HTec3	Glucosa (HPLC g/L)	Xilosa (HPLC g/L)
1	39.25	24	0.47 : 0.23	99.25	47.91
2	39.25	24	0.71 : 0.47	107.25	53.84
3	39.25	72	0.47 : 0.23	122.48	62.83
4	39.25	72	0.71 : 0.47	107.68	56.65
5	54.94	48	0.66 : 0.33	128.39	74.46
6	54.94	48	1.00 : 0.66	130.32	78.21
7	30.52	48	0.37 : 0.18	97.65	43.45
8	30.52	48	0.55 : 0.37	95.09	43.50
9	54.94	24	0.83 : 0.50	123.74	69.15
10	54.94	72	0.83 : 0.50	122.93	70.43
11	30.52	24	0.46 : 0.27	85.12	40.60
12	30.52	72	0.46 : 0.27	95.43	34.87
13	39.35	48	0.59 : 0.35	111.92	58.72
14	39.25	48	0.59 : 0.35	111.25	58.54
15	39.25	48	0.59 : 0.35	109.88	56.78

El proceso en base húmeda muestra un comportamiento muy similar al proceso en base seca en cuanto a la producción de azúcares se refiere, oscilando en un rango de 85.12 a 130.32 g/L para la glucosa y 34.87 a 78.21 g/L para la xilosa, obteniéndose los mejores resultados en las pruebas 5 y 6 (128.29 y 130.32 g/L de glucosa y 74.46 y 78.21 g/L de xilosa respectivamente). Es evidente que la mayoría de las concentraciones de glucosa y de xilosa se encuentran por encima de las obtenidas en la experimentación en base seca, sin embargo, comparando las pruebas que presentan las mayores concentraciones de azúcares, se puede observar una desventaja del 4.2 % de glucosa y 3 % de xilosa respecto a los resultados en base seca (135.84 y 80.49 g/L respectivamente).

3.7.7 Análisis de regresión en función de la carga enzimática, tiempo y MB

A partir de los resultados obtenidos en la Tabla 3.10 se realizó un análisis de regresión empleando el software NCSS, determinando el modelo matemático que se ajuste al comportamiento de la hidrólisis enzimática del BSD deslignificado en base húmeda, la carga enzimática fue considerada de la misma forma que en la sección 3.7.3. Para dicho modelo se considera en variables naturales la carga enzimática en % p/p (CE), tiempo (t) y masa de bagazo (MB), y como variable de respuesta la producción de glucosa (g/L). El modelo presentado en la ecuación 3.6 presenta un ajuste del 98.97 % asegurando la reproducibilidad del proceso.

$$\begin{aligned} \text{Glucosa (g/L)} = & -17.7953 - 18.2216 * \text{CE} + 2.4052 * t + 4.2295 * \text{MB} + 2.4362 * \text{CE}^2 - \\ & 0.006286 * t^2 - 0.03379 * \text{MB}^2 - 0.2375 * \text{CE} * t + 0.1056 * \text{CE} * \text{MB} - \\ & 0.01077 * t * \text{MB} \end{aligned} \quad (3.6)$$

La Figura 3.19 muestra la gráfica de residuos para el modelo obtenido. Se puede observar que todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad con una dispersión mínima del 1.03 % de los datos los cuales no ajustan uniformemente sobre la línea recta la cual representa el modelo propuesto.

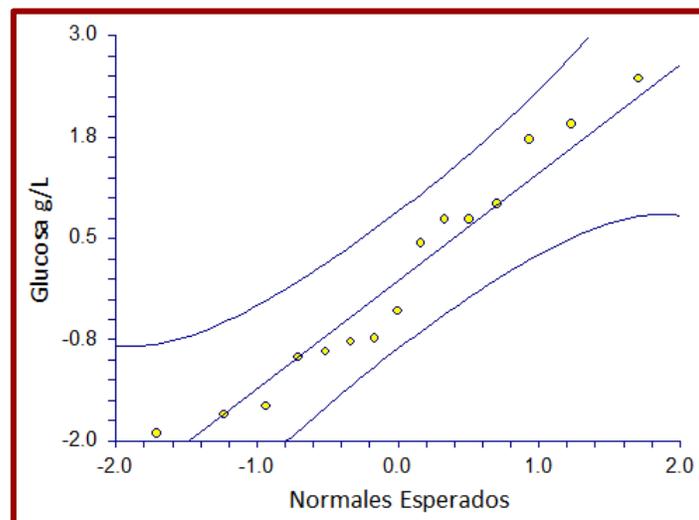


Figura 3.19 Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 4 (Ec. 3.6)

3.7.8 Análisis de superficie de respuesta de la producción de glucosa y xilosa

La gráfica de superficie de respuesta de Tiempo (h) vs Bagazo (g) presentada en la Figura 3.20 muestra que entre las 48 h (125 g/L) y las 70 h (140 g/L) del proceso únicamente existe un incremento del 12 % de glucosa mientras que el tiempo de reacción se incrementa hasta en un 45.8 % equivalente a 22 h más.

