



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

---



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA**

## **Evaluación y optimización de pretratamientos para obtención de bioetanol a partir de aserrín de pino**

Tesis que presenta:

**I.B.Q. Juan Carlos Farías Sánchez**

Para Obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA**

Director de Tesis: Doctor en Ciencia de Recursos Silvícolas José Guadalupe  
Rutiaga Quiñones

Coasesor: Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología Javier López  
Miranda

Morelia, Michoacán. Agosto 2014

La presente investigación se realizó en el Instituto Tecnológico de Durango y en la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en el marco del Proyecto aprobado por CONACYT (166444) y que se desarrolla en colaboración con la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michocán.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más especial y sincero agradecimiento a mi director de tesis al Dr. José Guadalupe Rutiaga Quiñones, por aceptarme para realizar esta tesis de maestría bajo su dirección, por su apoyo y confianza en mi trabajo, por su paciencia y su calidad profesional para guiarme a lo largo de ésta investigación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Dr. Rafael Herrera Bucio, al Dr. Pablo López Albarrán y a la Dra. Lada Domratcheva Lvova por formar parte de mi mesa de tesis y por haber enriquecido el trabajo realizado.

Al Dr. Javier López Miranda, del Tecnológico de Durango, por su apoyo para realizar la estancia en la ciudad de Durango.

**Resumen.** Con el propósito de aprovechar un producto de desecho como es el aserrín de pino proveniente de un aserradero en Michoacán, México, se probaron cinco diferentes pretratamientos (Hidróxido de sodio, ácido sulfúrico, Explosión de vapor, organosolv y ácido nítrico) para la producción de azúcares reductores por medio de hidrólisis enzimática. Se encontró que el pretratamiento con HNO<sub>3</sub> al 6% y NaOH al 1% proporcionó mejores rendimientos que el hidróxido de sodio, ácido sulfúrico diluido, explosión de vapor y organosolv. Se optimizaron los rendimientos del HNO<sub>3</sub> por el método factorial. Los resultados muestran que la concentración óptima de azúcares reductores, con un valor de 35.42% después de un pretratamiento con 9.63% de HNO<sub>3</sub> a temperatura de 114.81°C seguido de 1% NaOH durante 30 minutos a 90°C, a un pH de 4.5, durante 132 horas con una carga enzimática de 25 UPF/g de carbohidratos totales. Se hizo una sacarificación y fermentación simultánea obteniendo como resultado una concentración de 27.39 g/L de etanol y un rendimiento teórico máximo de 73.61% a pH de 3.5, 150 revoluciones con  $1 \times 10^7$  Cel/mL de *Saccharomyces cerevisiae* y una carga enzimática de 25 UPF/g de carbohidratos totales. Con los resultados obtenidos de la literatura, se encuentra que es un procedimiento susceptible a ser usado para el aprovechamiento de este recurso.

**Palabras clave:** azúcares reductores, hidrólisis enzimática, aserrín de pino,

**Summary.** In order to take advantage of a waste product such as pine sawdust from a sawmill in Michoacan, Mexico, five different pretreatments (sodium hydroxide, sulfuric acid, steam explosion, organosolv and nitric acid) for the production of sugars were tested reducing by enzymatic hydrolysis. We found that pretreatment with HNO<sub>3</sub> to 6% and NaOH to 1% achieve better yields than sodium hydroxide, dilute sulfuric acid, steam explosion and organosolv. HNO<sub>3</sub> yields were optimized by factorial method. The results show that the optimum concentration of reducing sugar, with a value of 35.42% after pretreatment with 9.63% of HNO<sub>3</sub> solution at 114.81°C of temperature followed by 1 % NaOH for 30 minutes at 90°C, at a pH of 4.5, for 132 hours with an enzyme load of 25 FPU/g total carbohydrates. Simultaneous saccharification and fermentation one became resulting in a concentration of 27.39 g/L of ethanol and a maximum theoretical yield of 73.61% a pH of 3.5, 150 rpm with *Saccharomyces cerevisiae* 1X10<sup>7</sup> Cel/mL and enzyme load of 25 FPU/g total carbohydrate. With the results obtained from the literature, we find that is susceptible to being used for the exploitation of this resource.

**Keywords:** reducing sugars, enzymatic hydrolysis, pine sawdust

**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>1.-INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Clasificación de los Biocombustibles</b>	<b>2</b>
1.1.1 Combustibles de primera generación	2
1.1.2 Combustibles de segunda generación	3
1.1.3 Combustibles de tercera generación	4
1.1.4 Combustibles de cuarta generación	4
<b>1.2 Bioetanol en la actualidad</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Biocombustibles para el transporte</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Los residuos forestales</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Composición de la biomasa lignocelulósica</b>	<b>10</b>
1.5.1. Celulosa	10
1.5.2. Hemicelulosa	11
1.5.3. Lignina	12
<b>1.6 Hidrólisis de carbohidratos</b>	<b>13</b>
<b>1.7 Hidrólisis ácida</b>	<b>14</b>
<b>1.8 Furfurales</b>	<b>15</b>
<b>1.9 Fermentación alcohólica</b>	<b>16</b>
<b>1.10 Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica</b>	<b>17</b>
<b>1.11 Sacarificación y fermentación simultánea</b>	<b>18</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>20</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>22</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
<b>7.1 Materiales</b>	<b>23</b>
7.1.1 Material Lignocelulósico	23
7.1.2 Enzimas	23
7.1.3 Levadura	23
<b>7.2. Métodos.</b>	<b>23</b>
7.2.1 Caracterización de biomasa Inicial	23
7.2.1.1 Determinación del pH	25

7.2.1.2 Porcentaje de humedad	25
7.2.1.3 Contenido de cenizas	25
7.2.1.4 Cuantificación de sustancias extraíbles	25
7.2.1.5 Determinación lignina	26
7.2.1.6 Determinación de holocelulosa	26
7.2.1.7 Determinación de alfa celulosa	26
7.2.2. Azúcares reductores e hidrólisis enzimática	27
7.2.2.1 Determinación de azúcares reductores	27
7.2.2.2 Curva patrón de glucosa	27
7.2.2.3 Determinación de la actividad enzimática del extracto comercial.	28
7.2.2.4 Hidrólisis enzimática	28
7.2.3 Pretratamientos	29
7.2.3.1 Pretratamiento con hidróxido de sodio	29
7.2.3.2 Pretratamiento de hidrólisis ácida	29
7.2.3.3 Pretratamiento con explosión de vapor	29
7.2.3.4 Pretratamiento organosolv	30
7.2.3.5 Pretratamiento combinado	30
7.2.4 Selección del pretratamiento	30
7.2.5 Cinética de hidrólisis enzimática	31
7.2.6 Identificar las variables que influyan en el rendimiento de azucares reductores en la hidrolisis enzimática de aserrín de pino pretratada con ácido nítrico.	31
7.2.7 Identificar las condiciones que maximizan la producción de azúcares fermentados por sacarificación enzimática de aserrín pretratado con HNO <sub>3</sub> .	32
7.2.8 Obtener las condiciones óptimas para la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado con HNO <sub>3</sub>	32
7.2.9 Obtención de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas	32
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>34</b>
<b>8.1 Objetivo 1. Determinar la composición química del aserrín</b>	<b>34</b>
8.1.1 Determinación del pH	34
8.1.2 Porcentaje de humedad	34
8.1.3 Contenido de cenizas	35
8.1.4 Determinación de Sustancias Extraíbles	35
8.1.5 Determinación de lignina	36
8.1.6 Determinación de holocelulosa	36
8.1.7 Determinación de alfa celulosa	36
<b>8.2 Objetivo 2. Seleccionar los pretratamientos para la transformación del aserrín de pino en azúcares fermentables.</b>	<b>38</b>

<b>8.3 Objetivo 3. Identificar las variables que influyen en el rendimiento de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática de aserrín de pino pretratada con ácido nítrico.</b>	<b>42</b>
8.3.1 Análisis de resultados	43
<b>8.4 Objetivo 4. Identificar las condiciones que maximizan la producción de azúcares fermentados por sacarificación enzimática de aserrín pretratado con HNO<sub>3</sub>.</b>	<b>52</b>
<b>8.5 Objetivo 5. Obtener las condiciones óptimas para la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado con HNO<sub>3</sub>.</b>	<b>57</b>
8.5.1. Diagrama de flujo, composición química y balance de masa por etapas con el pretratamiento óptimo (9.63% de HNO <sub>3</sub> a 114.82°C).	61
8.5.1.2. Hidrólisis enzimática del pretratamiento combinado	64
8.5.1.3. Balance de materia global	65
<b>8.6 Objetivo 6. Sacarificación y fermentación simultánea.</b>	<b>67</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>72</b>
Anexos	84

**Índice de figuras y tablas**

Figura 1. Procesos generales para la obtención de bioetanol (Miliarium 2008). ....	2
Figura 2. Estructura de celulosa (Zhang and Lynd 2004).....	11
Figura 3. Estructura de hemicelulosa. ....	12
Figura 4. Estructura de lignina.....	13
Figura 5. Esquema característico del mecanismo de hidrólisis (Vázquez-Contreras 2003). ....	14
Figura 6. Rutas de formación del hidroximetilfurfural (HMF) y del furfural a partir de los monosacáridos (Shimizu et al. 1998).....	16
Figura 7. Estequiometría de la conversión de una hexosa en etanol y anhídrido carbónico.....	17
Figura 8. Ruta metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnas. ....	18
Figura 9. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa. ....	18
Figura 10. Diagrama de flujo que muestra el proceso de análisis para la determinación de la composición química del aserrín de pino. ....	25
Figura 11. Esquema de la experimentación planeada. ....	33
Figura 12. Curva patrón para determinar la cantidad de azúcares reductores con el método DNS.....	39
Figura 13. Gráfico de Azúcares (g/L) vs tiempo. ....	40
Figura 14. Gráfico de rendimientos por pretratamiento.....	41
Figura 15. Gráfico de medias para rendimiento por concentración.....	44
Figura 16. Gráfico de medias para rendimiento por tiempo.....	44
Figura 17. Gráfico de medias para rendimiento por temperatura.....	45
Figura 18. Gráfico de Interacciones concentración de HNO <sub>3</sub> vs tiempo.....	46
Figura 19. Gráfico de Interacciones tiempo vs concentración de HNO <sub>3</sub> .....	47
Figura 20. Gráfico de Interacciones concentración de HNO <sub>3</sub> vs temperatura. ....	47
Figura 21. Gráfico de Interacciones temperatura vs concentración de HNO <sub>3</sub> . ....	48
Figura 22. Gráfico de Interacciones tiempo vs temperatura.....	48
Figura 23. Gráfico de Interacciones temperatura vs tiempo.....	49
Figura 24. Gráfico comparativo de peso en pretratamientos.....	49

Figura 25. Gráfico de rendimientos de azúcares en hidrolisis por cada pretratamiento. ....	50
Figura 26. Gráfico de rendimientos totales por cada pretratamiento. ....	51
Figura 27. Gráfico de medias para rendimiento de azúcares totales por temperatura. ....	54
Figura 28. Gráfico de medias para rendimiento de azúcares totales por concentración de HNO <sub>3</sub> . ....	54
Figura 29. Gráfico de rendimientos totales por cada pretratamiento utilizado. ....	56
Figura 30. Gráfico de superficie de respuesta de concentración de azúcares de sacarificación enzimática a partir de diversas concentraciones de ácido nítrico contra temperaturas. ....	56
Figura 31. Gráfico de efectos principales para azúcares azúcares vs temperatura y azúcares vs [HNO <sub>3</sub> ]. ....	59
Figura 32. Gráfico de interacciones para azúcares, temperatura y [HNO <sub>3</sub> ]. ....	59
Figura 33. Gráfico de superficie de respuesta estimada para azúcares con temperatura vs [HNO <sub>3</sub> ]. ....	60
Figura 34. Diagrama de flujo, composición química y balance de masa del pretratamiento combinado. ....	63
Figura 35. Diagrama de flujo, composición química y balance de masa de la hidrolisis enzimática. ....	64
Figura 36. Diagrama de flujo, composición química y balance de masa global del pretratamiento óptimo y su hidrólisis. ....	66
Figura 37. Gráfico de proceso de sacarificación y fermentación simultánea. ....	67
Figura 38. Rendimiento teórico máximo de etanol en base al análisis químico del pretratado. ....	68

Tabla 1. Rendimiento de etanol ideal según Pasteur.....	17
Tabla 2. Diluciones para la curva patrón de glucosa.....	27
Tabla 3. Tabla resumen de condiciones de operación para los pretratamientos usados para el estudio. ....	31
Tabla 4. pH.....	34
Tabla 5. Porcentaje de humedad. ....	34
Tabla 6. Porcentaje de cenizas. ....	35
Tabla 7. Sustancias extraíbles. ....	35
Tabla 8. Determinación de lignina. ....	36
Tabla 9. Determinación de holocelulosa. ....	36
Tabla 10. Determinación de alfa celulosa. ....	36
Tabla 11. Resultados de diluciones para la curva patrón de glucosa.....	38
Tabla 12. Rendimiento de pretratamientos y patrones.....	39
Tabla 13. Análisis de Varianza para pretratamientos.....	39
Tabla 14. Pretratamientos usados con sus respectivos resultados.....	42
Tabla 15. Análisis de Varianza para [Azúcares] - Suma de Cuadrados Tipo III. ...	43
Tabla 16. Pruebas de Múltiple Rangos para [Azúcares] por [HNO <sub>3</sub> ]. ....	45
Tabla 17. Pruebas de Múltiple Rangos para [Azúcares] por Tiempo. ....	45
Tabla 18. Pruebas de Múltiple Rangos para [Azúcares] por Temperatura.....	46
Tabla 19. Matriz de diseño y resultados obtenidos (3 <sup>2</sup> ).....	52
Tabla 20. Análisis de Varianza para [Azúcares totales] - Suma de Cuadrados Tipo III. ....	53
Tabla 21. Pruebas de Múltiple Rangos para [Azúcares totales] por [HNO <sub>3</sub> ]......	55
Tabla 22. Pruebas de Múltiple Rangos para [Azúcares totales] por Temperatura. ....	55
Tabla 23. Tabla de condiciones de los pretratamientos usados y resultados de la optimización. ....	57
Tabla 24. Análisis de Varianza para [Azúcares reductores]. ....	58
Tabla 25. Optimización de azúcares. ....	58

## 1.-INTRODUCCIÓN

El alcohol etílico o etanol es un producto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales, tales como cereales, remolacha, caña de azúcar, sorgo o biomasa. Estos azúcares están combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa. Las plantas crecen gracias al proceso de fotosíntesis, en el que la luz del sol, el dióxido de carbono de la atmósfera, el agua y los nutrientes de la tierra forman moléculas orgánicas complejas como el azúcar, los hidratos de carbono y la celulosa, que se concentra en la parte fibrosa la planta.

El bioetanol se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas. En este proceso se obtiene el alcohol hidratado, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidratado se puede utilizar como combustible (Guerra 2008).

Los materiales lignocelulósicos son los que ofrecen un mayor potencial para la producción de bioetanol, el uso de residuos de procesos agrícolas, forestales o industriales, con alto contenido en biomasa son ideales. Estos residuos pueden ir desde la paja de cereal a las "limpias" forestales, pasando por los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) o las cáscaras de cereal o de arroz. Los residuos tienen la ventaja de su bajo coste, los cuales son la parte no necesaria de otros productos o procesos, salvo cuando son utilizados en la alimentación del ganado (Mc Cabe et al. 2011).

Los residuos de biomasa contienen mezclas complejas de carbohidratos, llamados celulosa y hemicelulosa, además de lignina. Para obtener los azúcares de la biomasa, ésta es tratada con ácidos o enzimas que facilitan su obtención. La celulosa y hemicelulosa son hidrolizadas por enzimas o ácidos diluidos para obtener glucosa, que es entonces fermentada. Los principales métodos para extraer estos azúcares son tres: la hidrólisis con ácidos concentrados, la hidrólisis con ácidos diluidos y la hidrólisis enzimática (Miliarium 2008).

En la figura 1 se muestra las diferencias entre los procesos de obtención de bioetanol, según sea su materia prima de origen.

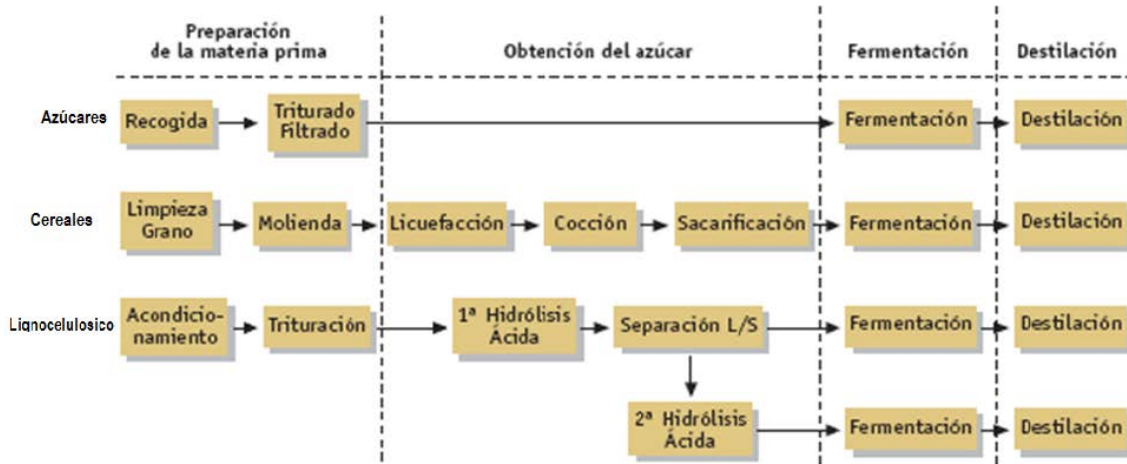


Figura 1. Procesos generales para la obtención de bioetanol (Miliarium 2008).

## 1.1 Clasificación de los Biocombustibles

Existen varios tipos de biocombustibles, a los cuales se les clasifica de acuerdo al insumo o materia prima y a la tecnología empleada para producirlos. Debido a los avances en la tecnología, esta clasificación se realiza por generaciones (Álvarez 2009).

### 1.1.1 Combustibles de primera generación

Algunos de los insumos para la producción de combustibles de primera generación 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 semilla de girasol, aceite de soya, aceite de palma, aceite de ricino, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de maní o cacahuate, entre otros. También se emplean como insumos a las grasas animales, grasas y aceites de desecho provenientes

de la cocción y elaboración de alimentos y desperdicios sólidos orgánicos (Álvarez 2009).

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 (mezcla de metano y anhídrido carbónico, también conocidos como gas natural y dióxido de carbono respectivamente, obtenida a partir de los desperdicios orgánicos). 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 (Álvarez 2009).

### **1.1.2 Combustibles de segunda generación**

Son producidos a partir de 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. Los procesos de producción tienen un nivel de complejidad más alto que los de primera generación, y como ejemplos destacan la sacarificación y- fermentación simultáneas y el proceso Fischer-Tropsch (Álvarez 2009). Este último proceso también recibe los nombres de proceso GTL y proceso BTL, cuyas siglas en inglés provienen de "Gas-To-Liquids" y "Biomass-To-Liquids" respectivamente, los cuales consisten en la gasificación del carbón y de la materia lignocelulósica de la biomasa, para después sintetizar algún combustible líquido como el etanol. Mediante los procesos de segunda generación se fabrica etanol, metanol, gas de síntesis (mezcla de monóxido de carbono, e hidrógeno), biodiesel, y 2.5-dimetilfurano (DMF), entre otros. La ventaja principal en la producción de estos biocombustibles es que no se usan en la alimentación del hombre, pero su

desventaja es la poca ganancia en la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero durante el procesamiento de los insumos, respecto a los biocombustibles de primera generación (Cuzens and Farone 1996).

### **1.1.3 Combustibles de tercera generación**

Para estos combustibles se utilizan insumos vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina "cultivos energéticos". Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verde azules. Los procesos de obtención de biocombustibles se encuentran en fase de desarrollo, sin embargo, se ha logrado producir biodiesel y etanol a nivel planta piloto. Las ventajas de estos biocombustibles son el secuestro de anhídrido carbónico ( $\text{CO}_2$ ) para la producción de los insumos y un balance positivo en la emisión de gases de efecto invernadero, pero su desventaja, con excepción de las algas verdes, es la utilización de tierras de cultivo que pueden ser usadas en la producción de alimentos para el hombre (Atev et al. 1987).

### **1.1.4 Combustibles de cuarta generación**

Los biocombustibles de cuarta generación son producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean anhídrido carbónico ( $\text{CO}_2$ ) o alguna otra fuente de carbono para la obtención de los biocombustibles. A diferencia de las generaciones anteriores, en las que también se pueden emplear bacterias y organismos genéticamente modificados como insumo o para realizar alguna parte de los procesos, en la cuarta generación, la bacteria es la que efectúa la totalidad del proceso de producción de los biocombustibles.

Actualmente esta generación de biocombustibles se encuentra en fase teórica, sólo se conoce la posible ruta de síntesis del etanol a partir de anhídrido carbónico, sin embargo, depende totalmente de la información genética de una bacteria artificial y puede tener limitaciones termodinámicas importantes (Álvarez 2009).

## **1.2 Bioetanol en la actualidad**

Dada la disminución de las reservas de materias orgánicas fósiles, en los últimos años en todo el mundo se dedica mucha atención al tratamiento químico y biotecnológico de la biomasa vegetal de madera y plantas agrícolas. La biomasa vegetal (fitomasa) se forma como resultado de la actividad fotosintética de las plantas. A diferencia de las fuentes fósiles, las reservas de fitomasa se renuevan como resultado de la actividad de las plantas superiores. Cada año en el planeta se forman cerca de 200 millones de toneladas de biomasa vegetal celulósica. La biosíntesis de la celulosa es la mayor de las síntesis en el pasado, presente y futuro. En este siglo los principales tipos de materiales orgánicos serán la madera, las plantas agrícolas y el carbón de piedra que a su vez es de origen vegetal. Por una valoración aproximada, las reservas conocidas de petróleo son prácticamente iguales a las de la madera en nuestro planeta, sin embargo, los recursos petroleros se agotan, al tiempo que los de maderas, como resultado del crecimiento natural, se elevan (Jolkin 1989).

En un futuro no lejano, nos espera el paso de la producción petroquímica a la elaboración química y bioquímica de la madera y otros materiales vegetales. Por otro lado, entre los problemas más acuciantes que enfrenta la humanidad en el momento actual, ocupan un lugar prominente la explosión demográfica, con su incidencia cada vez mayor en la producción alimentaria y la crisis energética mundial, con la perspectiva sombría del agotamiento no lejano del combustible fósil. La biomasa forestal que se origina en el proceso de aserrado de la madera (fundamentalmente aserrín), constituye un material lignocelulósico que por su naturaleza química puede compararse con la del bagazo de caña y otros derivados de ésta, cuya utilización en nuestro país ya constituye una industria. Por cuanto un obstáculo para la sustentabilidad de los bosques y las industrias forestales, lo constituye el nivel de desechos en el bosque mismo como en las

plantas procesadoras de madera, en el año de 1990, bajo la dirección de la Organización Internacional de las Maderas Tropicales, se estableció un proyecto para evaluar el nivel de desechos y recomendar formas de reducirlos (Noack 1995).

### **1.3 Biocombustibles para el transporte**

El origen del uso de los biocombustibles para el transporte se remonta a los inicios del transporte motorizado. Fue el inventor norteamericano Samuel Morey el primero que utilizó alrededor del año 1820 una mezcla de etanol y trementina en motores de combustión interna. Más tarde, en el mismo siglo XIX, el ingeniero alemán Nicholas Otto desarrolló el primer motor de combustión interna que funcionaba con etanol (Pérez-Jiménez 2014) y el industrial estadounidense Henry Ford fabricó el primer automóvil de cuatro tiempos movido por etanol puro. Años más tarde, también Henry Ford, diseñó el Modelo T apto para funcionar con etanol puro, con gasolina o con una mezcla de los dos (Solomon 2007).

En la primera parte del siglo XX, cuando los suministros de petróleo en Europa empezaron a escasear, se comenzó a producir bioetanol combustible a gran escala. Después de la Segunda Guerra Mundial, los precios del petróleo disminuyeron y ello causó un descenso en el uso de biocombustibles. El uso limitado del bioetanol continuó hasta la crisis del petróleo que tuvo lugar en los años 70's y en 1973, la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP) limitó el suministro de petróleo aumentando los precios. Dicha acción de la OPEP evidenció la gran dependencia de los países del petróleo extranjero, lo que promovió un nuevo cambio hacia el uso de los combustibles alternativos (Pejó and Elía 2010).

El etanol se usa en mezclas con la gasolina en concentraciones del 5 o el 10%, E5 y E10 respectivamente, que no requieren modificaciones en los motores actuales. Un obstáculo importante es la legislación europea sobre la volatilidad de las gasolinas que fija la proporción de etanol en mezclas E5. Concentraciones más elevadas, autorizadas en Suecia y Estados Unidos, implica que se debe disponer de un vehículo flexible (FFV), con un depósito, motor y sistema de combustible

único capaz de funcionar con gasolina y etanol, solos o mezclados en cualquier proporción (Álvarez et al. 2013).

Al año 2011, México no produce etanol anhidro para combustible, a pesar de que el potencial técnico a partir de caña y grano de sorgo.

Las especificaciones para la utilización de bioetanol se compendian en la norma Europea de Gasolinas EN 228; en España se encuentra transpuesta la Directiva 2003/17/CE relativa a la calidad de las gasolinas y gasóleo, en el Real Decreto R.D. 61/2006 de las especificaciones y uso de biocarburantes (Miliarium 2008).

#### **1.4 Los residuos forestales**

Los residuos forestales, sobre todo el aserrín y cortezas, son altamente contaminantes para el medio ambiente. No son pocos los expertos y las instituciones a nivel global y local, incluida la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) que, de un tiempo a la fecha, advierten sobre el impacto del aserrín y corteza como agentes contaminantes del suelo y del agua([www.juventudrebelde.cu](http://www.juventudrebelde.cu)).

En México, la industria del aserrío genera alrededor de 0.35 m<sup>3</sup> de aserrín de pino por m<sup>3</sup> de madera (SEMARNAP 2000), lo cual representa en promedio 206,000 m<sup>3</sup> al año (INEGI 2008). Considerando que su densidad promedio es de 500 kg/m<sup>3</sup>, esta producción equivale a 103,000 ton anuales (Valencia and López 1999).

El aserrín y la corteza es un producto altamente estable con escasas alternativas de uso; su acumulación constituye un serio problema de contaminación en los suelos en que se deposita, el cual todavía se acumula en los patios de los aserraderos o son vertidos en los alrededores de comunidades rurales, con el consecuente perjuicio para todos. Téngase en cuenta además que la degradación natural de los residuos de la industria maderera es casi nula (Canché-Escamilla et al. 2005).

Pero hay más por lo que preocuparse. Estos subproductos reducen el espacio disponible en los centros de elaboración de la madera y con ello la movilidad necesaria para la producción; generan y acumulan polvo en el aire, que conlleva

otro mal, el de la emisión de dióxido de carbono a la atmósfera, y perjudican la salud de los trabajadores y de los habitantes de zonas cercanas a los aserraderos causando enfermedades como asma, bronquitis crónica y otros problemas respiratorios asociados con alergias (Malmström\*, Savolainen and Terho 1999); también puede causar dermatitis, cánceres pulmonares, gastrointestinales y nasales (Texas 2004), a la vez que suponen otros problemas ambientales por incendios y autocombustión.

También el acumulado en el bosque o en los aserraderos constituye un depósito y un foco para la propagación de hongos (especialmente de los géneros *Fomes*, *Schizophyllum* y *Polyporus*, entre otros) que provocan la podredumbre de árboles moribundos o muertos con un contenido de humedad relativamente alto. Los residuos pueden ser un medio ideal para la propagación de plagas y enfermedades.

La cuestión del uso de los desechos madereros es muy compleja, sobre todo en los países en desarrollo, y depende de consideraciones económicas y de medios de transporte.

En la comunidad de San Juan Nuevo en el estado de Michoacán, existe un aserradero de gran capacidad en el cual se pretende usar el aserrín de este para la obtención del bioetanol de pino.

La madera de pino es la más empleada, pues arboles de este género *Pinus* constituyen la mayor formación boscosa en el área; el aserrín y corteza tradicionalmente se han usado en la combustión como alternativa para reducir su acumulación, pero su quema, además de ser ilegal, contribuye a la emisión a la atmósfera de más de 200 compuestos orgánicos potencialmente peligrosos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que son potencialmente mutagénicos y carcinogénicos (Ramdahl and Becher 1982).

Por otra parte, tanto el aserrín como los demás desperdicios de la explotación de las maderas coníferas pueden ser utilizados como materia prima para la producción de etanol combustible y otros químicos (Palonen et al. 2004) por ser

los materiales lignocelulósicos dominantes en el hemisferio norte (Galbe and Zacchi 2002).

A partir de 103,000 toneladas de aserrín se podría obtener alrededor de 33 millones de litros de etanol combustible. No obstante, la mayor limitante para la producción de etanol combustible a partir de aserrín es la recuperación de los azúcares que contiene y ésta a su vez está determinada por el procedimiento de hidrólisis que se utilice (ácido o enzimático). El procedimiento enzimático está limitado por la presencia de lignina y la cristalinidad de la celulosa (Millett, Baker and Satter 1976, Marten et al. 1996, Åkerholm and Salmén 2001, Akerholm and Salmén 2002, McLean et al. 2002, Schell et al. 2003), por ello se han venido utilizando diversos procedimientos de pretratamiento, entre los que destacan el alcalino, el ácido, la explosión con vapor y otros como la explosión de vapor con amoníaco y organosolv (Marten et al. 1996, Åkerholm and Salmén 2001, Akerholm and Salmén 2002). Cada uno produce cambios particulares en las materias primas; así, el pretratamiento con ácido diluido hidroliza principalmente a las hemicelulosas, dejando una estructura porosa formada principalmente por celulosa y lignina, la cual es más accesible a la acción de las enzimas (Wyman 1994). La explosión con vapor rompe la estructura del material y aumenta la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático (Shimizu 1991, Gregg and Saddler 1996), el pretratamiento con hidróxido de sodio (NaOH) rompe los enlaces lignina-carbohidrato, retira parte de la lignina y de las hemicelulosas, abre las estructuras del material, incrementa el área interfacial y reduce el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, favoreciendo su sacarificación enzimática (Tuor, Winterhalter and Fiechter 1995), la explosión de vapor con amoníaco es eficiente para sustratos con poca lignina, logrando hasta el 90% de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, no se producen inhibidores ni se requiere que el material lignocelulosico sea triturado (Holtzapple et al. 1991), el proceso organosolv es usado para romper los enlaces lignina hemicelulosa (Thring, Chornet and Overend 1990). La biomasa lignocelulósica deberá ser pretratada para elevar los rendimientos; no obstante, este es uno de los pasos más costosos,

de manera que deberá prestársele particular atención a fin de ganar ventaja de esta operación (Wyman et al. 2005). Encontraron que es posible producir cambios muy similares en la composición química del sustrato lignocelulósico durante el pretratamiento, utilizando diferentes combinaciones de las principales variables de operación (temperatura, tiempo y concentración) (Martínez et al. 1997). Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo identificar y optimizar las condiciones de pretratamiento e hidrólisis enzimática del aserrín de pino, con el propósito de utilizar un material considerado un contaminante potencialmente riesgoso, como materia prima para la obtención de azúcares fermentables susceptibles de ser utilizados en la producción de etanol combustible.

### **1.5 Composición de la biomasa lignocelulósica**

La biomasa lignocelulósica está formada básicamente por tres componentes principales (celulosa, hemicelulosa y lignina) junto con otros componentes minoritarios que no forman parte de la pared celular como son los extractivos y las cenizas. La celulosa y hemicelulosa son polisacáridos de alto peso molecular que representan entre el 60-80% del total del peso de los materiales lignocelulósicos. La lignina es un polímero no polisacárido tridimensional de unidades fenilpropano y representa entre el 20-35% del total (Fengel and Wegener 1983).

#### **1.5.1. Celulosa**

La celulosa es la macromolécula más abundante de la Tierra y su producción anual se ha estimado en  $10^{11}$  toneladas (Brown 2004). Este biopolímero es sintetizado por una gran cantidad de organismos vivos y, aunque la mayor parte de la celulosa procesada para la producción industrial proviene de plantas, algunas bacterias, cianobacterias, hongos y algas verdes también son capaces de sintetizarla (Nobles, Romanovicz and Brown 2001, Zogaj et al. 2001).

La celulosa es un polímero lineal de monómeros de D-glucosa (figura 2) que se unen por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) y cuyo peso molecular medio es de 100.000 Unidades (McKendry 2002), se sintetiza en la naturaleza como moléculas individuales de D-

glucosa que se van ensamblando en el mismo lugar en el que se producen. Las moléculas de celulosa se unen formando moléculas más largas conocidas como protofibrillas que se empaquetan en unidades mayores denominadas microfibrillas. Las estructuras fibrilares están estabilizadas lateralmente por puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo intra e intermoleculares y todos los átomos de carbono están fijados en una posición concreta (Zhang and Lynd 2004).

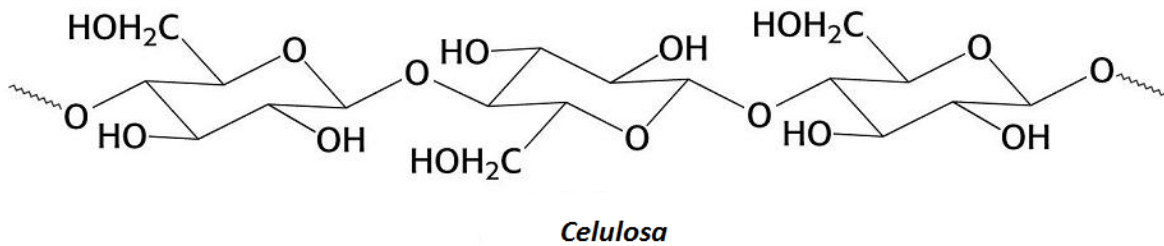


Figura 2. Estructura de celulosa (Zhang and Lynd 2004).

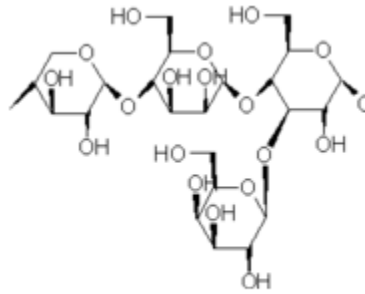
### 1.5.2. Hemicelulosa

Junto con la celulosa, la hemicelulosa está también presente en la pared celular de las plantas. Consta de polímeros formados por más de un tipo de azúcares tales como la D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, D-xilulosa, etc, y por varios ácidos urónicos (figura 3), como el ácido glucurónico y galacturónico. Su función principal es proporcionar la unión entre la celulosa y la lignina (Sun et al. 1998).

Generalmente está constituida por una cadena principal que puede consistir en una única unidad (homopolímero) p. ej. xilanos, o estar formada por dos o más unidades (heteropolímero). De forma general, en función del azúcar dominante en la cadena principal, se pueden agrupar en: xilanos, mananos, glucanos y galactanos (Fengel and Wegener 1983). Dichas cadenas, a diferencia de la celulosa, pueden presentar ramificaciones y sustituciones mediante enlaces covalentes.

Existen diferencias en la composición y estructura de las hemicelulosas entre los diferentes tipos de biomásas. En las maderas latifoliadas el xilano es el polímero

más abundante, está altamente sustituido por grupos acetilos y puede representar hasta un 30% del peso total (Dahlman, Jacobs and Sjöberg 2003, Fengel and Wegener 1983). Por el contrario, el polímero más abundante en las hemicelulosas de las maderas coníferas es el galactoglucomanano y presenta mayor cantidad de unidades de manosa y galactosa que las maderas duras (Dahlman et al. 2003).



**Hemicelulosa**

Figura 3. Estructura de hemicelulosa (Sun et al. 1998).

### 1.5.3. Lignina

La lignina es el tercer componente mayoritario en los materiales lignocelulósicos (figura 4), es por ello el tercer polímero natural más abundante en la naturaleza tras la celulosa y hemicelulosa (Buranov and Mazza 2008). Es un polímero tridimensional amorfo cuyos monómeros básicos, llamados alcoholes cinamílicos, son: el alcohol *p*-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Higuchi 1990). Estos tres alcoholes aromáticos dan lugar a unidades *p*-hidroxifenilo (H), unidades guayacilo (G), y unidades siringilo (S) respectivamente, cuya proporción también varía en las maderas duras, maderas blandas y biomasa herbácea (Evers, O'Brien and Blakeney 1999, Fengel and Wegener 1983). El contenido en lignina, al igual que en el caso de las hemicelulosas, difiere entre los diferentes materiales lignocelulósicos.

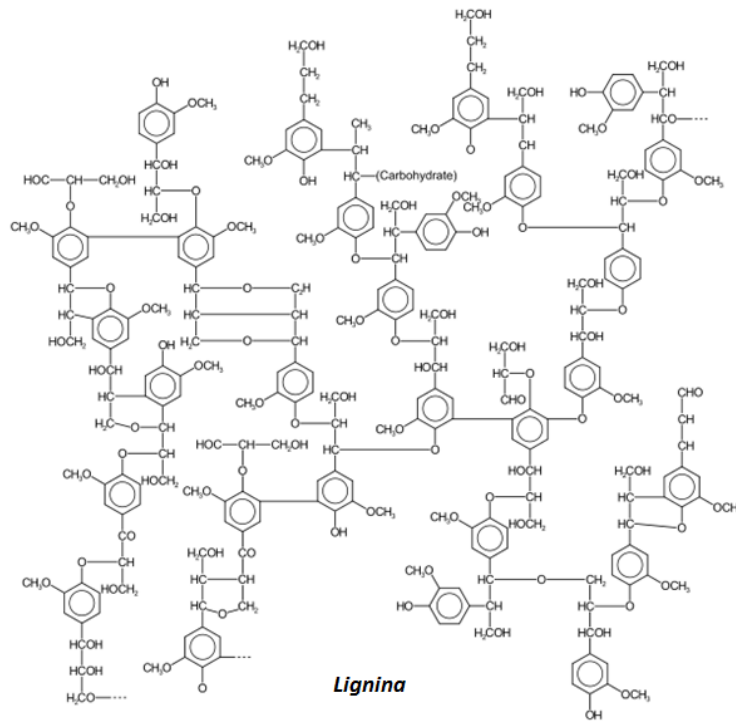


Figura 4. Estructura de lignina (Glazer and Nikaido 2007).

### 1.6 Hidrólisis de carbohidratos

La hidrólisis es una reacción química, catalizada por enzimas o por compuestos químicos, como el ácido sulfúrico, que tiene como objetivo convertir a los polisacáridos complejos en moléculas de azúcares simples como se observa en la figura 5. La hidrólisis del enlace glucosídico ocurre cuando una molécula de agua se disocia y el hidrógeno liberado del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar y el OH se une al carbono libre del otro residuo de azúcar. El resultado de esta reacción, es la liberación de monosacáridos y/o oligosacáridos de menor peso molecular si se trata de un polisacárido complejo (Vázquez-Contreras 2003).

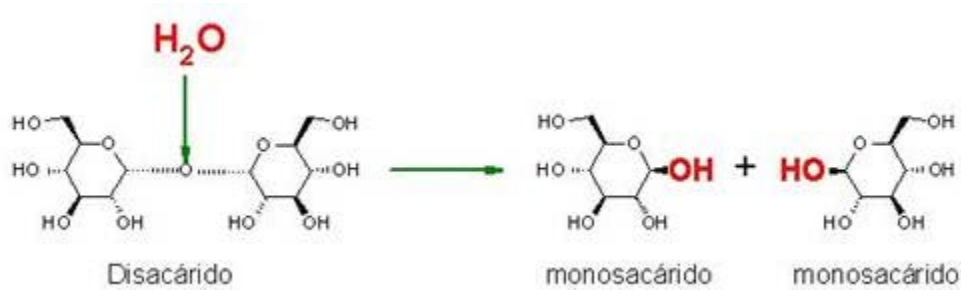


Figura 5. Esquema característico del mecanismo de hidrólisis (Vázquez-Contreras 2003).