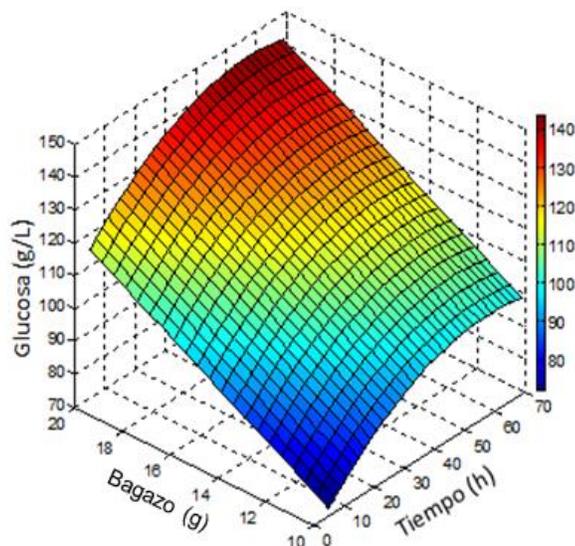


Figura 3.20 Contenido de glucosa en la hidrólisis enzimática: Tiempo (h) vs Bagazo (g)

3.7.9 Comprobación de las respuestas obtenidas utilizando BSD deslignificado a nivel laboratorio

El análisis de optimización mediante el NCSS determinó una conversión de glucosa de 134 g/L para las siguientes condiciones óptimas en base seca: carga enzimática de 5 % p/p de CTec3 y 3 % de HTec3, tiempo de 48 h y masa de bagazo de 23.52, en un medio líquido de 100 mL lo cual representa una RLS de 4.2:1. Las condiciones óptimas de trabajo se comprobaron de manera experimental, realizando una prueba, obteniendo concentraciones de 121.12 g/L de glucosa, resultado inferior en un 10.63 % respecto al valor predicho por el modelo, además de producir 76.38 g/L de xilosa.

Para la experimentación en base húmeda, el análisis estadístico predice una conversión de 129.20 g/L de glucosa empleando una carga enzimática de 5 % p/p de

CTec3 y 3 % de HTec3, tiempo de 48 h y una masa de bagazo de 63.106 la cual después de considerar la humedad contenida (63.6 %), resulta únicamente en 23 g de bagazo en un medio líquido de 100 mL lo cual genera una RLS de 4.5:1. Las condiciones óptimas obtenidas fueron corroboradas mediante experimentación, obteniendo una concentración de glucosa final de 126.62 g/L de glucosa, resultado inferior en un 2 % respecto al valor teórico predicho, pero superior en un 4.54 % en comparación con la concentración obtenida en base seca. La producción de xilosa presento una conversión máxima de 81.39 g/L lo cual representa un incremento del 6.56 % en comparación a la concentración de xilosa obtenida en base seca.

3.8 Producción de etanol a partir de la fermentación

La Tabla 3.11 muestra las diferentes concentraciones de glucosa y de etanol generadas a diversos tiempos de fermentación.

Tabla 3.11 Consumo de glucosa y producción de etanol a distintos tiempos de fermentación

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Etanol (g/L)
0	138.16	0.6
1	136.12	1.05
2	133.56	1.08
3	131.15	2.19
4	126.10	5.02
5	117.65	11.38
6	107.48	13.07
7	54.08	23.81
8	46.67	27.97
10	23.48	38.59
12	17.90	46.79
14	9.19	57.97

Durante las primeras 6 horas, la generación de etanol fue pobre (13.07 g/L), presentando un incremento acelerado a partir de la hora 10 hasta el término de la fermentación, con un tiempo total de 14 h de reacción y una generación final de 57.97 g/L de etanol, resultado similar al obtenido por Partida-Sedas (2016) a partir de jugo de sorgo dulce (62.11 g/L) y una mezcla de jugo de sorgo con hidrolizado enzimático (59.48 g/L). La Figura 3.21 muestra claramente los efectos del consumo de glucosa (g/L) contra generación de etanol (g/L), con un remanente de 9.19 g/L de glucosa al final de la fermentación.