### 1.7 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida a altas temperaturas y bajas concentraciones de ácido es la forma más vieja de convertir biomasa en azúcares fermentables a etanol. En general, existen dos vertientes tecnológicas en lo que se refiere a la hidrólisis ácida: la hidrólisis ácida a bajas concentraciones de ácido y a elevadas temperaturas y la hidrólisis ácida a concentraciones elevadas de ácido y temperaturas bajas (Sheehan and Himmel 1999). La hidrólisis con ácidos concentrados normalmente es más utilizada como un procedimiento analítico para la determinación cuantitativa de los azúcares recuperables en los materiales (Ucar and Balaban 2003).

El problema general de la hidrólisis ácida es la destrucción de los azúcares y la formación de productos indeseables durante la reacción (Bu'lock and Kristiansen 1991). Estas condiciones favorecen la degradación de los azúcares a furfurales, los cuales son perjudiciales para el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación, haciendo necesario efectuar un procedimiento de neutralización y detoxificación adecuados (Ranatunga et al. 2000).

Los rendimientos de azúcar obtenidos (55% a 60% m/m) son bajos, de manera que, para que estos procesos sean económicamente viables se requieren de rendimientos mayores al 70% (Torget, Kim and Lee 2000). La hidrólisis con ácido diluido produce mejores rendimientos de azúcar, lográndose alcanzar el 70% deseado, sin embargo, éste procedimiento produce hidrolizados con bajas

concentraciones de azúcar, ocasionando problemas de recuperación del producto (Sheehan and Himmel 1999).

El proceso de hidrólisis ácida a baja temperatura y baja presión que utiliza dos operaciones diferentes para convertir a la celulosa y hemicelulosa presentes en los residuos agrícolas en azúcares fermentables, ya ha sido probado en el rastrojo de maíz por la Universidad Estatal de Mississippi. La conversión y recuperación de los azúcares contenidos en la celulosa y la hemicelulosa alcanza un rendimiento de alrededor de un 90%. Las concentraciones de azúcares en el producto son de alrededor de 100 g/L de glucosa y 100 g/L de xilosa, mientras que algunos productos secundarios como el furfural y el hidroximetil furfural se mantienen por debajo de 0.05 g/L en el producto.

Investigaciones posteriores han demostrado que las temperaturas elevadas de hidrólisis reducen tanto la cantidad de ácido consumida como el tiempo de proceso. Además, en estas condiciones se reduce la corrosión del equipo, pudiéndose utilizar para su construcción acero inoxidable estándar. Éste, proceso es muy amigable con el ambiente, debido a que los residuos generados contienen un contenido muy bajo de ácido, con rendimientos de hasta 61% con respecto a la celulosa pura (Ojumu and Ogunkunle 2005).

## **1.8 Furfurales**

Si el tiempo de hidrólisis es muy corto pueden producirse oligosacáridos en lugar de monosacáridos (siendo la celobiosa uno de los principales), sin embargo, si la reacción se lleva a cabo a temperaturas altas y tiempos largos, pueden presentarse reacciones secundarias de degradación de los monosacáridos, siendo las pentosas las que presentan una mayor velocidad de degradación (Saeman 1945). La deshidrogenación de la glucosa produce 5-(hidroximetil)-furfural, el cual a su vez da lugar a ácido levulinico y al ácido formico y la deshidrogenación de las pentosas produce furfural (Taherzadeh et al. 1997). Las rutas de reacción para la formación de los furfurales se muestran en la figura 6 (Shimizu et al. 1998).

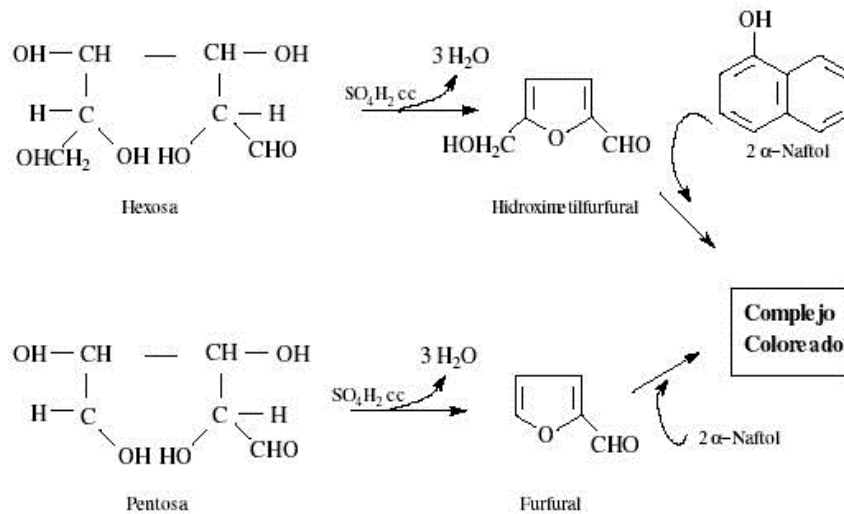
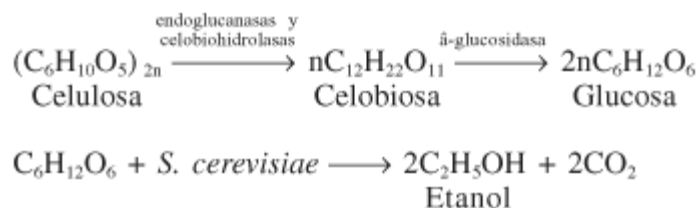


Figura 6. Rutas de formación del hidroximetil-furfural (HMF) y del furfural a partir de los monosacáridos (Shimizu et al. 1998).

### 1.9 Fermentación alcohólica

Se puede definir como una serie de reacciones químicas llevadas a cabo por microorganismos en condiciones de anaerobiosis para la conversión de azúcar en alcohol y dióxido de carbono. El mecanismo de la fermentación fue cuantificado por primera vez por Gay-Lussac (figura 7), basándose en la estequiometría de la



conversión de una hexosa en etanol y anhídrido carbónico, el rendimiento teórico obtenido es de 51.1 kilogramos de etanol + 48.9 kilogramos de carbónico por 100 kilogramos de hexosa (Bu'lock and Kristiansen 1987).

Figura 7. Estequiometría de la conversión de una hexosa en etanol y anhídrido carbónico.

Este rendimiento se denomina coeficiente de Gay-Lussac y representa el dato básico para el cálculo de la eficiencia de conversión. Posteriormente Pasteur determinó experimentalmente que solo es posible alcanzar el 94.1.9% del rendimiento teórico (Bu'lock and Kristiansen 1987) esto es el 48.39 kg de etanol/100 Kg de hexosa o 61.31 L de etanol absoluto/100Kg de hexosa fermentada (Tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento de etanol ideal según Pasteur.

Etanol	48.4
Anhídrido carbónico	46.6
Glicerol	3.3
Ácido succínico	0.6
Materia Celular	1.2
Total	100

### 1.10 Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica

Se cree que hace más de 10,000 años se descubrió por accidente que si se dejaban algunos granos de cereales en el agua durante un tiempo, el agua tomaba un sabor distinto, de esta manera se cree que se descubrieron las fermentaciones alcohólicas. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido el organismo más utilizado para llevar a cabo las fermentaciones alcohólicas, debido a su facilidad para metabolizar la glucosa y la fructosa (Barnett, Payne and Yarrow 1990). La levadura produce 2 moles de ATP por mol de glucosa mediante la ruta metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnas (Figura 9).



Figura 8. Ruta metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnas.

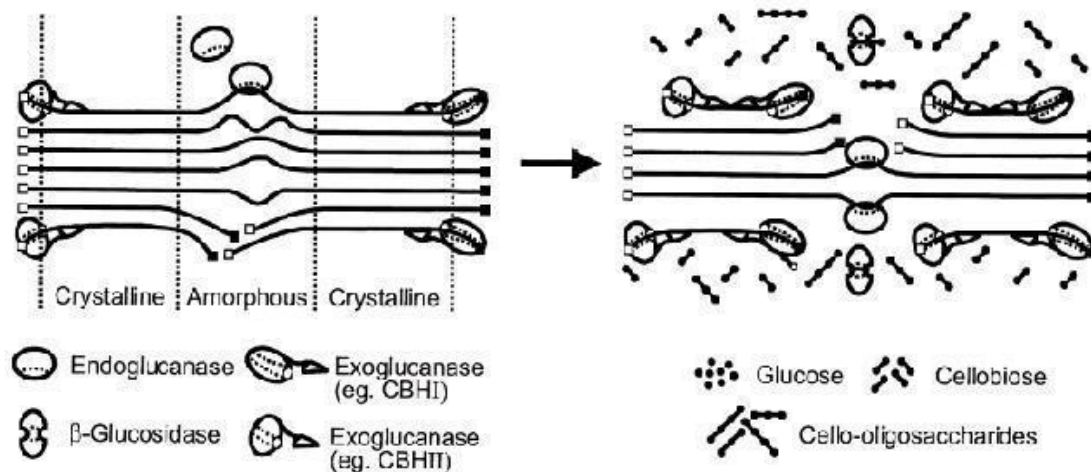


Figura 9. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa.

### 1.11 Sacarificación y fermentación simultánea

En los procesos en una etapa la hidrólisis y fermentación se realizan en el mismo reactor. La principal ventaja de estos procesos, es que se reduce la inhibición por producto final que se produce en la operación en dos etapas HFS, ya que la presencia de microorganismos fermentadores, junto con los enzimas celulolíticos reducen la acumulación de azúcar en el fermentador. Por ello se consiguen mayores tasas de hidrólisis que en el proceso de hidrólisis y fermentación por separado, necesitándose una menor cantidad de enzimas y obteniéndose como resultado un aumento de los rendimientos de etanol (Ballesteros 2001).

Otra ventaja es que se realiza en un mismo reactor con lo cual se reducen los costes de inversión. La principal desventaja de este proceso es las diferentes condiciones óptimas de pH y temperatura de la etapa de hidrólisis y fermentación. Por ello es necesario realizar el proceso en unas condiciones que sean compatibles con ambas etapas. Puesto que la temperatura óptima de hidrólisis está próxima a los 50 °C y que las levaduras productoras de etanol convencionales trabajan en torno a los 37 °C, es aconsejable la utilización de microorganismos termotolerantes cuando se quieran realizar procesos de obtención de etanol en una sola etapa; En términos productivos, el tiempo de operación es mucho menor (50% menos) que la HFS, ya que la etapa de hidrólisis y de fermentación toman, por separado, 6 días, lo que se reduce a 3 días, en el caso de la SFS. Las altas concentraciones de bioetanol que pueden estar presentes en el medio, evitan la presencia de otros MO contaminantes (Tomas-Pejo, Oliva and Ballesteros 2008), lo que contribuye al rendimiento final de bioetanol.

Los procesos en una etapa se pueden dividir en dos grupos: procesos en los que el mismo microorganismo produce los enzimas y realiza la fermentación, proceso conocido como conversión directa por el microorganismo (CDM); y procesos sacarificación y fermentación simultánea (SFS), en los que se emplean celulasas provenientes de un microorganismo celulolítico (normalmente un hongo), junto con la presencia de un microorganismo productor de etanol.

En los procesos CDM se pueden emplear monocultivos, en los que un único microorganismo hidroliza y fermenta los azúcares a etanol. Se han empleado bacterias del género *Clostridium* (Zeikus 1980, Ng, Ben-Bassat and Zeikus 1981, Ahring et al. 1996, Lynd 1996). Los rendimientos en etanol son bajos debido a la formación de subproductos, a la baja tolerancia del microorganismo al etanol y al crecimiento limitado del microorganismo en los hidrolizados debido a la existencia de productos tóxicos. También pueden emplearse cocultivos, en los que se utilizan dos microorganismos. Uno de ellos realiza la hidrólisis de la celulosa (*Clostridium*

*thermocellum*) y una bacteria etanológica fermenta los azúcares producidos (Ben-Bassat et al. 1983). En la actualidad el proceso de SFS es el que ofrece las mejores expectativas. Las celulasas provienen de hongos celulolíticos, normalmente *Trichoderma reesei*, y el microorganismo fermentador es una levadura.

## **2. ANTECEDENTES**

Existen varias investigaciones sobre el tema pero están relacionadas y enfocadas para obtener etanol a partir de fermentación de azúcares como caña de azúcar y granos comestibles que son los más ampliamente difundidos y conocidos desde la antigüedad, pero estos compiten con el consumo humano encareciendo el grano y por lo tanto también la alimentación humana.

El empleo de los biocombustibles data desde hace varias décadas a nivel internacional, pues fueron los combustibles de los primeros motores; sin embargo, su uso se abandonó con la aparición de las gasolinas. Actualmente, se emplean como oxigenantes de las gasolinas o como sustitutos de éstas (Bravo 2007), en México ha comenzado el desarrollo en la producción de biocombustibles, aunque los proyectos que en la actualidad existen en la materia son pocos y a pequeña escala, es decir, sólo para satisfacer necesidades de autoconsumo de algunas empresas y procesos locales; lo que representa una desventaja ante países como Brasil, quien lleva más de treinta años aplicando una política de bioenergía tendiente a lograr la seguridad energética, emprendiendo acciones para el fomento de investigación, tecnología y operación ([www.infocana.gob.mx](http://www.infocana.gob.mx)).

En México, sólo 9.5% de la oferta total de energía es renovable, mientras que en Brasil 38.7% de su energía es de fuentes renovables. Además, habría que aclarar que la poca energía renovable que se produce en México, a diferencia de Brasil, es fundamentalmente hidráulica, solar y eólica, y no se utilizan hasta el momento la producción comercial de biocombustibles a partir de cultivos agrícolas o forestales.

La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y la Secretaría de Energía llevan a cabo estudios para diseñar programas para la implementación masiva de etanol como oxigenante y aditivo en gasolinas (CONAE 2006), el rendimiento de caña por hectárea en México es de 72 toneladas por hectárea. Se cultivan por año 633 millones de hectáreas, se producen 5 millones de toneladas de azúcar y 56 millones de litros de etanol. El gobierno espera que esta producción pueda ser ampliada rápidamente, dedicando mayor producción de los 58 ingenios nacionales.

En México se ha trabajado en las siguientes normas sobre biocombustibles: Ley para el Fomento de la Caña de Azúcar, Iniciativa de Ley de Desarrollo y Promoción de los Bioenergéticos (SAGARPA) e Iniciativa de Ley para el Fomento de las Energías Renovables (SENER).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los materiales lignocelulósicos constituyen una fuente de materia prima importante para la obtención de productos de amplia utilización. Dentro de estos materiales se encuentran el aserrín que resultan desechos de la industria de la elaboración primaria de la madera. En el mundo se desarrollan cada día nuevas tecnologías para dar un uso racional a estos residuos, que además contribuyen con su acumulación a la contaminación del entorno. En el presente trabajo se exponen la viabilidad del proyecto de “evaluación y optimización de

pretratamientos para obtención de bioetanol a partir de aserrín de pino” y los aspectos sociales de esta solución.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Aprovechar los residuos forestales, como el aserrín del aserradero de San Juan Nuevo, para evaluación y optimización de pretratamientos para obtención de bioetanol, probando 5 métodos diferentes de pretratamiento, seguido de un método de sacarificación.

#### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

**Objetivo 1.** Determinar la composición química del aserrín

**Objetivo 2.** Selección de los pretratamientos para la transformación del aserrín de pino en azúcares fermentables.

**Objetivo 3.** Identificar las variables que influyen en el rendimiento de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática de aserrín de pino pretratada con ácido nítrico.

**Objetivo 4.** Identificar las condiciones que maximizan la producción de azúcares fermentados por sacarificación enzimática de aserrín pretratado con  $\text{HNO}_3$ .

**Objetivo 5.** Obtener las condiciones óptimas para la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado con  $\text{HNO}_3$ .

**Objetivo 6.** Obtener etanol por sacarificación y fermentación simultánea.

#### **6. HIPÓTESIS**

El pretratamiento combinado tiene mejores rendimientos para la obtención de glucosa que los pretratamientos más utilizados (Hidróxido de sodio, explosión de vapor, ácido sulfúrico, y órgano solventes).

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Materiales

#### 7.1.1 Material Lignocelulósico

Aserrín de la región de San Juan Nuevo Parangaricutiro, con tamaño de partícula malla # 40 y retenida en malla # 60 de árboles recién talados de *Pinus pseudostrobus*.

#### 7.1.2 Enzimas

Se utilizan celulasas comerciales que incluyen Celluclast 1.5 L. Celluclast 1.5 L en una preparación de enzimas de *Trichoderma reesei*. Posee más de un tipo de endo- $\alpha$ -glucosidasa, exocelulasa y  $\beta$ -glucosidasas.

#### 7.1.3 Levadura

*Saccharomyces cerevisiae* donada por el Instituto Tecnológico de Durango ITD-00185

### 7.2. Métodos.

#### 7.2.1 Caracterización de biomasa Inicial

Se determina la composición química del aserrín en cada una de las etapas del proceso (figura 10), se inicia con la biomasa cruda, posteriormente la biomasa pretratada y finalmente a la biomasa hidrolizada; se determina pH (Sandermann

and Rothkamm 1959), % de humedad (A.O.A.C. 1990), % de cenizas (TAPPI 2000), % de lignina (Runkel and Wilke 1951) % de extraíbles (este se determina haciendo extracciones sucesivas con cuatro solventes: Ciclohexano, acetona, metanol y agua), % de holocelulosa (Wise, Murphy and d'Addieco 1946) y % alfa celulosa (ASTM 1977).

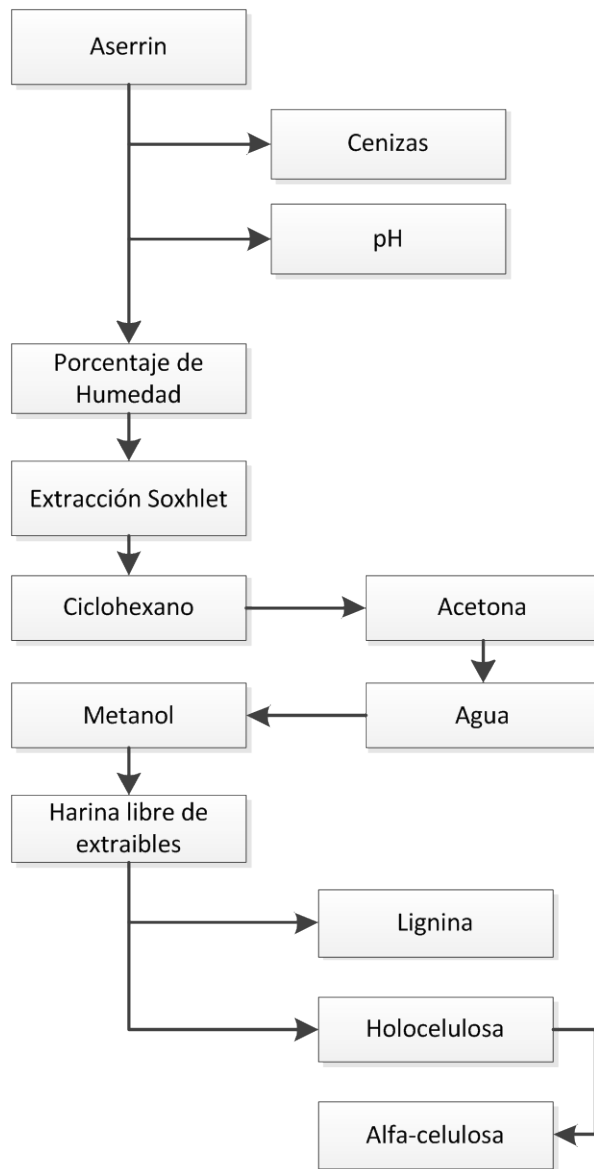


Figura 10. Diagrama de flujo que muestra el proceso de análisis para la determinación de la composición química del aserrín de pino.

#### **7.2.1.1 Determinación del pH**

Se determinó el pH del aserrín, aplicando el método Sandermann y Rothkamm (1959), la muestra fue colocada en un vaso de precipitado, se le adicionaron 20 mL de agua destilada y se procedió a tomar las lecturas con un potenciómetro, a los 5 minutos, a las 4 h, 24 h y 48 h consecutivamente.

#### **7.2.1.2 Porcentaje de humedad**

Para el porcentaje de humedad se determinó colocando 5 gramos de muestra (en un crisol previamente secado a 105°C), en una estufa de secado a 105°C por 5 horas y trasladando a un desecador para su enfriado por 30 minutos y su posterior pesado (A.O.A.C. 1990).

#### **7.2.1.3 Contenido de cenizas**

El contenido de cenizas se efectuó de manera gravimétrica, después de quemar cuidadosamente las muestras en las placas de calentamiento, para posteriormente calcinar en una mufla a 525 °C utilizando crisoles de níquel, esto de acuerdo a la norma T 211 om-93 (TAPPI 2000).

#### **7.2.1.4 Cuantificación de sustancias extraíbles**

Para determinar la cantidad de extraíbles contenida en la madera y corteza de las especies se utilizó una secuencia de extracciones con solventes de polaridad creciente (ciclohexano, acetona y metanol y agua caliente), utilizando un sistema continuo (equipo Soxhlet) por un periodo de 6 horas, el cual aseguró que se retirará la mayor cantidad de extractos presentes, finalizando el ciclo de

extracciones con agua caliente a reflujo. La mezcla extracto-solvente fue separada en un rotavapor. Finalmente se colocó el matraz con el extracto en un secador hasta peso constante, para determinar los porcentajes de contenidos de extractos presentes.

#### **7.2.1.5 Determinación lignina**

El contenido de lignina presente en la madera se desarrolló siguiendo la técnica Runkel y Wilke (1951), en la cual se procedió agregando ácido sulfúrico al 72 % y ácido bromhídrico al 40 % a la muestra, agitándola y dejándola reposar por 2 horas, posteriormente se le agregaron 100 mL de agua destilada y se dejó hervir por 5 minutos, finalmente se filtró en embudos Buchner y se lavaron las muestras en repetidas ocasiones para no tener residuos de ácido. Para finalizar se llevarán a peso constante en una estufa a 105 °C.

#### **7.2.1.6 Determinación de holocelulosa**

Mediante el método Wise (1946) se determinó el porcentaje de holocelulosa contenida en la madera. Se colocaron las muestras en matraces Erlenmeyer adicionando una solución de clorito de sodio y ácido acético, manteniendo los matraces tapados y en reacción en baño de agua a 75°C. Añadiendo cada hora, los químicos señalados, por un periodo de 4 horas. Después se vertieron las muestras en filtros de fondo poroso con vacío para facilitar el filtrado, se procedieron a lavar en repetidas ocasiones con agua destilada fría y acetona, finalmente se llevaron las muestras a una estufa a 40°C hasta peso constante.

#### **7.2.1.7 Determinación de alfa celulosa**

El contenido de alfa celulosa en la madera se efectuó siguiendo la técnica ASTM-D 1103-60 (1977), en la cual se agrega hidróxido de sodio al 17.5 % y una solución de sosa al 8.3 % dejándola reposar por un lapso de 2 h. Después de esto, las muestras se colocaron en vasos de vidrio porosidad media para en estos hacer

una lavado y filtrado. Una vez terminada esta etapa se pasaron a la estufa a 105°C por 8 horas.

## 7.2.2. Azúcares reductores e hidrólisis enzimática

### 7.2.2.1 Determinación de azúcares reductores

Se colocaron 3 mL de reactivo DNS y 1 mL de muestra en un tubo de ensayo de 25 mL, se homogenizo la solución y se calentó en un baño María a 100°C, durante 5 minutos, inmediatamente después se enfrió la solución en un baño de agua fría durante 10 minutos. Se determinó la absorbancia a 540 nm. El blanco utilizado se sometió a las mismas condiciones de reacción de la muestra. El resultado se leyó en una curva patrón de glucosa previamente realizado.

### 7.2.2.2 Curva patrón de glucosa

Se prepararon 50 mL de glucosa con una concentración de 5 g/l, posteriormente se prepararon diluciones (tabla 2), agregando buffer de acetatos con una concentración 0.1 molar preparado con anterioridad. Se determinó el contenido de azúcares reductores, utilizando el método antes descrito. Se elabora la curva patrón (Tabla 2), se grafica las absorbancias vs las concentraciones de glucosa a 540 nm, se obtiene la ecuación que relaciona los dos parámetros.

Tabla 2. Diluciones para la curva patrón de glucosa.

Tubos para curva		
Solución stock (mL)	Buffer acetatos (mL)	Concentración en g/L de glucosa
0.1	0.9	0.5
0.2	0.8	1

---

0.3	0.7	1.5
0.4	0.6	2
0.5	0.5	2.5
0.6	0.4	3
0.7	0.3	3.5
0.8	0.2	4
0.9	0.1	4.5
1	0	5

---

### 7.2.2.3 Determinación de la actividad enzimática del extracto comercial.

Se determina la actividad del Celluclast 1.5L de NOVOZYMES, (el cual contiene celulasas de *T. ressei*). La actividad enzimática es la potencia requerida para liberar 1  $\mu\text{m}$  de glucosa por minuto y se determinó por el método del papel filtro (Mandels and Sternberg 1976), llamado así ya que usa papel filtro como sustrato para la medición de la actividad celulósica. La unidad internacional de medición de la actividad enzimática utilizada para este método, es conocida como unidad de papel filtro (UPF). Los azúcares reductores se determinaron por el método DNS antes mencionado.

La actividad enzimática del extracto se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$FPU = \frac{\text{Concentración de glucosa (mg)}}{\left(0.18 \frac{\text{mg}}{\text{min}}\right) * (0.5 \text{ mL}) * (60 \text{ min})} \text{ unidades mL}^{-1}$$

### 7.2.2.4 Hidrólisis enzimática

Se pesó 1 gramo de las muestras pretratadas, se colocaron en recipientes de plástico de 20 mL, se mezclaron con 2 mL de azida de sodio al 0.1% m/v y el volumen requerido de solución enzimática (celluclast 1.5L Novozimes) hasta obtener 25 UPF/g de celulosa. Se ajustó el volumen de reacción a 10 mL con buffer de acetatos 0.1M a un pH de 4.7. Se incubaron a 45°C y 80 rpm durante 72 horas. Se hizo una cinética tomando 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante cada 12 horas, se le agregaron 3 mL de reactivo DNS, se calentaron a ebullición durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a 540 nm. Transcurridas las 72 horas se tomó una muestra de 2 mL de sobrenadante, se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos, se

tomaron 100  $\mu$ L de la muestra centrifugada y se repitió el procedimiento anterior para azúcares reductores. El contenido de azúcares se determinó por medio de la curva de calibración realizada con anterioridad.

### **7.2.3 Pretratamientos**

#### **7.2.3.1 Pretratamiento con hidróxido de sodio**

Se utilizan las condiciones de pretratamiento al 3% de hidróxido de sodio [NaOH], 121°C de temperatura y 78 minutos de tiempo de tratamiento en autoclave. Los experimentos se realizan por duplicado. En este pretratamiento se pesan 10 g de muestras en matraces Erlenmeyer de 250 mL, se mezclan con 100 mL de NaOH grado ACS, se calientan en autoclave en las condiciones mencionadas, se enfrían a temperatura ambiente y se filtran. Las fracciones sólidas se exprimen, secan a 105°C durante 24 horas, se pesan y se almacenan a 4°C en recipientes de vidrio herméticamente cerrados.

#### **7.2.3.2 Pretratamiento de hidrólisis ácida**

Se pesan muestras de 10 gramos de biomasa en matraces Erlenmeyer de 250 mL, se mezclan con 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%. Se calientan a 121°C, durante 60 minutos en autoclave, se enfrían a temperatura ambiente y se filtran en tela de nylon. A las fracciones sólidas se exprimen, secan a 105°C durante 24 horas. Finalmente se almacenan a 4°C en recipientes de vidrio cerrados herméticamente.

#### **7.2.3.3 Pretratamiento con explosión de vapor**

Se pesan muestras de 10 g de biomasa en matraces Erlenmeyer de 250 mL, se mezclan con 100 mL de agua destilada, se tapan y se dejan en reposo durante 48 horas a temperatura ambiente. Se calientan a 121°C durante 30 min en autoclave y se realiza una descompresión súbita del sistema. Los matraces se enfrían a

temperatura ambiente (Oliva-Domínguez 2003), Se filtran y se recupera la fracción sólida, se seca a 105°C por 24 horas y se pesa. Las muestras pretratadas se almacenan a 4°C en recipientes de vidrio herméticamente cerrados.

#### **7.2.3.4 Pretratamiento organosolv**

El material lignocelulósico se trata con etanol acuoso (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) y acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), en equipo a reflujo a temperatura regulada. Las condiciones experimentales son: relación alcohol etílico/acetona (60/40 w/w); temperatura: 80°C, tiempo de reacción: 90 min; relación liquido solido 7:1 (Martínez-Guzman 2011). Al final del tratamiento, las muestras se enfrían a temperatura ambiente y se filtran, la fracción solida se exprime, se seca a 105°C durante 24 horas y se pesa, para continuar se almacena a 4°C en recipientes de vidrio herméticamente cerrados.

#### **7.2.3.5 Pretratamiento combinado**

Se pesan 20g de biomasa seca en un matraz bola, se agregan 120 mL de ácido nítrico al 6% al matraz, se conecta a un condensador y se mantiene a reflujo por 60 minutos a 100°C en un baño de aceite, al transcurrir los 60 minutos, el sólido se lava con agua destilada, se seca y prosigue con la adición de 120 mL de hidróxido de sodio al 1% por 30 minutos a 90°C repitiendo el procedimiento anterior colocando a reflujo. La fracción solida se filtra, lava y exprime; se seca a 105°C durante 24 horas y se pesa, se almacena a 4°C en recipientes de vidrio herméticamente cerrados.

#### **7.2.4 Selección del pretratamiento**

Toda la materia prima resultante de los pretratamientos se somete a la hidrólisis enzimática durante 72 horas, a 45°C pH de 4.5, con una carga enzimática de 25 UPF/g de carbohidratos totales. Los hidrolizados se analizan para determinar su contenido de azúcares utilizando el método DNS reportado por Chaplin y Kennedy (1994). Se selecciona el pretratamiento que produce el mejor rendimiento de hidrólisis para su optimización.

Tabla 3. Tabla resumen de condiciones de operación para los pretratamientos usados para el estudio.

Pretratamientos	Catalizador	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Concentración (%)	Muestra (gramos)
Alcalino	NaOH	121	78	3	10
Ácido	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	121	60	5	10
Explosión de vapor	H <sub>2</sub> O	121	30	100	10
Órganosolv	Metanol/Acetona	80	90	60/40	10
Combinado	HNO <sub>3</sub> /NaOH	100/90	60/30	6/1	20

### 7.2.5 Cinética de hidrólisis enzimática

La materia prima pretratada en las condiciones dadas se someten a hidrólisis enzimática por incubación a 48°C, 150 rpm y una carga enzimática de 25 UPF/g de carbohidratos totales durante 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 168, y 200 h. Se determina su contenido de azúcares utilizando el método del DNS propuesto por Chaplin y Kennedy (1994).

Los resultados obtenidos permiten seleccionar las condiciones de pretratamiento y tiempo de hidrólisis enzimática que producen la concentración más alta de azúcares reductores.

### 7.2.6 Identificar las variables que influyan en el rendimiento de azúcares reductores en la hidrolisis enzimática de aserrín de pino pretratada con ácido nítrico.

Evaluar la participación de las variables temperatura, tiempo y concentración de ácido mediante un experimento 2<sup>3</sup> factoriales en ello se utilizaron concentraciones de 3 y 6 % de HNO<sub>3</sub>, el pretratamiento se llevó a cabo en un equipo de reflujo con

baño de aceite de 50 y 100°C durante 30 y 60 minutos. El material pretratado se sometió a hidrólisis enzimática, empleando para ello celluclast 1.5L de Novozyme, en una concentración de 25 UPF durante 168 horas y 48°C de temperatura.

#### **7.2.7 Identificar las condiciones que maximizan la producción de azúcares fermentados por sacarificación enzimática de aserrín pretratado con HNO<sub>3</sub>.**

Se eligió un sistema central compuesto con variables para maximizar la producción de azúcares las cuales fueron 4.5%, 6% y 7.5% de ácido nítrico, 80°C, 100°C y 120°C de temperatura y se mantuvo constante el tiempo de reacción con 30 minutos, con estos datos nos dio la tabla 19.

#### **7.2.8 Obtener las condiciones óptimas para la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado con HNO<sub>3</sub>**

Para este paso se usa el método estadístico de optimización como el Diseño Central Compuesto con 2 puntos intermedios y 1 replica con los factores de concentración de HNO<sub>3</sub> y temperatura los cuales fueron 6.5 y 12%, 100 y 130°C. Se identifica el orden de ejecución y se corren los experimentos, se analizan estadísticamente los resultados y con éste modelo se obtienen las condiciones óptimas de proceso.

#### **7.2.9 Obtención de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas**

Finalmente se realiza el proceso de SFS en las condiciones óptimas del proceso previamente determinadas. Para ello se utiliza la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta se conserva útil en medio YPD (levadura, peptona, glucosa) a un pH de 5.5. El inóculo se prepara con 100 mL de medio YPD, inoculado e incubado a 28°C durante 12 horas. En el caldo producido se determina la cuenta total de levaduras en cámara de Neubauer (1 mL de inóculo). Se pesan 2 gramos de aserrín pretratado, por duplicado, se colocaron en frascos de vidrio de 50 mL de medio YP (extracto de levadura y peptona),  $1 \times 10^7$  Cel/mL de *Saccharomyces cerevisiae*, un volumen apropiado de solución enzimática (Celluclast 1.5 L), hasta

obtener 25 UPF/g de celulosa. Se ajusta el volumen de reacción a 20 mL con agua des ionizada. La mezcla se incuba a 80 RPM a una temperatura de 35°C durante 54 horas, tomándose muestras cada 8 horas. A las muestras obtenidas se le determina la concentración de glucosa y etanol por HPLC (Agilent Technologies).

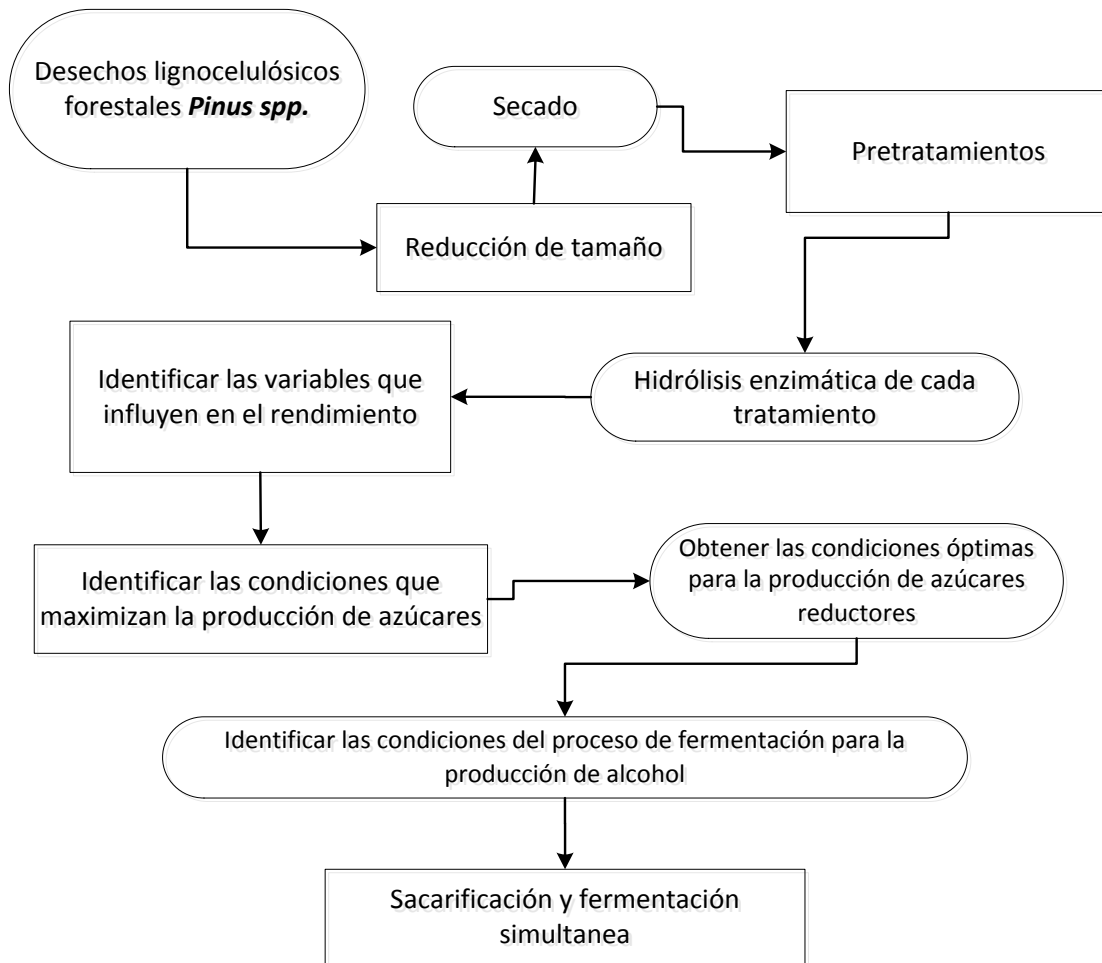


Figura 11. Esquema de la experimentación planeada.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 8.1 Objetivo 1. Determinar la composición química del aserrín

#### 8.1.1 Determinación del pH

Tabla 4. pH.

pH		
Experimental	Rutiaga 2001	
	Duramen	Albura
5.1	4.5	5.5

El resultado fue de 5.1 de pH en biomasa inicial, el cual es un valor intermedio entre los valores de duramen y albura reportados por Rutiaga (2001) y solo un 2% mayor que el promedio de estos.

#### 8.1.2 Porcentaje de humedad

Tabla 5. Porcentaje de humedad.

Humedad	
Experimental	Lima 2013
53.34%	45.5%

Se obtuvo un resultado de 53.3437 % de humedad en biomasa inicial comparado con Lima (2013) obtuvo una humedad de 62% en albura y 29% en duramen con un promedio de 45.5% el cual es 14.69% menor humedad que el resultado obtenido. Las diferencias encontradas dependen de la temporada de corte del

árbol muestra, lugar de crecimiento, fertilizantes usados y condiciones de almacenamiento (Boer and Den Uil 1997).

### 8.1.3 Contenido de cenizas

Tabla 6. Porcentaje de cenizas.

Cenizas			
Experimental	Lima 2013	Rutiaga 2001	Cruz 1991
0.19%	0.35%	0.12%	0.05%

Se obtuvo un resultado de 0.19% de cenizas en biomasa inicial, el cual es un valor ligeramente menor comparado con Lima (2013) quien obtuvo 0.35% y 45.7% mayor, pero a su vez Rutiaga (2001) y Cruz (1991) obtuvieron 0.12% y 0.05%, respectivamente, los cuales son valores más bajos en 36.84% y 73.68% que los resultados aquí obtenidos.

### 8.1.4 Determinación de Sustancias Extraíbles

Tabla 7. Sustancias extraíbles.

Sustancias Extraíbles				
	Experimental	Rutiaga 2001		Cruz 1991
		Duramen	Albura	
Ciclohexano:	1.17%	4.40%	0.70%	2.2
Acetona:	1.49%	2.80%	0.70%	
Metanol:	1.17%	0.80%	0.80%	
Agua:	1.28%	1.50%	1.20%	

Se obtuvo 1.17% de extraíbles con ciclohexano, 1.49% con acetona, 1.17% con metanol y 1.28% con agua (Tabla 6), los cuales son valores un tanto bajos comparados con Rutiaga (2001) quien analizó en forma separada duramen y

albura; obtuvo 4.4% y 0.7% para ciclohexano, 2.8% y 0.7% para acetona, 0.8% y 0.8% para metanol, 1.5% y 1.2% para agua, respectivamente, con esta comparativa es fácil observar que el resultado es 1.34% general menor de extraíbles.