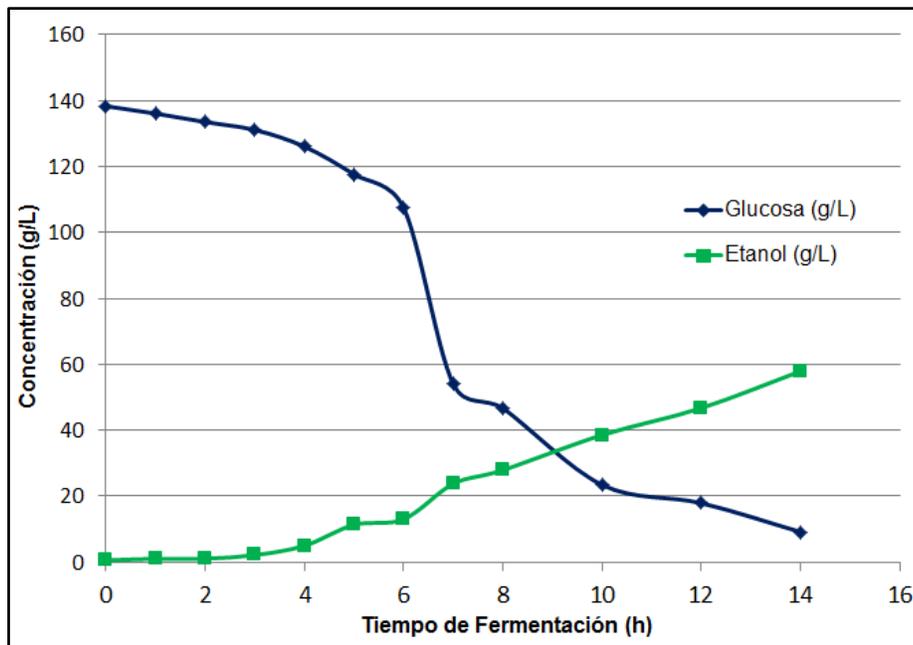


Figura 3.21 Consumo de glucosa vs producción de etanol durante la fermentación

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- El tratamiento aplicado con H_2SO_4 al 1.5 %, permitió remover cerca del 85 % de la hemicelulosa, obteniéndose en la fracción líquida 47.173 g/L de xilosa a nivel planta piloto. Durante el proceso de remoción de lignina mediante el tratamiento alcalino con H_2O_2 al 4 %, se obtuvo un promedio del 86 % de remoción.
- Los resultados a nivel laboratorio obtenidos de la hidrólisis enzimática en base seca se analizaron estadísticamente determinándose que los valores adecuados e trabajo son: carga enzimática de 5 % p/p, tiempo de 51 h y masa de celulosa de 20 g (RLS de 5:1), obteniéndose 97.09 g/L de glucosa. Dichos valores fueron validados experimentalmente obteniéndose un incremento del 27.66 % en la glucosa producida (125.20 g/L).
- Mediante la hidrólisis enzimática del BSD en base húmeda se obtuvo una conversión de 148.64 g/L de glucosa, valor superior en un 18.71 % respecto al resultado obtenido experimentalmente en base seca (125.50 g/L), además de la disminución del 6 % en el tiempo de reacción (3 h) dicho resultado puede atribuirse a la presencia de agua dentro de la materia prima lo cual beneficia la actividad enzimática y su consiguiente penetración por medio de la fase líquida dentro de la celulosa.
- El análisis de varianza realizado para la hidrólisis enzimática mostró que de las tres variables evaluadas, únicamente la masa de celulosa (RLS de 5:1) resultó como variable significativa, lo cual indica que la actividad enzimática sobre la celulosa es fuertemente dependiente de la cantidad de líquido empleado, validándose este resultado de acuerdo a lo observado en base húmeda, en donde el agua dentro de la materia prima facilita el contacto entre la enzima y la celulosa.

- La cinética realizada para el monitoreo de producción de glucosa en la etapa enzimática, demostró que entre las 52 h y las 92 h del proceso únicamente existe un incremento del 13.5 % de glucosa, valor insignificante comparado con el incremento del 77 % en el tiempo de reacción (40 h), lo cual corrobora las 51 horas de reacción presentadas por el modelo matemático.
- El escalamiento del proceso enzimático a nivel planta piloto permitió obtener una conversión de glucosa de 142.55 g/L, siendo posible identificar un incremento del 14.7 % respecto a la concentración de glucosa obtenida a escala laboratorio, lo que valida la reproducibilidad de las condiciones a nivel planta piloto.
- El empleo simultáneo de dos enzimas diferentes (celulasa y hemicelulasa) generó valores altos de glucosa y xilosa (121.12 y 76.38 g/L respectivamente), lo cual indica que ambas enzimas empleadas tienen un excelente poder de degradación sobre la materia prima, ratificando los altos índices de estos azúcares contenidos en el bagazo de sorgo dulce.
- Es posible afirmar que existe una relación directa respecto a la máxima producción de glucosa y xilosa bajo las mismas condiciones de tiempo y RLS lo cual beneficia el proceso debido a que no se tienen que explorar rangos diferentes entre estas dos variables para cada enzima, comprobándose que tomando únicamente la celulasa como variable de respuesta se puede predecir el valor óptimo de hemicelulasa que se debe emplear de acuerdo a los resultados presentados en las pruebas experimentales y el análisis estadístico.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el uso de otros ácidos, por ejemplo, el fosfórico y el clorhídrico, para la etapa de hidrólisis ácida, monitorear si con estos aumenta la remoción de hemicelulosa y por ende la producción de xilosa.
- Realizar una cinética durante el pretratamiento alcalino con el objetivo de verificar si es posible reducir el tiempo de reacción, tratando de disminuir las 45 h del proceso mediante un monitoreo con muestreos cada 5 horas del proceso, además de implementar agitación para aumentar la superficie de contacto entre el bagazo y la solución alcalina utilizada.
- Proporcionar un sistema de agitación potente durante la hidrólisis enzimática para aumentar el contacto entre la fase líquida con la sólida y al mismo tiempo romper la celulosa tratada lo cual puede incrementar la conversión de glucosa.
- Explorar con mayor énfasis el uso de dos enzimas simultáneamente, verificando los parámetros obtenidos además de comparar las ventajas y desventajas que esta línea de investigación representa respecto al uso de una sola enzima comparar los costos, y el tiempo de trabajo invertido en cada línea experimental.