Para el ciclohexano se obtuvo 54.11%, menor rendimiento, para acetona un 14.85% menor, para metanol un 31.62% mayor y para agua 14.66% menor todo comparado con datos reportados por Rutiaga (2001).

### 8.1.5 Determinación de lignina

Tabla 8. Determinación de lignina.

Lignina				
Experimental	Lima 2013	Rutiaga 2001		Cruz 1991
		Duramen	Albura	
30.57%	28.07%	27.60%	26.60%	29.70%

En la lignina se obtuvo mayor porcentaje en la materia prima a razón de 6.8% para Lima en 2012, 9.71% y 12.98% para Rutiaga en 2001 en duramen y albura respectivamente y finalmente un 2.84% para Cruz en 1991.

### 8.1.6 Determinación de holocelulosa

Tabla 9. Determinación de holocelulosa.

Holocelulosa	
Experimental	Lima 2013
70.26%	80.44%

En la Holocelulosa se obtuvo experimentalmente un 12.6% menor cantidad que Lima en el 2013.

### 8.1.7 Determinación de alfa celulosa

Tabla 10. Determinación de alfa celulosa.

Alfa celulosa	
Experimental	Lima en 2013

---

64.61%

**64.25%**

---

Para la alfa celulosa es apreciable un muy cercano valor con solo una diferencia de 0.36% más alto el valor obtenido contra Lima en 2013.

**Conclusiones:** Los valores obtenidos son comparables con estudios anteriores. Las diferencias encontradas dependen de la temporada de corte del árbol muestra, lugar de crecimiento, fertilizantes usados y condiciones de almacenamiento (Boer and Den Uil 1997).

## 8.2 Objetivo 2. Seleccionar los pretratamientos para la transformación del aserrín de pino en azúcares fermentables.

Tabla 11. Resultados de diluciones para la curva patrón de glucosa.

Solución stock (mL)	Buffer acetatos 0.1M (mL)	Concentración en g/L de glucosa	Absorbancia 540nm
0.1	0.9	0.5	0.08985
0.2	0.8	1	0.1773
0.3	0.7	1.5	0.26475
0.4	0.6	2	0.3522
0.5	0.5	2.5	0.43965
0.6	0.4	3	0.5271
0.7	0.3	3.5	0.61455
0.8	0.2	4	0.702
0.9	0.1	4.5	0.78945
1	0	5	0.8769

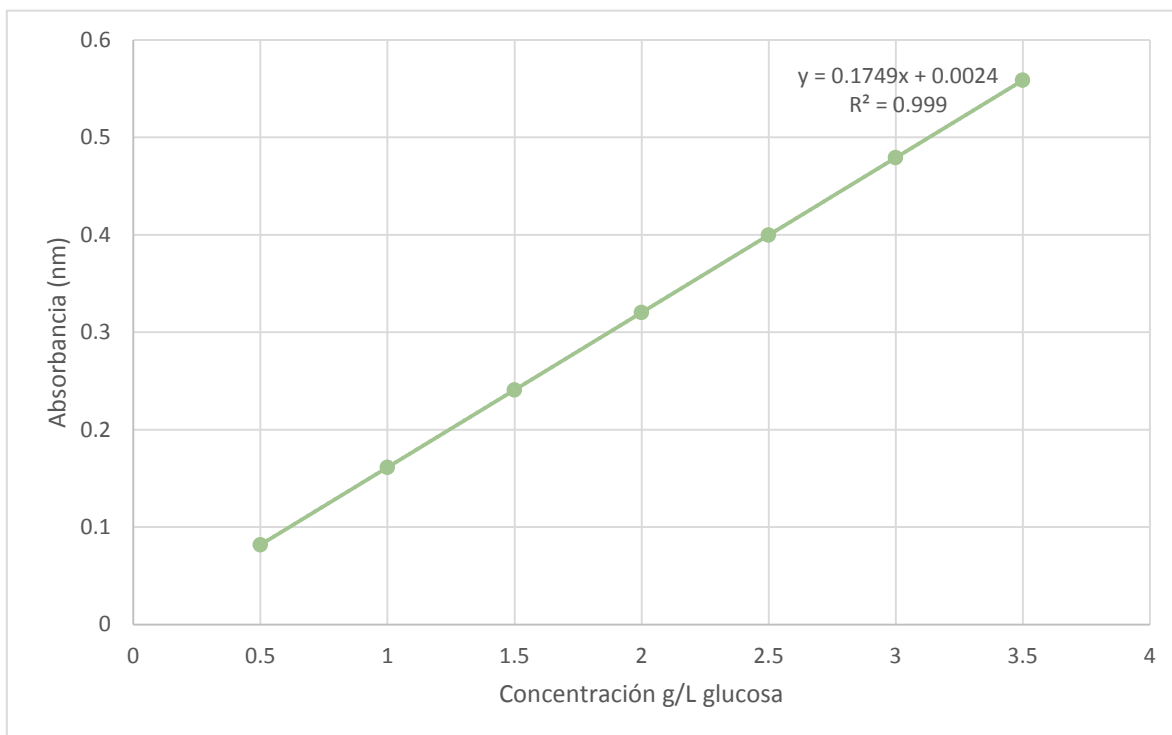


Figura 12. Curva patrón para determinar la cantidad de azúcares reductores con el método DNS.

Tabla 12. Rendimiento de pretratamientos y patrones.

Pretratamientos y patrones	Rendimiento en peso (%)	Rendimiento de azúcares (%)		Rendimiento total (%)
Alcalino	65.96	12.14	B	8.01
Ácido	47.52	1.58	A	0.75
Explosión de vapor	76.65	9.56	B	7.38
Órganosolv	96.61	8.62	B	8.32
Combinado	40.84	33.23	D	13.57
Aserrín	-	9.73	C	9.73
Celulosa	-	22.48	E	22.48

Valores con literales diferentes indica diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ )

Tabla 13. Análisis de Varianza para pretratamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1606.97	6	267.829	375.44	0.0000
Intra grupos	24.9678	35	0.713366		
Total (Corr.)	1631.94	41			

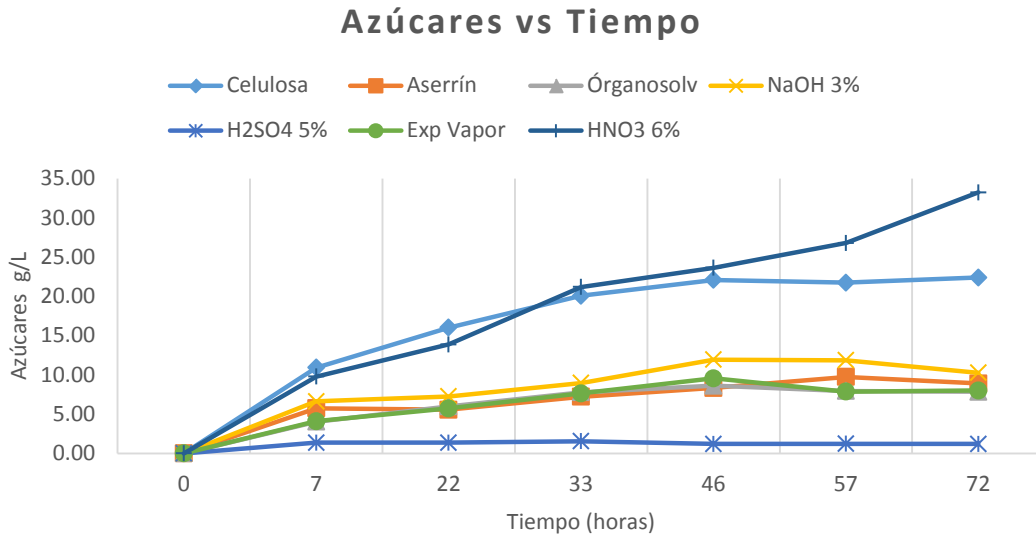


Figura 13. Gráfico de Azúcares (g/L) vs tiempo.

La celulosa y aserrín se usan como patrones para la comparación.

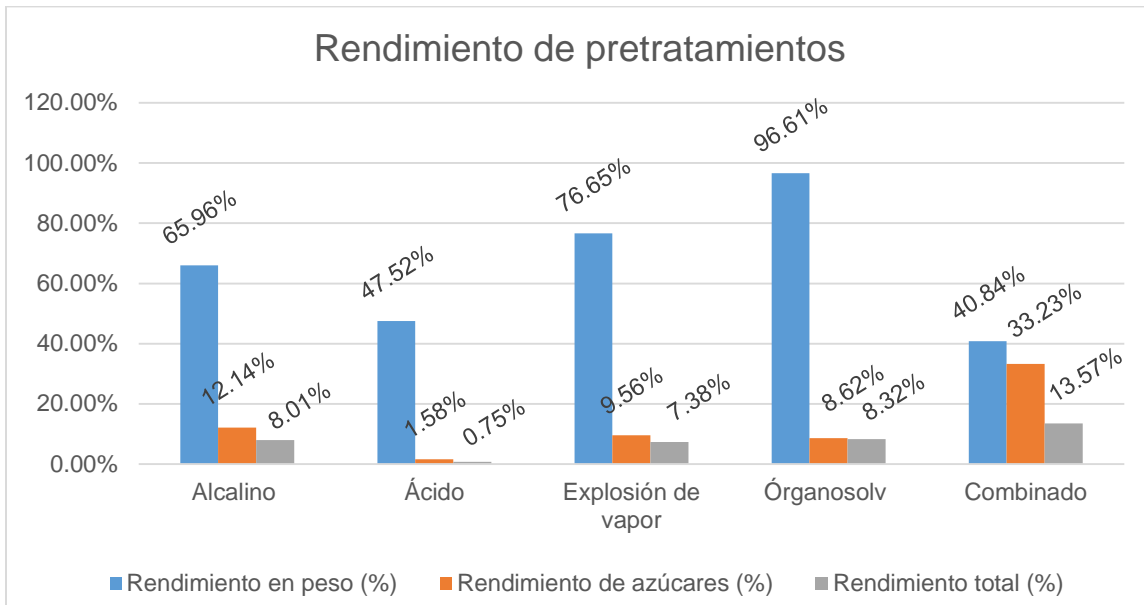


Figura 14. Gráfico de rendimientos por pretratamiento.

Los datos obtenidos en el pretratamiento alcalino son comparables con los obtenidos por Saha (2006) con paja de trigo pretratada con (8.6% w/v) con peróxido alcalino (2,15% de  $H_2O_2$ , v/v, pH 11,5; 35 grados C; 24 h) y la sacarificación enzimática (45 ° C, pH 5,0, 120 h) por tres preparaciones de enzimas comerciales (celulasa, beta-glucosidasa, y xilanasas).

Los rendimientos de azúcar obtenidos para el ácido sulfúrico en la hidrólisis son menores que los reportados por Saha en 2005 con cascarilla de arroz pretratada con (7.83% w/v) 0.75% de  $H_2SO_4$  v/v, durante 60 min, a 121°C (40%, en función del contenido total de carbohidratos) y su posterior hidrólisis con una mezcla de celulasa y glucosidasa (Celluclast, Novozyme 188), durante 72h a 121°C; pero por el contrario son mayores a los reportados por Awasthi (2013) con 12.63 mg de azúcares reductores por gramos de agua (carbohidratos en solución acuosa) con lirio acuático cuando es tratado con 4% (v/v) of  $H_2SO_4$  a 121°C.

Los rendimientos para el pretratamiento con explosión de vapor son casi idénticos a los obtenidos por López-Miranda (2009) con aserrín de pino con un valor de 8.15% de azúcares reductores, después de un pretratamiento con explosión de vapor durante 30 minutos a 120 °C, a un pH de hidrólisis de 4.5, durante 240 h, con una carga enzimática de 25 UPF/g de carbohidratos totales.

Los rendimientos de pretratamiento con organosolv usado por Mesa (2011) con bagazo de caña de azúcar (29.1% de glucosa) con 30% (v/v) etanol a 195°C, durante 60 min son más altos que los conseguidos experimentalmente.

Los datos obtenidos para el pretratamiento combinado son más bajos comparados con los resultados obtenidos por Alhassan en el 2010 con madera de árbol de caucho pretratado con  $HNO_3$  al 6% a 100°C por 60 minutos seguido de NaOH al 1% usando celulasa junto con  $\beta$ -glucosidasa con 25 UPF y 60 UBC respectivamente.

El aserrín sin pretratar es pobremente hidrolizado por las enzimas. Lo anterior puede deberse a la escasa disponibilidad de la celulosa, como consecuencia del efecto protector de las hemicelulosa y la lignina, a la cristalinidad de la celulosa, o al efecto combinado de ambos fenómenos.

El pretratamiento con  $H_2SO_4$  al 5% se pudo observar que este método hidroliza parcialmente a la celulosa disponible, debido a lo cual, los rendimientos de hidrólisis enzimática son muy bajos; esta aseveración se corrobora con análisis de DNS al sobrenadante los cuales dan como resultado 18.21 g/L de azúcares. Esto también puede deberse al incremento en el ordenamiento de las fibras de celulosa y a la reducción de zonas amorfas en las mismas, las cuales son los sitios de ataque predilectos de las enzimas endoglucanasas, responsables de generar extremos de celulosa para la acción concertada de las exoglucanasas tipo I y II.

**Conclusiones:** Se puede identificar claramente que el mejor pretratamiento es el uso del pretratamiento combinado comparado con los otros 4 pretratamientos usados.

### **8.3 Objetivo 3. Identificar las variables que influyan en el rendimiento de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática de aserrín de pino pretratada con ácido nítrico.**

Se eligieron las variables, las cuales fueron: Cantidad de ácido nítrico utilizado (3% y 6%), tiempo de reacción con ácido nítrico (30 y 60 minutos) y por último la temperatura del ácido nítrico (50°C y 100°C).

Se determina el uso de un diseño estadístico factorial  $2^k$  para tener resultados de 8 diferentes condiciones del pretratamiento.

Tabla 14. Pretratamientos usados con sus respectivos resultados.

# Muestra	[HNO3] (%)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Rendimiento de pretratamientos (%)	[Azúcares] (%)	[Azúcares totales] (%)
1	3	50	30	78.12 ± 0.00	11.35 ± 0.44	8.86
2		60	75.02 ± 2.19	11.75 ± 0.73	8.82	
3		30	59.89 ± 0.00	35.37 ± 1.78	21.18	
4	6	100	60	55.07 ± 1.70	32.27 ± 2.04	17.77
5		50	30	87.14 ± 7.48	13.28 ± 1.23	11.57
6		60	80.49 ± 2.32	17.41 ± 0.94	14.02	
7	6	100	30	47.15 ± 2.83	57.58 ± 1.41	27.15
8		60	40.84 ± 0.51	59.22 ± 0.07	24.19	
B1	Aserrín	-	-	-	10.52 ± 0.46	10.52
B2	Celulosa	-	-	-	45.15 ± 0.04	45.15

### 8.3.1 Análisis de resultados

Tabla 15. Análisis de Varianza para [Azúcares] - Suma de Cuadrados Tipo III.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Tiempo	3.69601	1	3.69601	2.70	0.1345
B:[HNO3]	100.852	1	100.852	73.77	0.0000
C:Temperatura	555.427	1	555.427	406.28	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	2.66506	1	2.66506	1.95	0.1961
AC	19.6471	1	19.6471	14.37	0.0043
BC	5.39401	1	5.39401	3.95	0.0783
RESIDUOS	12.3038	9	1.36709		
TOTAL (CORREGIDO)	699.985	15			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En el ANOVA se observa que el tiempo no tiene un efecto significativo en el rendimiento, con lo cual podemos manejar este factor para futuros análisis como una constante.

En el ANOVA se observa también que no hay interacciones entre concentración y temperatura, esto se corrobora con los gráficos obtenidos.

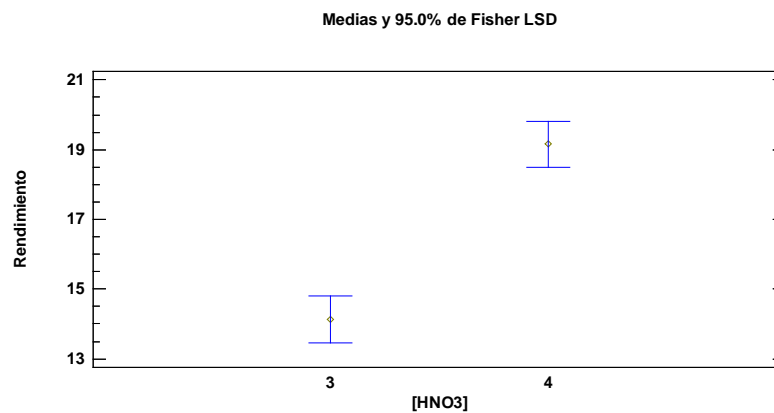


Figura 15. Gráfico de medias para rendimiento por concentración.

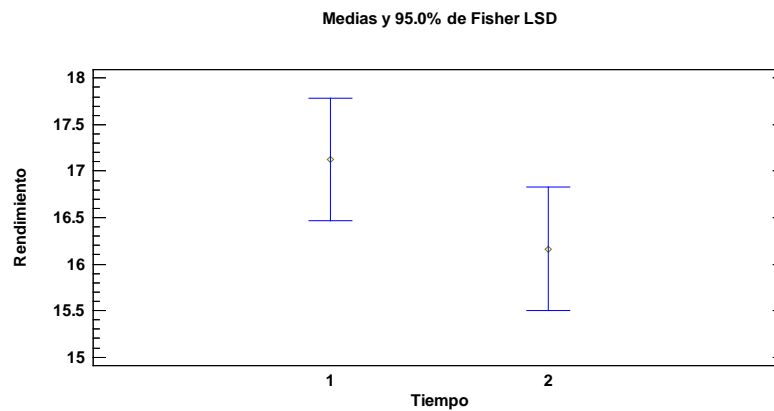


Figura 16. Gráfico de medias para rendimiento por tiempo.

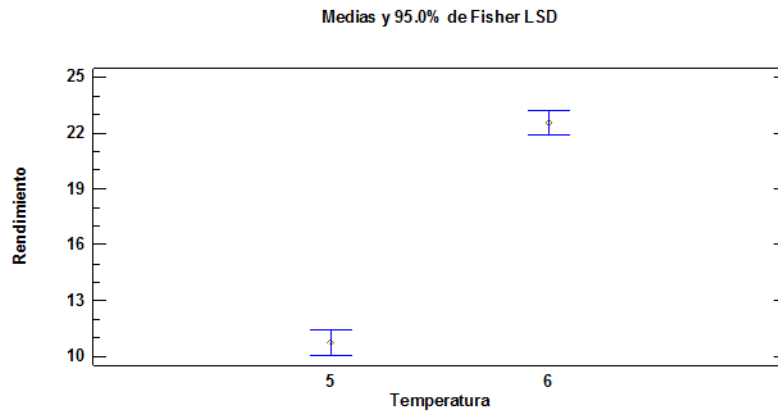


Figura 17. Gráfico de medias para rendimiento por temperatura.

Con los datos gráficos de las medias se observa que para la concentración hay un mayor rendimiento con un 6%, para un tiempo de 30 minutos y una temperatura de 100°C; al utilizar el tiempo de 30 minutos obtenemos un ahorro significativo de tiempo y energía, lo cual se traduce en ahorro costos de proceso.

Tabla 16. Pruebas de Múltiple Rangos para [Azúcares] por [HNO<sub>3</sub>].

Método: 95.0 porcentaje LSD

[HNO <sub>3</sub> ]	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	8	14.1337	0.413384	X
4	8	19.155	0.413384	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3 - 4	*	-5.02125	1.32249

\* indica una diferencia significativa.

Tabla 17. Pruebas de Múltiple Rangos para [Azúcares] por Tiempo.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	8	16.1638	0.413384	X
1	8	17.125	0.413384	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2		0.96125	1.32249

\* indica una diferencia significativa.

Tabla 18. Pruebas de Múltiple Rangos para [Azúcares] por Temperatura.