ANEXOS

ANEXOS

A.1 Determinación de humedad mediante Termobalanza Precisa XM50

Procedimiento:

1. Conectar la termobalanza a la toma de corriente
2. Abrir la cubierta del equipo y limpiar perfectamente el platillo metálico
3. Tarar la termobalanza oprimiendo el botón "Tare"
4. Depositar la muestra a la cual se le determinará la humedad, la cantidad de muestra recomendada debe de ser alrededor de ± 1.5 g (peso marcado por la propia termobalanza)
5. Cerrar la cubierta del equipo y comenzar el proceso oprimiendo el botón "star"
6. Dejar funcionar el equipo durante 30 min ininterrumpidos
7. Al finalizar el tiempo establecido, la termobalanza proporcionará un número en su pantalla, el cual corresponde al número de Sólidos Totales, este dato debe de anotarse debido a que se utilizará posteriormente.
8. Retirar el platillo metálico de la termobalanza y eliminar la muestra analizada, limpiar perfectamente la termobalanza, y desconectar el equipo.
9. La humedad de la muestra se calcula mediante la ecuación A1.1

$$\% \text{ Humedad} = 100 \% - ST \quad (\text{A1.1})$$

Dónde: *ST* corresponde al número de sólidos totales determinados.

A.2 Determinación de paredes celulares: fibra detergente neutro a través de la técnica de la bolsa filtro de alimentación (ANKOM²⁰⁰)

Este método determina la fibra detergente neutro, la cual es el residuo remanente posterior a la digestión efectuada por una solución detergente. Los residuos de fibra son predominantemente hemicelulosa, celulosa y lignina.

Aparatos

1. Balanza analítica capaz de pesar hasta 0.1 mg.
2. Horno capaz de mantener una temperatura de $102\pm 2^{\circ}\text{C}$.
3. Instrumento de digestión capaz de realizar la digestión a $100\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y mantener la presión de 10 a 25 psi (ANKOM²⁰⁰, 65 rpm de agitación, ANKOM Technology).
4. Bolsas filtro capaz de retener partículas de 25 micrones mientras se permite la penetración rápida de la solución (F57, ANKOM Technology).
5. Sellador de calor de las bolsas filtro (1915, ANKOM Technology).
6. Desecador (MoistureStop Weigh Pouch, ANKOM Technology)
7. Marcador solvente resistente al ácido (F08, ANKOM Technology)

Reactivos

Solución detergente neutro. Adicionar 30.0 g de sulfato lauril sódico, USP; 18.6 g de ácido etilendiaminotetracético disódico dihidratado; 6.81 g de tetraborato de sodio decahidratado; 4.56 g de fosfato disódico anhidro y 10 mL de trietilenglicol en 1 L de agua destilada (solución química premezclada disponible en ANKOM Technology). Verificar que el pH que oscile en el rango de 6.9 a 7.1. Agitar y calentar para disolver los reactivos.

Preparación de la muestra

Pulverizar la muestra en un molino centrífugo con una malla de 2 mm o en un molino cortador tipo Wiley con una malla de 1 mm.

Procedimiento

1. Marcar las bolsas filtro con un marcador resistente a la temperatura. Pesar la bolsa filtro (W_1).
2. Pesar 0.45-0.55 g de muestra preparada (W_2) directamente en la bolsa filtro.
3. Sellar la bolsa filtro a través de un sellador por calentamiento en los 4 mm superiores de la bolsa.

4. Colocar un máximo de 24 bolsas dentro del contenedor de bolsas. Las nueve bandejas deben ser utilizadas independientemente del número de bolsas a procesar. Colocar 3 bolsas por cada bandeja. Insertar el contenedor de bolsas junto con las bolsas dentro del contenedor analizador de fibra.
5. Adicionar al contenedor analizador de fibra el volumen de 1900 mL a 2000 mL de solución fibra neutro detergente en caso de procesar 24 bolsas. En caso de procesar menos de 20 bolsas, adicionar 100 mL de solución por cada bolsa. Adicionar 20 g de sulfito de sodio a la solución dentro del recipiente.
6. Cambiar el interruptor a modo agitación y calor. Ajustar el reloj automático a 75 min y cerrar la tapa. Al final de la extracción, apagar tanto la agitación como el modo calor. Abrir la válvula de drenado y esperar a que se vacíe el recipiente antes de abrir la tapa.
7. Una vez el recipiente vacío, cerrar la válvula de drenado y abrir la tapa. Agregar 1900 mL (70°C-90 °C) de agua destilada. Accionar el modo agitar y enjuague por 5 min. Repetir el lavado con agua caliente 3 veces.
8. Una vez finalizado el proceso de lavado, remover las bolsas del recipiente. Oprimir moderadamente las bolsas para remover el exceso de agua. Colocar las bolsas en vasos de precipitados de 250 mL y adicionar suficiente acetona hasta cubrir las bolsas, dejar remojando de 3 a 5 min.
9. Remover las bolsas de la acetona y colocarlas en una zona donde circule aire hasta evaporar en su totalidad a la acetona. Secar completamente en horno o estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$.
10. Al finalizar, remover de la estufa las bolsas, colocarlas directamente en un desecador y aplanarlas para remover el aire. Enfriar a temperatura ambiente u pesar las bolsas.