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5	8	10.7525	0.413384	X
6	8	22.5362	0.413384	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
5 - 6	*	-11.7837	1.32249

\* indica una diferencia significativa.

Estas pruebas de múltiples rangos indican que no existen diferencias estadísticamente significativas de rendimiento por tiempo pero si existe en rendimiento por concentración y rendimiento por temperatura.

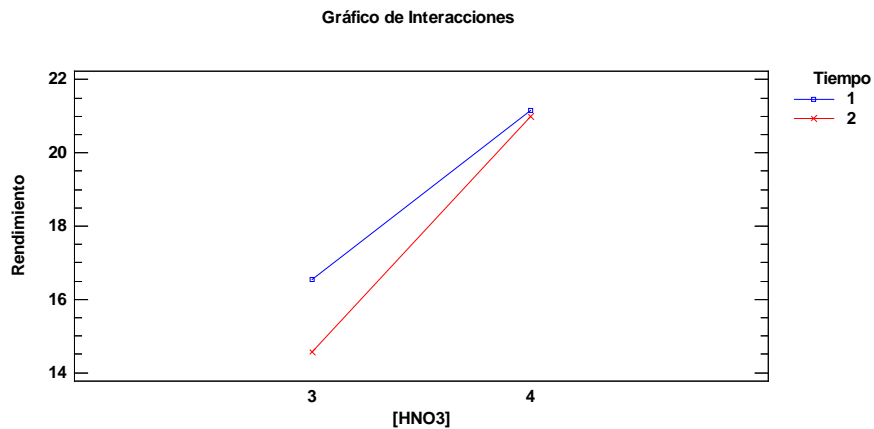


Figura 18. Gráfico de Interacciones concentración de HNO<sub>3</sub> vs tiempo.

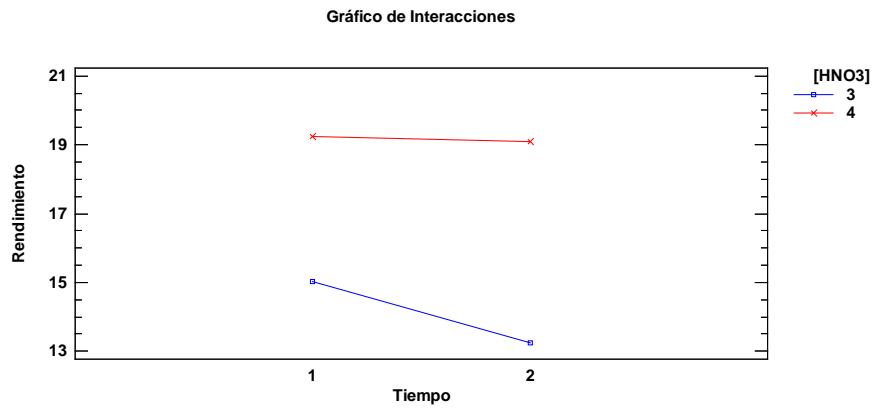


Figura 19. Gráfico de Interacciones tiempo vs concentración de HNO<sub>3</sub>.

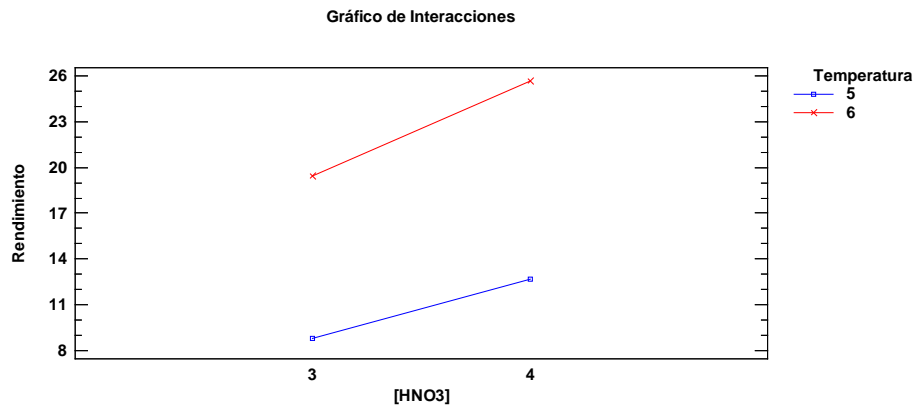


Figura 20. Gráfico de Interacciones concentración de HNO<sub>3</sub> vs temperatura.

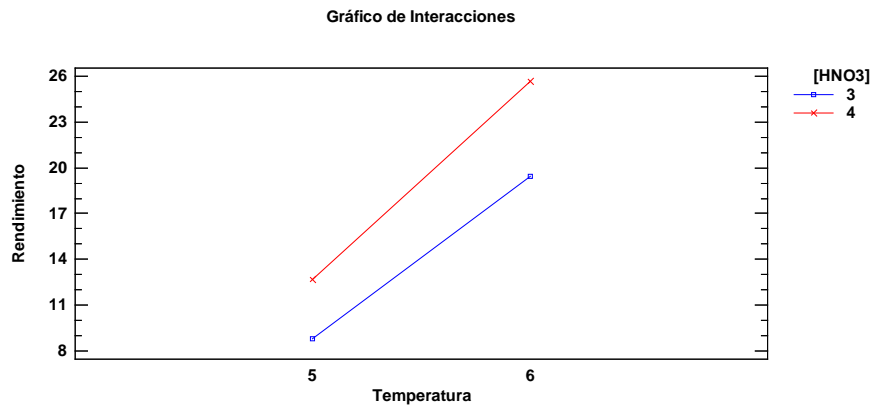


Figura 21. Gráfico de Interacciones temperatura vs concentración de  $\text{HNO}_3$ .

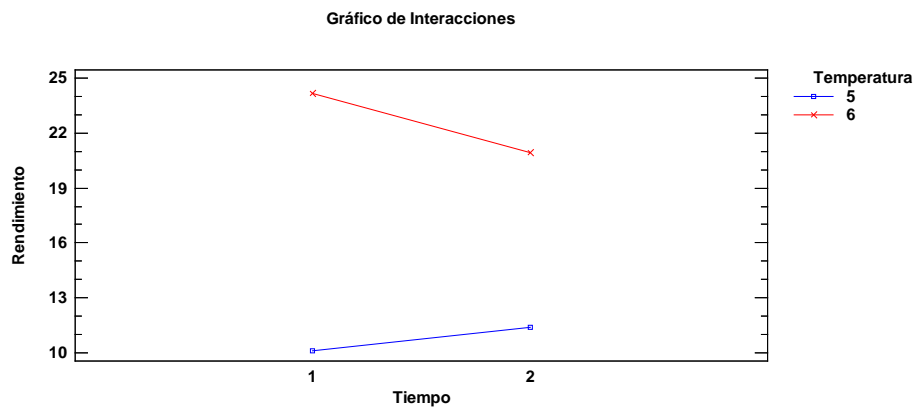


Figura 22. Gráfico de Interacciones tiempo vs temperatura.

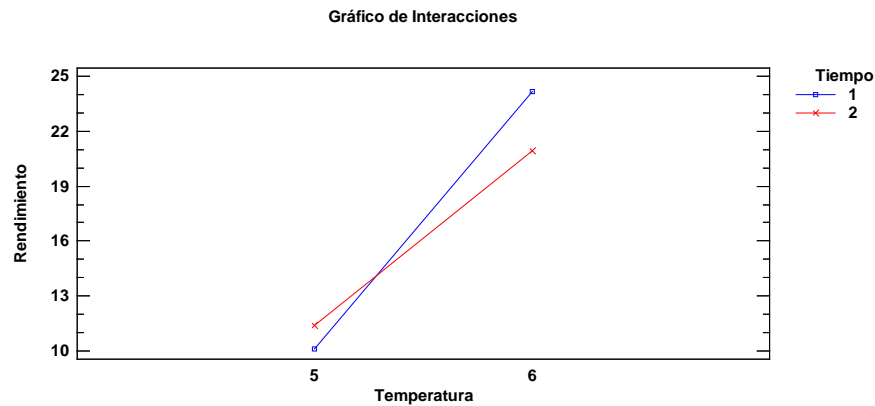


Figura 23. Gráfico de Interacciones temperatura vs tiempo.

Con estos gráficos se puede ver los datos que arroja el ANOVA en forma gráfica y vuelve a mostrar que no existen interacciones entre concentración y temperatura con lo cual se concluye que se puede usar el tiempo de 30 minutos para posteriores experimentos reduciendo así el gasto energético a la mitad; pero por el contrario los mejores rendimientos de los experimentos se observan manteniendo la concentración de ácido en un 6% y la temperatura en 100°C.

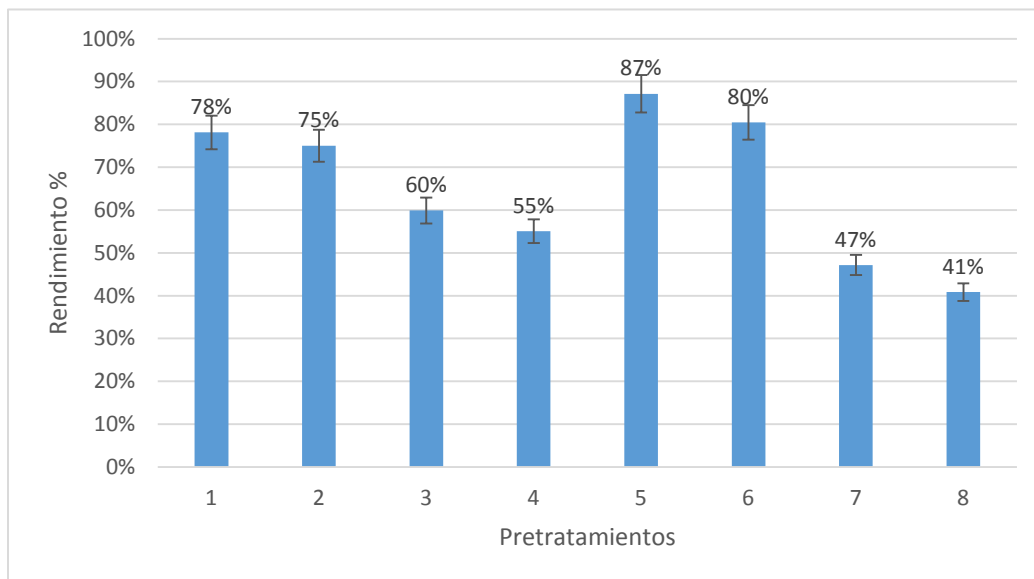


Figura 24. Gráfico comparativo de peso en pretratamientos.

En los pretratamientos se observa que los rendimientos más altos en peso a 50°C de temperatura, pero por el contrario en la hidrólisis estos son los más bajos, lo cual indica que muy poca lignina es removida con esta temperatura y es más difícil para la enzima interactuar con la celulosa que es el objetivo.

En los pretratamientos a 100°C se observa que los rendimientos son muy bajos pero por el contrario se observa que el rendimiento en la hidrólisis es alto, con lo cual se concluye que el rendimiento bajo en pretratamiento a esta temperatura se debe a la gran cantidad de lignina y hemicelulosa removida, pero por el contrario en la hidrólisis al ser una mayor cantidad de celulosa entonces el rendimiento tiende a aumentar considerablemente en comparación a la utilización a temperatura de 50°

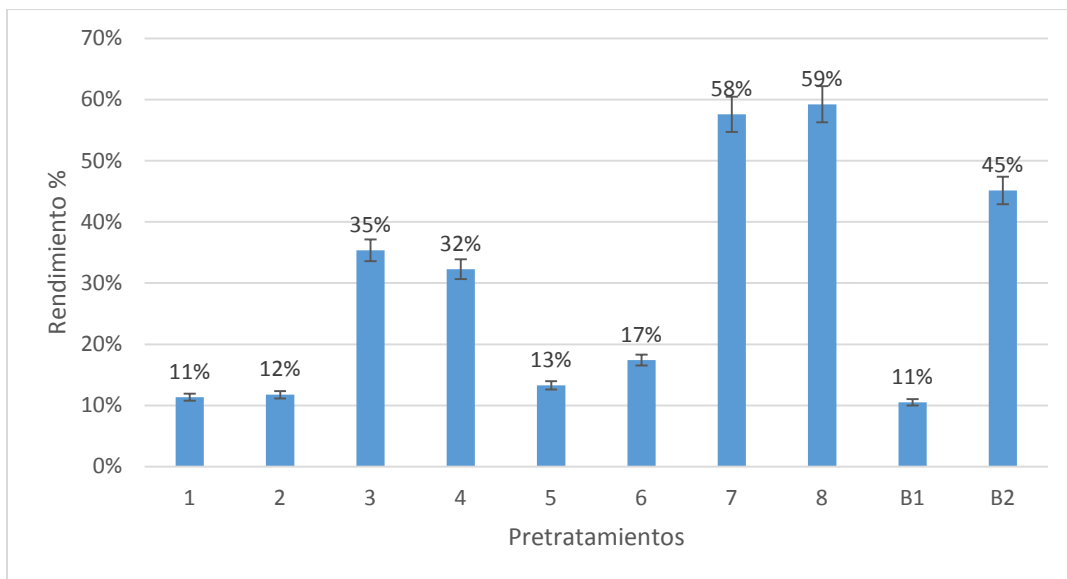


Figura 25. Gráfico de rendimientos de azúcares en hidrólisis por cada pretratamiento.

En este gráfico podemos observar claramente la cantidad de azúcares reductores liberados en la hidrólisis y los cuales tienden a ser mayores en los pretratamientos

7 y 8 los cuales son con 6% de  $\text{HNO}_3$  y temperatura de  $100^\circ\text{C}$  y por el contrario con el hecho de bajar la temperatura a  $50^\circ\text{C}$  y la misma proporción de ácido el rendimiento en azúcares reductores se ve severamente afectada como lo muestra las barras 5 y 6; también se observa que es muy significativa la diferencia utilizando el 3% de ácido como la barra 1,2,3 y 4 comparado con las barras 5, 6, 7 y 8 con 6% de  $\text{HNO}_3$ . Por último en el gráfico de hidrólisis se puede apreciar un rendimiento mayor en el pretratamiento 7 y 8 respecto a la barra B1 de aserrín sin pretratar y la barra B2 de celulosa pura, estas se usa como patrones y es de mucha importancia resaltar ya que aquí se observan claramente los beneficios del ácido nítrico; esto deja muy claro que el pretratamiento aparte de retirar lignina y hemicelulosas inclusive ayuda a abrir la celulosa para que la enzima pueda tener una mayor eficiencia.

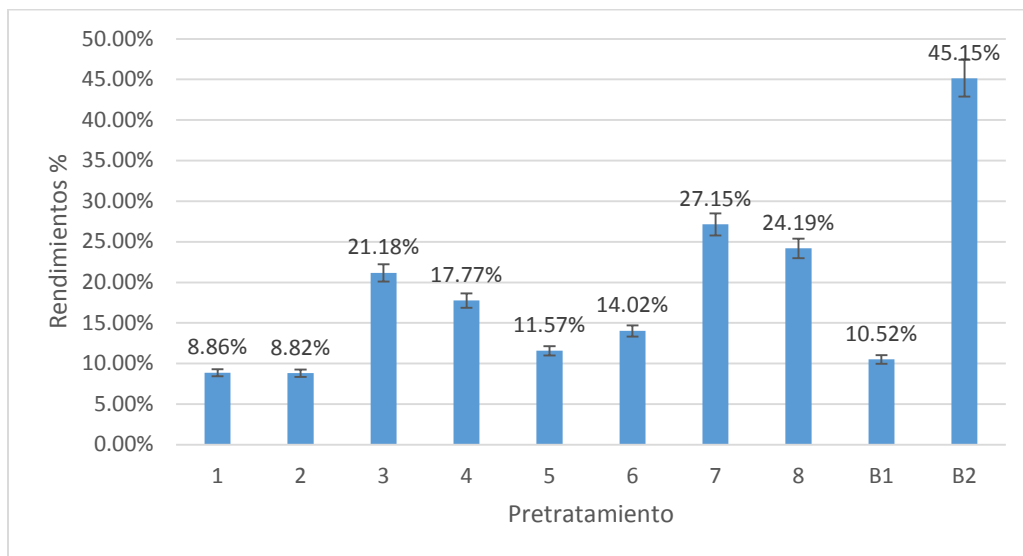


Figura 26. Gráfico de rendimientos totales por cada pretratamiento.

Este gráfico nos muestra los rendimientos totales o en otras palabras el porcentaje de azúcares reductores que podemos obtener a partir de 1 gramos de aserrín sin pretratar.

Se realizó este diseño experimental  $2^3$  para tratar de reducir la energía usada en el proceso reduciendo temperatura o tiempos y concluimos que se puede usar el tiempo 30 minutos como una constante, ya que hay similares rendimientos pero un menor consumo de energía por el menor tiempo de estancia comparado con los 30 minutos iniciales y continuamos con el uso del ácido nítrico al 6% y temperatura de 100°C. Los resultados de este diseño nos indican que es necesario hacer un diseño factorial más, el cual se hizo como  $3^2$

**Conclusiones:** Al realizar el anova correspondiente nos indica que la temperatura y la concentración del ácido tiene efecto significativo sobre los resultados obtenidos pero que el tiempo de pretratamiento no influye de manera significativa a los rendimientos de la hidrólisis; por lo tanto, el mejor rendimiento se obtuvo para el pretratamiento “7” (6% de ácido nítrico, 100°C y 30 minutos).

#### **8.4 Objetivo 4. Identificar las condiciones que maximizan la producción de azúcares fermentados por sacarificación enzimática de aserrín pretratado con HNO<sub>3</sub>.**

Se eligieron las variables para la maximización las cuales fueron 6% de Ácido nítrico, 100°C y 30 minutos y se realizó un diseño central compuesto  $3^2$  utilizando cantidad de ácido nítrico con 4.5%, 6% y 7.5%. Temperatura del ácido nítrico con 80°C, 100°C y 120°C; y se mantuvo constante el tiempo de reacción con 30 minutos

Tabla 19. Matriz de diseño y resultados obtenidos ( $3^2$ ).

# Muestra	[HNO <sub>3</sub> ] (%)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Rendimiento de pretratamientos (%)	[Azúcares] (%)	[Azúcares totales] (%)
1		80	30	76.71 ± 0.53	15.79 ± 0.72	12.11
2	4.5	100	30	60.68 ± 0.53	28.81 ± 0.74	17.48
3		120	30	60.08 ± 0.78	45.52 ± 0.38	27.35
4	6	80	30	61.31 ± 0.53	36.96 ± 2.27	22.66
5		100	30	58.65 ± 2.19	43.16 ± 1.85	25.32

6		120	30	54.22 ± 0.71	49.61 ± 0.91	26.90
7		80	30	74.29 ± 1.06	33.50 ± 0.85	24.89
8	7.5	100	30	52.95 ± 0.88	54.92 ± 2.12	29.08
9		120	30	50.08 ± 0.02	65.64 ± 1.59	32.87
B1	Aserrín	-	-	-	9.12 ± 0.58	9.12

Se realizó nuevamente un anova y como mejor pretratamiento nos arrojó el pretratamiento “número 9” que consiste en utilizar 7.5% de Ácido nítrico a 120°C por 30 minutos.

Tabla 20. Análisis de Varianza para [Azúcares totales] - Suma de Cuadrados Tipo III.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:[HNO <sub>3</sub> ]	302.99	2	151.495	33.14	0.0001
B:Temperatura	252.039	2	126.019	27.57	0.0001
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	69.3397	4	17.3349	3.79	0.0449
RESIDUOS	41.1363	9	4.5707		
TOTAL (CORREGIDO)	665.505	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Esta tabla nos muestra que no tenemos diferencia significativa entre el ácido, la temperatura y sus interacciones por lo cual nos podemos apoyar en el gráfico de medias y pruebas de múltiples rangos para realizar una mejor elección de nuestras mejores variables.