Cálculos:

$$\% NFD = \frac{W_3 - W_1}{W_2} \times 100 \quad (\text{A2.1})$$

Dónde: NDF es la fibra detergente neutro, W_1 es el peso de la bolsa filtro (g), W_2 es el peso de la muestra (g) y W_3 es el peso de la bolsa filtro seca con la fibra después del proceso de extracción (g).

A.3 Determinación de paredes celulares: fibra detergente ácido a través de la técnica de la bolsa filtro de alimentación (ANKOM²⁰⁰)

Este método determina la fibra detergente ácido, la cual es el residuo remanente posterior a la digestión efectuada por H_2SO_4 y CTAB. Los residuos de fibra son predominantemente celulosa y lignina.

Aparatos

1. Balanza analítica capaz de pesar hasta 0.1 mg.
2. Horno capaz de mantener una temperatura de $102\pm 2^\circ C$.
3. Instrumento de digestión capaz de realizar la digestión a $100\pm 0.5^\circ C$ y mantener la presión de 10 a 25 psi (ANKOM²⁰⁰, 65 rpm de agitación, ANKOM Technology).
4. Bolsas filtro capaz de retener partículas de 25 micrones mientras se permite la penetración rápida de la solución (F57, ANKOM Technology).
5. Sellador de calor de las bolsas filtro (1915, ANKOM Technology).
6. Desecador (MoistureStop Weigh Pouch, ANKOM Technology)
7. Marcador solvente resistente al ácido (F08, ANKOM Technology)

Reactivos

Solución detergente ácido. Adicionar 20.0 g de bromuro de cetyltrimetilamonio (CTAB) a 1 L 1 N de H_2SO_4 previamente estandarizada, (solución química premezclada disponible en ANKOM Technology). Agitar y calentar para disolver los reactivos.

Preparación de la muestra

Pulverizar la muestra en un molino centrífugo con una malla de 2 mm o en un molino cortador tipo Wiley con una malla de 1 mm.

Procedimiento

1. Marcar las bolsas filtro con un marcador resistente a la temperatura. Pesar la bolsa filtro (W_1).
2. Pesar 0.45-0.55 g de muestra preparada (W_2) directamente en la bolsa filtro.
3. Sellar la bolsa filtro a través de un sellador por calentamiento en los 4 mm superiores de la bolsa.
4. Colocar un máximo de 24 bolsas dentro del contenedor de bolsas. Las nueve bandejas deben ser utilizadas independientemente del número de bolsas a procesar. Colocar 3 bolsas por cada bandeja. Insertar el contenedor de bolsas junto con las bolsas dentro del contenedor analizador de fibra.
5. Adicionar al contenedor analizador de fibra el volumen de 1900 mL a 2000 mL de solución fibra ácido detergente en caso de procesar 24 bolsas. En caso de procesar menos de 20 bolsas, adicionar 100 mL de solución por cada bolsa.
6. Cambiar el interruptor a modo agitación y calor. Ajustar el reloj automático a 60 min y cerrar la tapa.
7. Al final de la extracción, apagar tanto la agitación como el modo calor. Abrir la válvula de drenado y esperar a que se vacíe el recipiente antes de abrirlo.
8. Una vez el recipiente vacío, cerrar la válvula de drenado y abrir la tapa.
9. Agregar de 1900 mL a 2000 mL (70°C-90°C) de agua destilada. Accionar tanto el modo agitar y enjuague por 5 min. Repetir el lavado con agua caliente 3 veces por 5 min.
10. Una vez finalizado el proceso de lavado, remover las bolsas del recipiente. Oprimir moderadamente las bolsas para remover el exceso de agua. Colocar las bolsas en vasos de precipitados de 250 mL y adicionar suficiente acetona hasta cubrir las bolsas, dejar remojando de 3 a 5 min.

11. Remover las bolsas de la acetona y colocarlas en una zona donde circule aire hasta evaporar en su totalidad a la acetona. Secar completamente en horno a $102 \pm 2^\circ\text{C}$.
12. Remover de la estufa las bolsas, colocarlas directamente en un desecador y aplanarlas para remover el aire. Enfriar a temperatura ambiente u pesar las bolsas.

Calculo:

$$\% ADF = \frac{(W_3 - W_1)}{W_2} \times 100 \quad (\text{A3. 1})$$

Dónde: ADF es la fibra ácido detergente, W_1 es el peso de la bolsa filtro (g), W_2 es el peso de la muestra (g) y W_3 es el peso de la bolsa filtro seca con la fibra después del proceso de extracción (g).

A.4 Determinación de paredes celulares: ácido detergente lignina (ANKOM Technology)

Reactivos

Ácido sulfúrico (72 % en peso) ANKOM Technology-FSA72 o mezclar manualmente para estandarizar H_2SO_4 grado reactivo hasta alcanzar 1634 g/L de gravedad específica a 20°C o 24 normal: adicionar 1200 g de H_2SO_4 a 440 mL de agua en un recipiente volumétrico de 1 L con enfriamiento. Estandarizar esta solución a 1634 g/L de gravedad específica a 20°C , removiendo parte de la solución y añadiendo agua o H_2SO_4 según sea requerido.

Aparatos

1. Dispositivo de filtración, ANKOM Technology F57 bolsas filtro.

2. Sellador de bolsas por impulso, ANKOM Technology 1915 sellador por calentamiento.
3. Desecador, ANKOM Technology Moisture stop F39.
4. Vasos de 2 y 3 L.

Procedimiento:

1. Pesar la bolsa filtro (W_1).
2. Pesar 0.5 g (± 0.05 g) de muestra libre de aire (W_2), la muestra debe tener un tamaño capaz de pasar por 1 mm de tamaño de malla.
3. Sellar la bolsa filtro a través de un sellador por calentamiento en los 4 mm superiores de la bolsa.
4. Distribuir la muestra homogéneamente dentro de la bolsa filtro para eliminar el aglutinamiento.
5. Efectuar las determinaciones de fibra ácido detergente empleando el analizador de fibra (ver procedimiento A3).
6. Posterior a realizar las determinaciones ácido fibra detergente, colocar las muestras secas en un vaso de 3 L y adicionar aproximadamente 250 mL de ácido sulfúrico al 72 % hasta cubrir las bolsas.
7. Las bolsas deben estar completamente secas y temperatura ambiente antes de adicionar el ácido concentrado. Si la humedad está presente en las bolsas, el calor generado por la reacción entre el H_2SO_4 y el agua afectará adversamente los resultados.
8. Colocar el vaso de 2 L dentro del vaso de 3 L para mantener las bolsas sumergidas. Agitar las bolsas al inicio y por intervalos de 30 min oprimiendo moderadamente el recipiente de 2 L sobre las bolsas aproximadamente 30 veces.
9. Después de 3 h de realizar la agitación sobre las bolsas, vaciar el H_2SO_4 y aplicar un lavado con agua destilada para remover el ácido. Repetir los lavados hasta alcanzar pH neutro. Lavar con aproximadamente 250 mL de

acetona por 3 min para remover el agua. Secar completamente en horno a 105 °C por un periodo de 2 a 4 h. Remover las bolsas del horno y colocarlas directamente en el desecador, aplanándolas para remover el aire. Enfriar a temperatura ambiente y pesar (W_3).

Cálculos:

$$\% ADL = \frac{(W_3 - W_1)}{W_2} \times 100 \quad (\text{A4. 1})$$

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF} \quad (\text{A4. 2})$$

$$\% \text{ Celulosa} = \% \text{ ADF} - \% \text{ ADL} \quad (\text{A4. 3})$$

$$\% \text{ Lignina} = \% \text{ ADL} \quad (\text{A4. 4})$$

$$\text{Otros} = 100 \% - \% \text{ Hemicelulosa} - \% \text{ Celulosa} - \% \text{ Lignina} \quad (\text{A4. 5})$$

REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agbor, B. V., Cicek N., Sparling R., Berlin A. y Levin D. 2011. *Biotechnology Advances*. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **29**, 675:685.
- Álvarez, C. A., Delgado S. R., Hernández G. E., Domínguez D. M. M., Baeza G. J. M., Cruz A. A., García C. R. y Morales A. 2012. Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana* **13**(4), 140-150.
- Anaya D. A., y Pedroza F. H. 2008. Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Platas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos A. C. México. **23**(1), 31-39. ISSN 0186-6036.
- Azzam A. M. 1989. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J. Environ. Sci. Health*. (24)**4**, 421-433.
- Bonifacino-Buttiglione S. A. 2012. Estudios de deslignificación de bagazo de caña de azúcar para su uso en la producción de bietanol. Tesis de grado. Licenciatura en bioquímica. Facultad de Ciencias. Montevideo Uruguay.
- Bueno G., Cordovés M. y Delgado G. 2009. Sorgo dulce: sus potencialidades productivas. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Cuba. **18**(3), 15-2. ISSN 0138-6204.
- Cardona A. C. A. 2009. Perspectives of biofuels production in Colombia: Latinamerican and world contexts. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. **29**(1), 109-120. ISSN 0121-4993.
- Castillo H. P., Domínguez M. A. y Mata P. 2012. Análisis de las propiedades fisicoquímicas de gasolina y diésel mexicanos reformulados con Etanol. **13**(3), ISSN 1405-7743 FI-UNAM.
- Castillo V. N. P., y Siqueiros C. T. 2011. Biocombustibles estrategias limpias para combatir la crisis energética. *Tecnociencia Chihuahua* (2)**2**. ISSN 1700-8963.