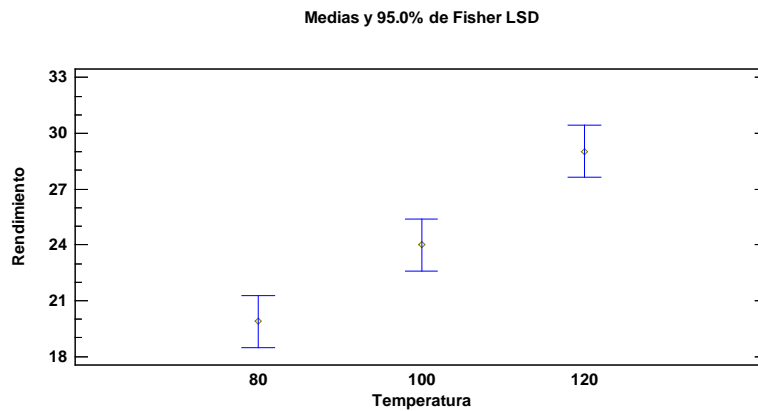


Figura 27. Gráfico de medias para rendimiento de azúcares totales por temperatura.

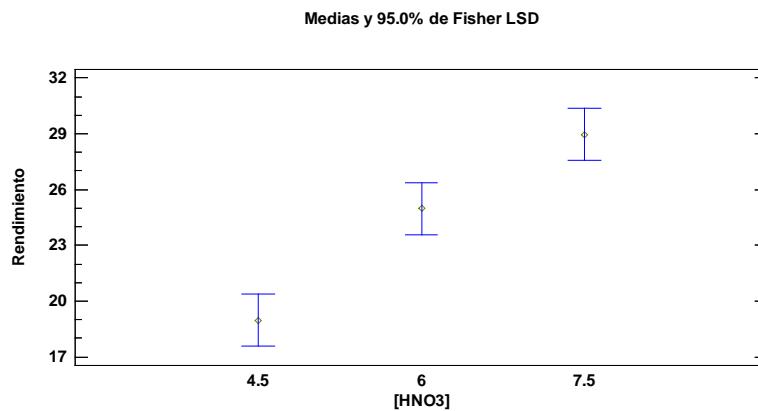


Figura 28. Gráfico de medias para rendimiento de azúcares totales por concentración de HNO<sub>3</sub>.

En estas graficas medias de Fisher LSD podemos apreciar con una mayor facilidad que los rendimientos más altos se obtienen con concentraciones altas de temperatura y HNO<sub>3</sub>, incluso se observa que tiene mayor intervención la temperatura que la concentración del ácido dado que las medias en 120°C se encuentra 1.29 unidades distante de la media de 100°C que a su vez esta solo

3.32 unidades distante de la media de 80°C, con lo cual resulta de mucha utilidad para elegir como nuestra mejor temperatura en 120°C para procesos.

Tabla 21. Pruebas de Múltiple Rangos para [Azúcares totales] por [HNO<sub>3</sub>]

[HNO <sub>3</sub> ]	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
4.5	6	18.9733	0.872802	X
6	6	24.9867	0.872802	X
7.5	6	28.9533	0.872802	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
4.5 - 6	*	-6.01333	2.79225
4.5 - 7.5	*	-9.98	2.79225
6 - 7.5	*	-3.96667	2.79225

\* indica una diferencia significativa.

Tabla 22. Pruebas de Múltiple Rangos para [Azúcares totales] por Temperatura.

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
80	6	19.885	0.872802	X
100	6	23.9933	0.872802	X
120	6	29.035	0.872802	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
80 - 100	*	-4.10833	2.79225
80 - 120	*	-9.15	2.79225
100 - 120	*	-5.04167	2.79225

\* indica una diferencia significativa.

Estas pruebas de múltiples rangos indican que si existen diferencias estadísticamente significativas en concentración de azúcares por concentración de ácido y concentración de azúcares por temperatura.

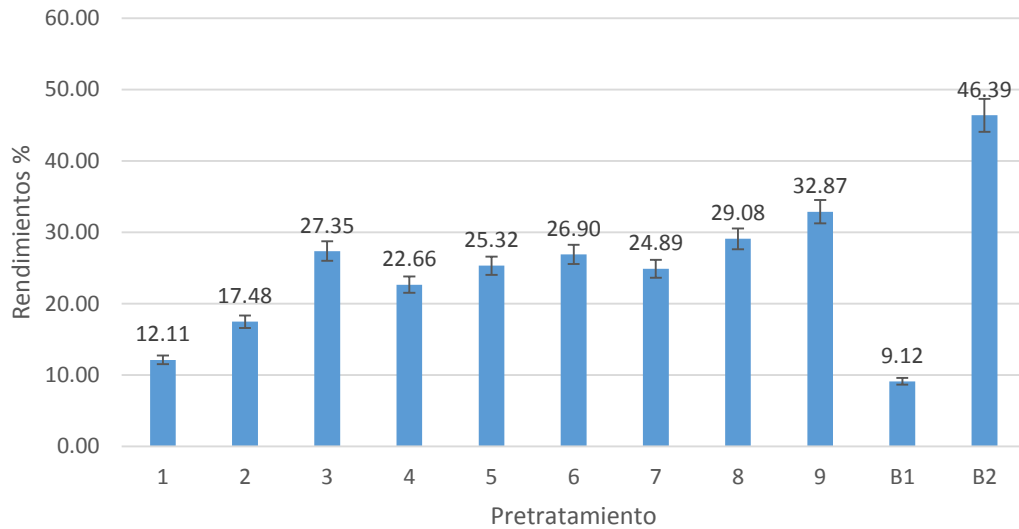


Figura 29. Gráfico de rendimientos totales por cada pretratamiento utilizado.

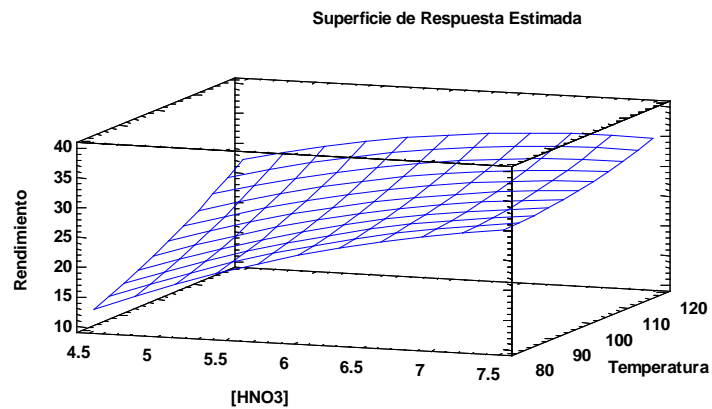


Figura 30. Gráfico de superficie de respuesta de concentración de azúcares de sacarificación enzimática a partir de diversas concentraciones de ácido nítrico contra temperaturas.

En este objetivo maximizamos nuestros azúcares totales hasta llegar a 32.87% pero en la figura 30 se observa claramente que no llegamos al óptimo deseado así que se continúa con el objetivo número 5.

**Conclusiones:** Nuestro Mejor pretratamiento es el uso de Ácido nítrico al 7.5% a una temperatura de 120°C y 30 minutos, seguido de Hidróxido de Sodio al 1% a 90°C, con un rendimiento total de 32.87% a partir de materia prima cruda.

### 8.5 Objetivo 5. Obtener las condiciones óptimas para la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática del aserrín de pino pretratado con HNO<sub>3</sub>.

Se eligen los valores máximos y mínimos a utilizar con los factores de concentración de HNO<sub>3</sub> y temperatura los cuales fueron 6.5 y 12%, 100 y 130°C respectivamente evaluando este diseño estadístico como un diseño central compuesto con 3 puntos centrales y 1 replica organizando los datos como la tabla 23.

Tabla 23. Tabla de condiciones de los pretratamientos usados y resultados de la optimización.

# Muestra	[HNO <sub>3</sub> ] (%)	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Rendimiento de pretratamientos (%)	[Azúcares] (%)	[Azúcares totales] (%)
1	9.25	93.78	30	59.31 ± 0.85	51.09 ± 1.84	30.30
2	6.5	100	30	47.15 ± 1.34	53.32 ± 2.26	25.14
3	12	100	30	48.76 ± 1.25	71.33 ± 1.98	34.78
4	5.36	115	30	45.47 ± 0.93	67.76 ± 1.84	30.81
5	9.25	115	30	49.57 ± 1.04	71.33 ± 2.16	35.36

6	13.13	115	30	44.30 ± 1.24	67.22 ± 1.75	29.78
7	6.5	130	30	50.04 ± 2.24	67.22 ± 1.97	33.63
8	12	130	30	47.97 ± 1.47	63.10 ± 2.08	30.27
9	9.25	136	30	48.99 ± 0.95	60.58 ± 1.87	29.68
B	Celulosa	-	-	-	47.72 ± 1.99	47.72

Tabla 24. Análisis de Varianza para [Azúcares reductores].

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:[HNO3]	6.0341	1	6.0341	2.39	0.1432
B:Temperatura	2.53299	1	2.53299	1.00	0.3328
AA	61.7594	1	61.7594	24.42	0.0002
AB	85.4125	1	85.4125	33.78	0.0000
BB	69.4454	1	69.4454	27.46	0.0001
bloques	51.4692	1	51.4692	20.35	0.0004
Error total	37.9323	15	2.52882		
Total (corr.)	284.839	21			

R-cuadrada = 86.6829 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 81.3561 porciento

Error estándar del est. = 1.59023

Error absoluto medio = 1.03918

Estadístico Durbin-Watson = 2.23823 (P=0.6829)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.254812

Tabla 25. Optimización de azúcares.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
[HNO3]	5.36091	13.1391	9.63357
Temperatura	93.7868	136.213	114.823

Meta: maximizar [Azúcares reductores]

Valor óptimo = 35.4205

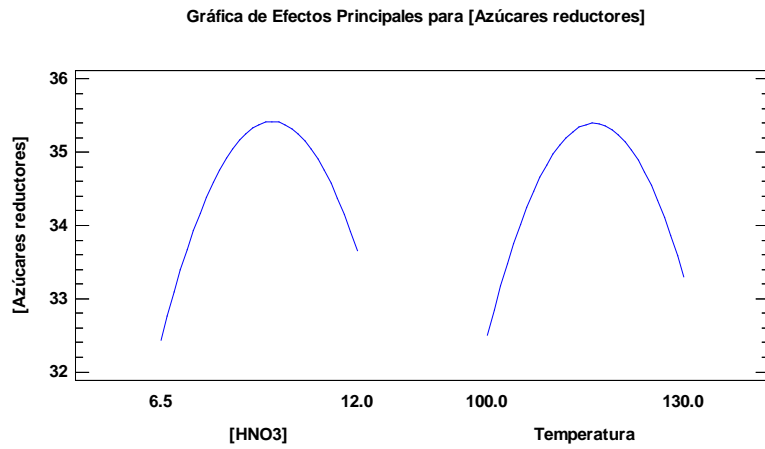


Figura 31. Gráfico de efectos principales para azúcares azúcares vs temperatura y azúcares vs  $[HNO_3]$ .

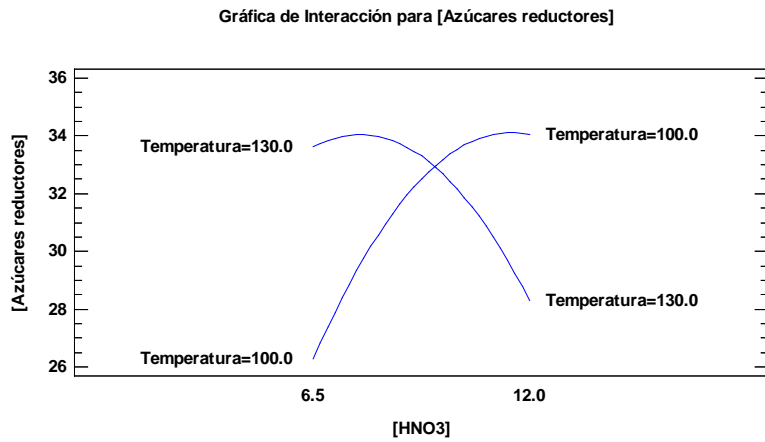


Figura 32. Gráfico de interacciones para azúcares, temperatura y  $[HNO_3]$ .

En este gráfico se observa el punto de interacción exacto donde interactúan las líneas de temperatura vs concentraciones.

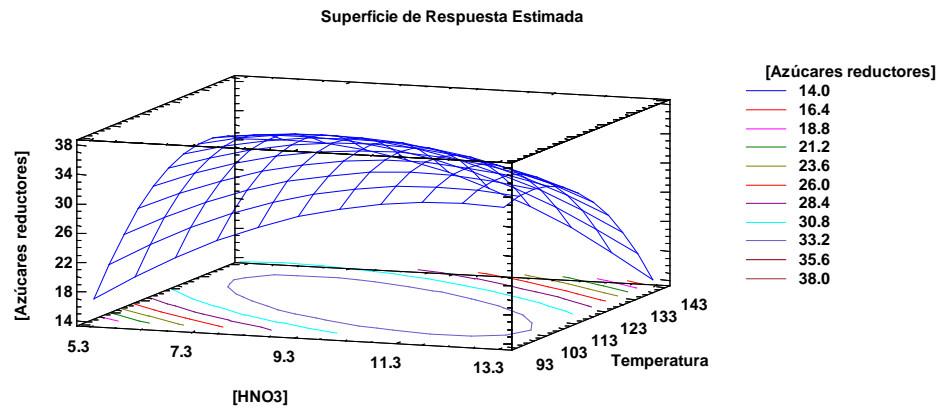


Figura 33. Gráfico de superficie de respuesta estimada para azúcares con temperatura vs [HNO<sub>3</sub>].

El gráfico de superficie de respuesta en conjunto con el de interacciones y efectos principales nos muestran visualmente los datos obtenidos experimentalmente, pero por el contrario de los dos últimos gráficos que se manejan en 2 dimensiones, el gráfico de superficie de respuesta nos deja verlo en 3 dimensiones y así darnos una idea más clara de las interacciones, puntos máximos y mínimos de los pretratamientos.

**Conclusiones:** En este objetivo se obtiene como mejor pretratamiento el uso de 9.25% de concentración de ácido nítrico, 115°C de temperatura por 30 minutos como se muestra en la tabla 25 y se logra la optimización de los factores utilizados quedando como óptimo una concentración de HNO<sub>3</sub> de 9.63% y temperatura de 114.82°C para obtener un óptimo de azúcares de 35.42%. Los valores obtenidos fueron a 132 horas de hidrólisis.

### **8.5.1. Diagrama de flujo, composición química y balance de masa por etapas con el pretratamiento óptimo (9.63% de HNO<sub>3</sub> a 114.82°C).**

#### **8.5.1.1. Pretratamiento combinado**

En la primera parte del pretratamiento combinado obtuvimos un rendimiento del 67.52% en sólido y una pérdida en el sobrenadante de 32.48% en peso después del pretratamiento de 9.63% de HNO<sub>3</sub> a 114.82°C por 30 minutos; el sólido se pasó al proceso siguiente que comprende de 1% de hidróxido de sodio a 90°C por 30 minutos y obtuvimos un rendimiento de 71.1% con respecto al sólido y una pérdida en el sobrenadante de 28.9% dando un balance global como pretratamiento combinado de 48% de sólido y 52% de sobrenadante y una composición química del pretratado de 5.67% Lignina, 94.5% Holocelulosa y 69.59% Alfa-celulosa tal como aparece en la figura 34.



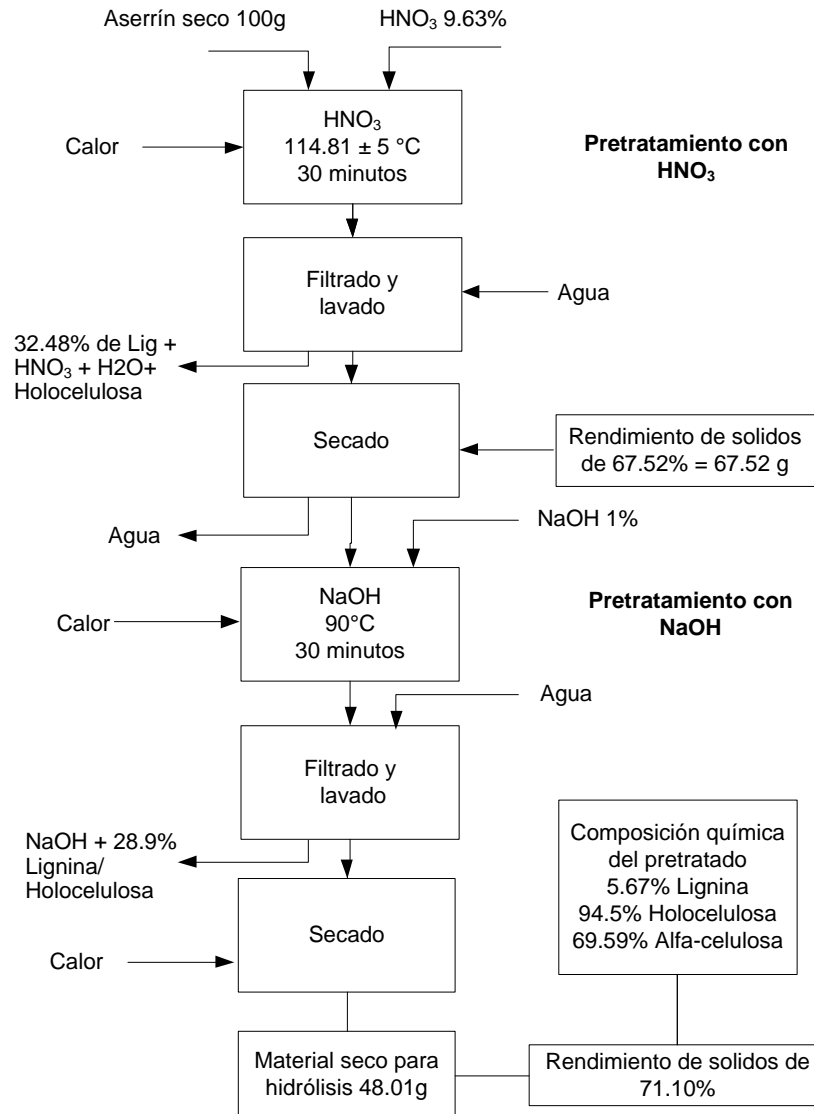


Figura 34. Diagrama de flujo, composición química y balance de masa del pretratamiento combinado.

### 8.5.1.2. Hidrólisis enzimática del pretratamiento combinado

Los sólidos del pretratamiento combinado óptimo son hidrolizados a 48°C, por 132 horas, son filtrados, lavados y secados obteniendo un rendimiento de sólidos del 28.85% y 71.15% de azúcares en el sobrenadante o filtrado, con una composición química del residuo seco de 19.53% de Lignina, 80.71% de Holocelulosa y 74.53% de Alfa-celulosa (Figura 35) y una composición química del hidrolizado de Xilosa de 6.15%, Glucosa de 68.03%, Arabinosa de 1.75%, Manosa de 2.95% y polisacáridos de 20.76%.

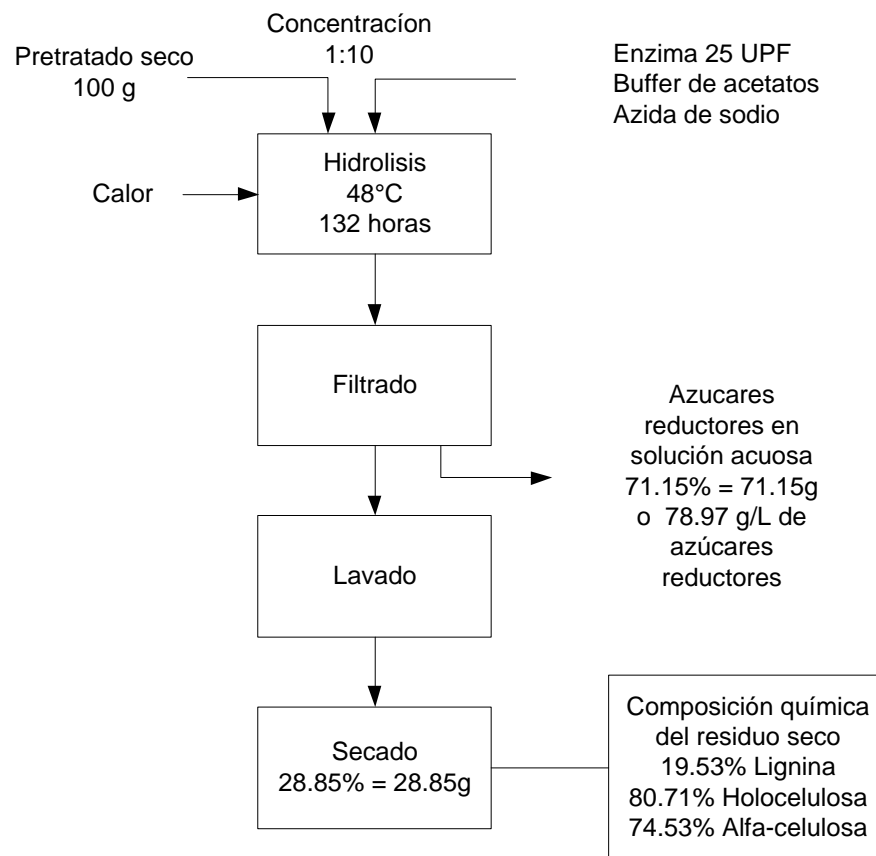


Figura 35. Diagrama de flujo, composición química y balance de masa de la hidrólisis enzimática.