- Chávez S. M. y Domine E. M. 2013. Lignin, structure and applications: depolymerization metho obtaining aromatic derivatives of industrial interest ds forValencia, España. **4**(4), 15-46. ISSN 0718-8706.
- Chen Y., Sharma S. R., y Chen D. 2007. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology Part A:Enzyme engineering and biotechnology*. **142**, 276-290.
- Chen Y., Dong B., Quin W. y Xiao D. 2010. Xilose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them of bioethanol. *Bioresource Technology*. **101**: 6494-6999.
- Chuck H. C., Carrillo P. E., Olea H. E., y Serna S. 2011. Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: tecnologías, avances y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. **10**(3), 529-549.
- Cortes-Ortiz W. G. 2014. Applicable to treatment materials for obtaining lignocellulosic ethanol and chemicals. *Journal of Technology*. **13**(1), 39-44.
- Cortínez-Villalobos, V. A. 2010. Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrolisis acida y líquidos iónicos. Tesis de grado. Maestría en ciencias en ingeniería química. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Santiago de Chile.
- Cuervo L., Folch L. J. y Quiroz E. R. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. (13)**3**. Instituto de Biotecnología Cuernavaca Morelos.
- Domínguez D. M. M., Castillo A. A., Rosales C. T., Baeza G. M. J., Campos H. F. J., Octaviano A. V. H. y Tapia J. 2011. Estudio de la cinética de la hidrolisis acida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azucares reductores. **12**(3), 153-159.
- Dopico D., Hernández Y., Bordallo E. y León V. 2014. Estudio preliminar sobre la influencia de las microondas en la hidrólisis alcalina del bagazo. Instituto Cuba de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). ISSN 2223-4861.

- FAOSTAD (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2011. faostat3.fao.org/search/SORGO%20DULCE/cultivos.bioenergeticos. Consultado el 15/09/2015 17:50 p.m.
- Giorgio M. E., Morales A., Congost G., Fonseca M. I., Abate C., Zapata D. P. y Villalba L. 2013. Laboratory evaluation of a submerged system production of endo-1,4-p-glucanase secreted for two strains of white rot fungi. *Journal Science and Technology*. **15**(19), 18-23.
- Gómez A. E., Ríos A. L. y Peña D. J. 2013. Efecto del pretratamiento de biomasa maderera en el rendimiento a etanol. Medellín Colombia. *Información Tecnológica*. **24**(5), 13-122.
- González A. S. y Brugués R. A. 2010. Production of biofuels with corn a welfare analysis in México. Tijuana México. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo sustentable*. (6)**1**, 73-85. ISSN 7361-3349.
- González R. S. M., Cruz S. N. O., Quiñonez R. O. M., Roldan M. H., Quiñonez R. J. G. y López J. 2011. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (Pinto villa, Pinto saltillo, Pinto mestizo y Flor de mayo). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. **10**(1), 17-28.
- Guarnizo F. A. y Martínez Y. P. 2009. Biomasa lignocelulósica y la producción de etanol. IV Simposio de Química Aplicada. ISSN 6759-3287.
- Guarnizo F. A., Yépez M. P., y Sánchez V. H. 2009. Pretratamiento de la celulosa y biomasa para la sacarificación. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701
- Guarnizo F. A., Yépez M. P. y Pinzón B. L. M. 2012. Azúcares del pseudotallo del plátano: una opción para la obtención de alcohol de segunda generación. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. Colombia. (10)**1**, 39-51. ISSN 0120-4211.
- Gutiérrez, R. 2011. Producción de etanol a partir de bagazo de caña, utilizando un cultivo mixto de levaduras. Tesis de grado. Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. México.

- Harris, R. J. 2012. Selección de pretratamientos en base a caracterización físico-química de residuos de *eucalyptus globulus* y *populus canadensis* para la producción de bioetanol. Tesis de grado. Maestría en Ciencias de la Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Chile.
- Islas J. D., Corona A. A., López E. V., Jurado T. A. y Rodríguez G. J. N. 2012. Obtención de azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida de *Beta vulgaris* L. Pachuca México. Revista Contaminación Ambiental. **28**(2), 151-158.
- Jeevan P., Nelson R. y Rena E. A. 2011. Optimization studies on acid hydrolysis of corn cob hemicellulosic hydrolysate for microbial production of xylitol. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. **4**: 114-123.
- Kim J. H., Kim B. S., y Kim J. C. 2007. The effects of nonionic surfactants on the pretreatment and enzymatic hydrolysis of recycled newspaper. Biotechnology and Bioprocess Engineering. **12**, 147-151.
- Lameda P., Negrelli C. y Hidalgo C. 2011. Obtención de etanol utilizando desechos domésticos. Cabimas, Venezuela. Revista de Investigación Redieluz (1)1, 34-40. ISSN 2244-7334.
- López M. J., Cruz S. N., Quiñonez R. O., Roldan M. H. y Niño A. K. 2008. Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. Durango México. Revista de Contaminación Ambiental. **25**(2), 95:12.
- Mateus L., Hernández O., Velázquez M. y Díaz J. 2012. Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum x pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. Departamento de Química Ambiental. Bogotá Colombia. **6**(2), 146:156.
- Medina M. M. A., Fernández L. L., Aguilar L. C. y De la Garza H. 2011. Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. **3**(6), 35-41
- Medina E. M., Hernández C. Y. y León M. T. 2012. Evaluación de la etapa de prehidrólisis del bagazo de caña para la obtención de etanol en planta piloto.

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA.) ISSN: 0138-6204. **46**(2), 30-37.

- Meléndez H. A., Beltrán H. J., Escoto H. H. y Rodríguez M. R.. 2015. Análisis del pretratamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de biocombustibles y bioproductos de alto valor agregado. Guanajuato, México. ISSN 4689-2145.
- Montes G. N., Quintero P. V., López C. M. E. y García A. M. 2010. RB. Cañero: sorgo dulce [*sorghum bicolor* (L.) Moench] para la producción de etanol. Folleto Técnico 43, ISBN: 978-607-425-355-9. (a).
- Montes G. N., García S. J., Jiménez G. A., Pérez L. R. y Padilla D. G. 2010. Guía técnica de producción de sorgo dulce [*sorghum bicolor* (L.) Moench] en Tamaulipas. Folleto Técnico 49, ISBN 978-607-425-468-6. (b).
- Montgomery C. D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Grupo editorial Iberoamérica México. ISBN: 968-18-6156-63.2.
- Morell N. J., Ricardo J. M. C. y Sánchez R. L. B.. 2014. Actualidades de la producción de feruloil esterasa por fermentación por fermentación en estado sólido. Universidad de Camagüey Cuba. Tecnología Química (34)**2**, 108-116.
- Nochebuena-Morando L. A. 2012. Estudio del efecto del tratamiento oxidativo y del Tween 80 sobre la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar. Tesis de grado. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. I. T. de Orizaba.
- Novozymes. 2014. www.novozymes.com. Consultado el 18/05/2016. 11.40 a.m.
- Pernalete Z., Piña F., Suarez M., Ferrer A. y Aiello C. 2008. Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniaco: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoniaco. Venezuela. Bioagro (20)**1**, 3-10.
- Polo L., Ferrer S. y Pardo I. 2007. Efecto de la lisozima, SO₂, microoxigenación, tip de recipiente y adición de cultivos malolácticos sobre la generación de aminas en vinos de tempranillo. Valencia, España. ISBN 978-84-690-6060-5.

- Prasad S., Singh A., Jain N. y Joshi C. H. 2007. Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India. American Chemical Society: Energy and Fuels (21)4. 2415-2420.
- Rangel, L. E., Lagunés G. F., Rodríguez G. J. y Uscanga A. M. G. 2009. Establecimiento de las condiciones de hidrólisis del bagazo de caña para la obtención máxima de xilosa y mínima de inhibidores. VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras.
- Rodríguez-Molina R. 2014. Estudio del proceso fermentativo para la obtención de etanol a partir de bagazo de caña empleando *Zymomonas mobilis* y *Pichia stipitis* NNRL-Y7124. Tesis de grado. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. I. T. de Orizaba.
- Rojas P. L. C., Castro P. Y. y Lozano V. M. E. 2011. Production of fermentable sugars from press fiber oil palm pre-treated biologically by *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium*. Bucaramanga Colombia. (24)2, 29-35.
- Salcedo M. J. G., Galán L. J. E. y Florez L. M. 2011. Evaluation of enzymes for the hydrolysis of waste (leaves and top cane) from the harvest of sugar cane. Medellin. **169**, 182-190. ISSN: 0012-7353.
- Salinas C. E. y Gasca Q. V. 2009. Los biocombustibles. Universidad Autónoma Metropolitana. Distrito Federal, México. (25)157, 75-82. ISSN 0186-1840.
- Sánchez O. J. y Cardona C. A. 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diversas materias primas. Interciencia, Caracas, Venezuela (30)11, 671-678. ISSN 0378-1844.
- Tejeda P. L., Tejeda C., Villabona A., Alvear R. M., Castillo R. C., Henao L. D., Marimon W. Y Madariaga N. 2010. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cascaras de naranja y piña. Revista Educación en Ingeniería. **10**, 120-125. ISSN 1900-8260.
- Tejeda L., Quintana J., Pérez J., y Young H. 2011. Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica. (14)1, 111 – 116.

- Tudare J., Faneite A., Ferrer A., Chacón D., Ríos J. y Ledesma A. 2013. Pretratamiento de la cascarilla de arroz, con ozono, para producción de bioetanol. I Congreso Venezolano: Uso Racional y Eficiente de la Energía, Energías Renovables.
- Valadez G. J., García C. J., García Z. F., y Rodríguez V. L. 2011. Producción de biomasa y concentración de azúcares de dos variedades de sorgo dulce en la región Huasteca Tamaulipeca. INIFAP Tamaulipas. **11**(1), 58-70.
- Viñals V. M., García B A., Álvarez M. G. y Ramil M. 2012. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). (46)**1**, 7-16.
- Viveros R. I. P., López Z. L., Partida S. G. y Uscanga A. M. G. 2014. Maximization of glucose production using hydrogen peroxide as an alkaline pretreatment of sweet sorghum bagasse. 1st Biotechnology World Symposium Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. (4)**3**. ISSN 2249-1929.
- Zumalacárregui D. L. M., Ones P. O., Ramos R. P. A., De-Cárdenas Z. B. M. y Lombardi G. 2014. Potencialidades del bagazo para la obtención de etanol frente a la generación de electricidad. Ingeniería, Investigación y Tecnología. (13)**3**, 407-418. ISSN 1405-7743 FI-UNAM.