### 8.5.1.3. Balance de materia global

Para el balance de materia global iniciamos con 208.33 gramos de aserrín sin pretratar con la composición de la figura 36, esto es: 63.68 gramos de lignina, 146.37 gramos de Holocelulosa y 94.57 gramos de alfa celulosa presente en la holocelulosa. Siguiendo los procesos antes descritos en las figuras 34 y 35 obtenemos un 48% de sólidos y 52% en fase acuosa después del pretratamiento; en la fase acuosa encontramos 58.01 gramos de lignina, 51.87 gramos de holocelulosa de la cual hay 13.83 gramos de glucosa y 0.23 gramos de polisacáridos. Como residuo sólido después de la hidrólisis hay 5.63 gramos de lignina, 23.28 gramos de holocelulosa y 17.35 gramos de alfacelulosa y como hidrolizado o fase acuosa hay 71.15 gramos de holocelulosa de los cuales 14.4 gramos son de alfa celulosa, 14.77 gramos de polisacáridos y otros azúcares (los polisacáridos los tomamos como dímeros o trímeros de celulosa).

Se hizo un balance de materia global donde:

$$M_{pi} = M_{pf} \text{ por lo tanto...}$$

<i>Lignina i</i> = <i>Lsh</i> + <i>Llp</i>	63.68=5.63+58.01
<i>Holocelulosa i</i> = <i>Hsh</i> + <i>Hlh</i> + <i>Hlp</i>	146.37=23.28+71.15+51.87
<i>Alfa celulosa i</i> = <i>Ash</i> + <i>Alh</i> + <i>Alp</i>	94.57=17.35+48.4+14.77+13.83+0.23

Donde:

*M<sub>pi</sub>* = Materia prima inicial

*M<sub>pf</sub>* = Materia prima final

Lignina *i* = Lignina inicial

*Lsh* = Lignina en el sólido después del hidrolizado

*Llp* = Lignina en el sobrenadante después del pretratamiento

Holocelulosa *i* = Holocelulosa inicial

*Hsh* = Holocelulosa en el sólido después del hidrolizado

Hlh = Holocelulosa en el líquido o hidrolizado

Hlp = Holocelulosa en el sobrenadante después del pretratamiento

Ash = Alfa celulosa en el sólido después del hidrolizado

Alh = Alfa celulosa en el líquido o hidrolizado

Alp = Alfa celulosa en el sobrenadante después del pretratamiento

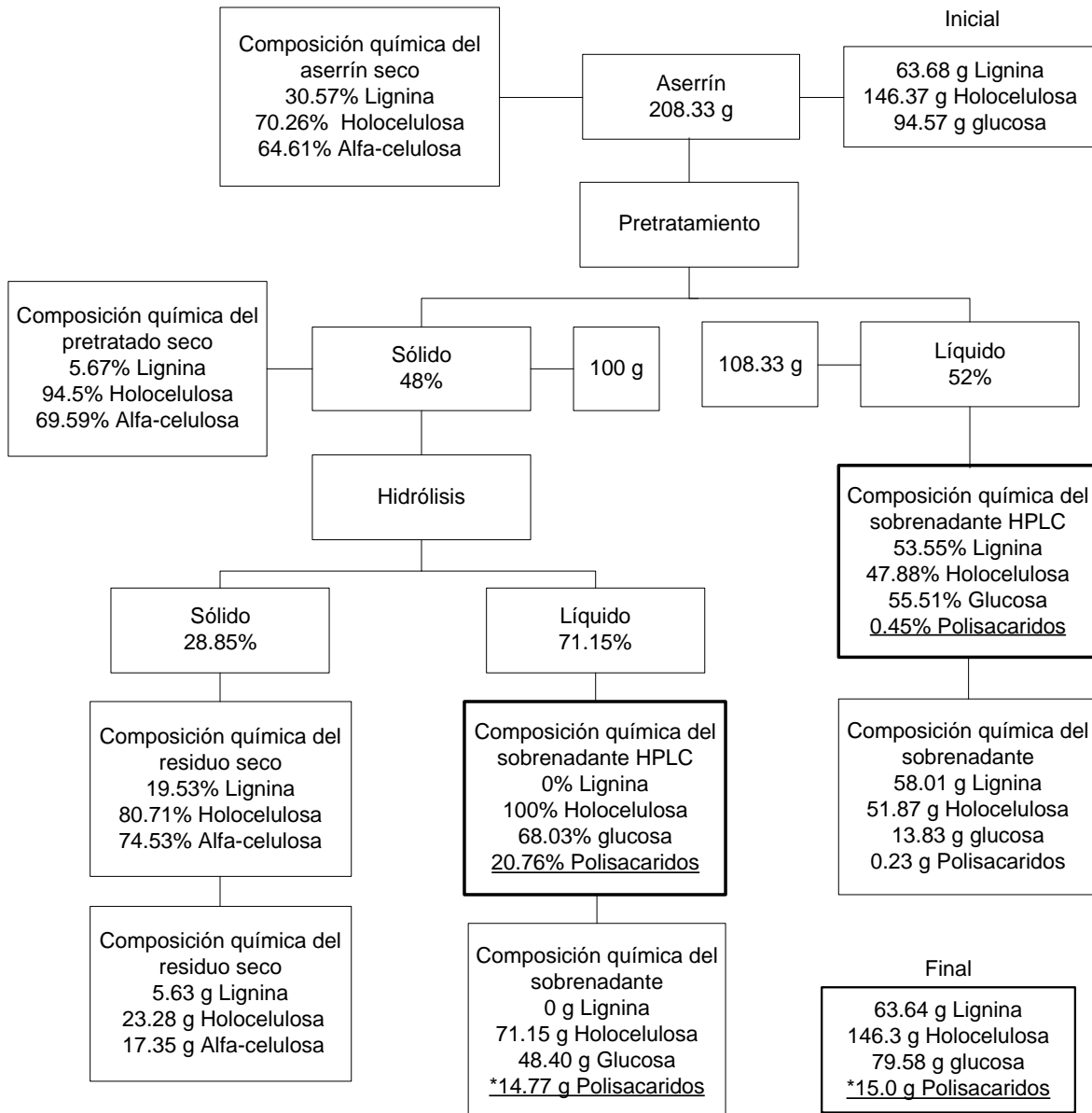


Figura 36. Diagrama de flujo, composición química y balance de masa global del pretratamiento óptimo y su hidrólisis.

### 8.6 Objetivo 6. Sacarificación y fermentación simultánea.

Durante la primera etapa del proceso de producción se presenta un aumento continuo en el contenido de etanol producido, la concentración de glucosa residual es de 0.26 g/L la cual es baja, lo que muestra un buen desempeño de fermentación de la levadura, ya que la glucosa reportada es únicamente la que no se alcanzó a consumir por la levadura. A las 36 horas del proceso la concentración de etanol comienza a decaer, lo que indica que ya no hay azúcares disponibles para el consumo de la levadura como se muestra en la figura 37.

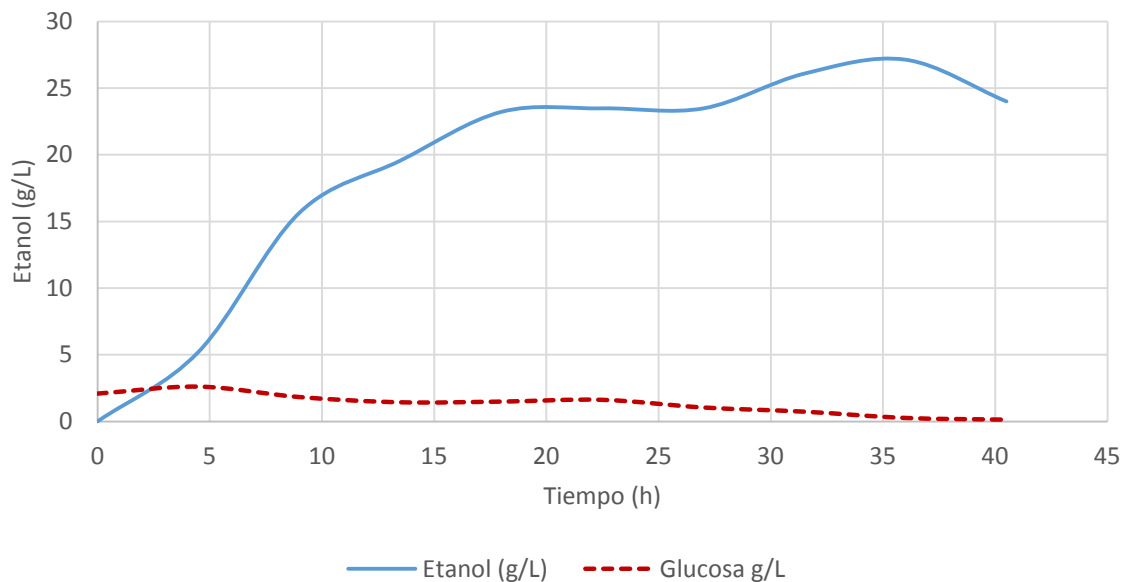


Figura 37. Gráfico de proceso de sacarificación y fermentación simultánea.

La fermentación de los azúcares presentes en los materiales renovables está influenciada por factores como la concentración de azúcares del sustrato y el microorganismo utilizado. En la cinética de producción de etanol con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITD-00185, así como un consumo de glucosa liberada en la hidrólisis de 53.72 g/L y una producción de etanol de 27.39 g/L.

El porcentaje del rendimiento teórico de etanol se calculó con la cuantificación de glucosa liberada de la hidrólisis enzimática, y una conversión de glucosa a etanol máxima de 0.51 g/g y se corroboró con HPLC.

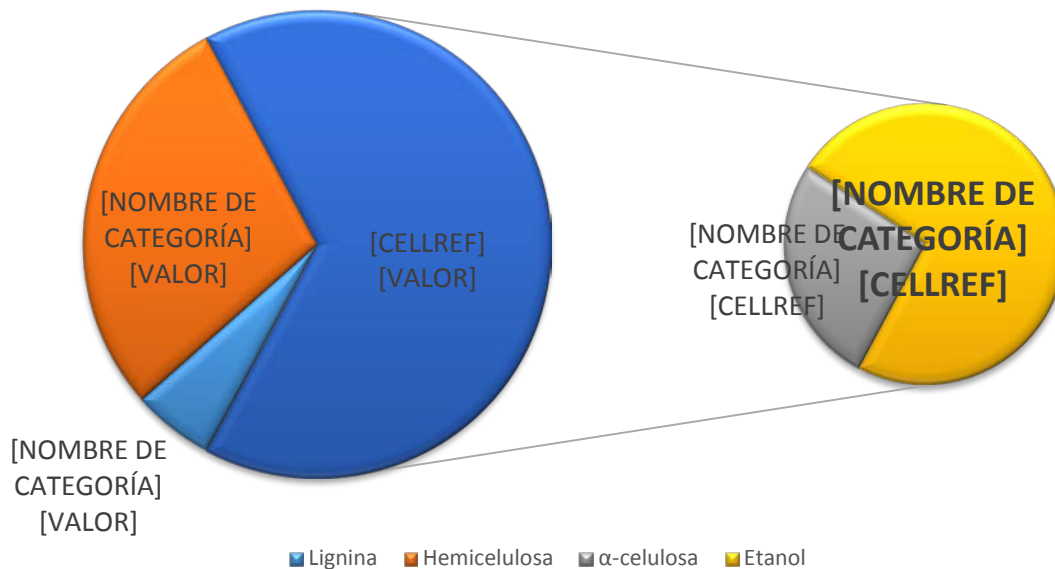


Figura 38. Rendimiento teórico máximo de etanol en base al análisis químico del pretratado.

Se calcularon en base a la cantidad de glucosa contenida en la biomasa pretratada y de acuerdo al rendimiento teórico máximo de etanol, con lo cual se obtuvieron valores de 73.61% tal como se muestra en la figura 35; estos datos son altos comparados con Ballesteros et al. (2004) con paja de trigo con producción de etanol con concentración de 18.1g/L y un rendimiento de 62.5%, Vázquez-Ortega (2013) con paja de frijol con una concentración de 10.50 g/L y rendimiento de 50.59% y con un rendimiento similar pero concentración más baja de etanol con Saucedo Saucedo-Luna et al. (2010) con bagazo de *Agave tequilana* con producción de etanol con concentración de 41 g/L y un rendimiento de 73.6%. Ballesteros et al. (2004), donde indica que los rendimientos del proceso de Sacarificación y fermentación simultáneas se encuentran dentro del rango de 50 a

72%. Con los rendimientos calculados, se pudo definir que por cada tonelada de aserrín se pueden producir 131.53 L de etanol.

La ventaja de esta metodología es que podemos obtener altas concentraciones de glucosa en los hidrolizados a razón de 68.03% y por lo tanto una alta concentración de etanol de 27.39 g/L; esto es que el 48.4% de la celulosa en la materia pretratada es convertida en glucosa totalmente hidrolizada.

Todo lo anterior nos indica que los residuos como el aserrín pueden ser usados para la producción de azúcares reductores y por lo tanto para la producción de bioetanol.

**Conclusiones:** Bajo la condiciones óptimas de pretratamiento ( $\text{HNO}_3$  de 9.63%, 114.82°C y 30 minutos) se obtuvo un rendimiento de 35.42% de azúcares reductores respecto a la biomasa inicial y 71.15% respecto a la biomasa pretratada con un rendimiento de etanol del 73.61% a partir del pretratado y una concentración final de 27.39 g/L de etanol.

## 9. CONCLUSIONES

Con el uso del ácido nítrico e hidróxido de sodio se observa un aumento del rendimiento de los azúcares fermentables y menor tiempo de fermentado de los sólidos respecto a las anteriores condiciones de pretratamientos y al aserrín sin pretratar; también podemos observar que la eficiencia de la hidrólisis con el pretratamiento del ácido nítrico es incluso mayor que la celulosa pura, esto nos indica que el pretratamiento combinado además de retirar la lignina y parte de hemicelulosas del aserrín ayuda a convertir parte de la celulosa cristalina a celulosa amorfa y así ayudar a las enzimas a aumentar la eficiencia facilitando su trabajo en la hidrólisis.

La optimización del tratamiento ácido por el método de superficie de respuesta mostró que las condiciones óptimas son: tiempo de pretratamiento de 30 minutos, concentración de  $\text{HNO}_3$  al 9.63%, temperatura de pretratamiento de  $114.81^\circ\text{C}$ , tiempo de hidrólisis de 132 horas. Bajo estas condiciones se obtuvo un rendimiento de 35.42% de azúcares reductores respecto a la biomasa inicial y 71.15% respecto a la biomasa pretratada.

La ventaja de esta metodología es que podemos obtener altas concentraciones de glucosa en los hidrolizados y por lo tanto una alta concentración de etanol de 27.39 g/L.

Todo lo anterior nos indica que los residuos como el aserrín pueden ser usados para la producción de azúcares reductores y por lo tanto para la producción de bioetanol.

**Objetivo 1.** Los valores obtenidos son comparables con estudios anteriores. Las diferencias encontradas dependen de la temporada de corte del árbol muestra, lugar de crecimiento, fertilizantes usados y condiciones de almacenamiento (Boer and Den Uil 1997).

**Objetivo 2.** Se puede identificar claramente que el mejor pretratamiento es el uso del pretratamiento combinado comparado con los otros 4 pretratamientos usados.

**Objetivo 3.** Al realizar el anova correspondiente nos indica que la temperatura y la concentración del ácido tiene efecto significativo sobre los resultados obtenidos pero que el tiempo de pretratamiento no influye de manera significativa a los rendimientos de la hidrólisis; por lo tanto, el mejor rendimiento se obtuvo para el pretratamiento “7” (6% de ácido nítrico, 100°C y 30 minutos).

**Objetivo 4.** Nuestro Mejor pretratamiento es el uso de Ácido nítrico al 7.5% a una temperatura de 120°C y 30 minutos, seguido de Hidróxido de Sodio al 1% a 90°C, con un rendimiento total de 32.87% a partir de materia prima cruda.

**Objetivo 5.** En este objetivo se obtiene como mejor pretratamiento el uso de 9.25% de concentración de ácido nítrico, 115°C de temperatura por 30 minutos y se logra la optimización de los factores utilizados quedando como óptimo una concentración de HNO<sub>3</sub> de 9.63% y temperatura de 114.82°C para obtener un óptimo de azúcares de 35.42%. Los valores obtenidos fueron a 132 horas de hidrólisis.

**Objetivo 6.** Bajo la condiciones óptimas de pretratamiento (HNO<sub>3</sub> de 9.63%, 114.82°C y 30 minutos) se obtuvo un rendimiento de 35.42% de azúcares reductores respecto a la biomasa inicial y 71.15% respecto a la biomasa pretratada con un rendimiento de etanol del 73.61% a partir del pretratado y una concentración final de 27.39 g/L de etanol.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis.

Ahring, B. K., K. Jensen, P. Nielsen, A. Bjerre & A. Schmidt (1996) Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*, 58, 107-113.

Åkerholm, M. & L. Salmén (2001) Interactions between wood polymers studied by dynamic FT-IR spectroscopy. *Polymer*, 42, 963-969.

Akerholm, M. & y. L. Salmén (2002) Dynamic FTIR spectroscopy for carbohydrate analysis of wood pulps. *Journal of pulp and paper science*, 28, 245-249.

Alhasan, A. M., D. Kuang, A. B. Mohammad & R. R. Sharma-Shivappa (2010) Combined effect of nitric acid and sodium hydroxide pretreatments on enzymatic saccharification of rubber wood (*heavea brasiliensis*). *International Journal of Chemical Technology*, 2, 12-20.

Álvarez, J. A., C. S. Fresno, R. F. Portabales & M. B. Perdices (2013) Proyecto de viabilidad de una planta de bioetanol con un sistema de cogeneración. *Proyecto Fin de Máster, Máster en Energías Renovables y Mercado Energético*.

Álvarez, M. C. (2009) Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, 359, 63-89.

ASTM (1977) Standard test methods for lignin wood. *American National Standard (1977)*.

Atev, A., C. A. Panayotov, L. Bobareva, L. Damyanova & U. Nicolova (1987) Studies on biosynthesis of hydrolases by trichoderma sp. M7 on submerged and solid-state cultivation conditions. *Acta biotechnologica*, 7, 9-16.

Awasthi, M., J. Kaur & S. Rana (2013) Bioethanol production through water hyacinth, *Eichhornia crassipes* via optimization of the pretreatment conditions. *IJ E. Technol*, 3, 42-46.

Ballesteros, I. 2001. *Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS)*.

Ballesteros, M., J. Oliva, M. Negro, P. Manzanares & I. Ballesteros (2004) Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39, 1843-1848.

Barnett, J., R. Payne & D. Yarrow. 1990. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge.

Ben-Bassat, A., R. J. Lamed, T. K. Ng & J. G. Zeikus. 1983. Use of co-cultures in the production of ethanol by the fermentation of biomass. Google Patents.

Boer, A. d. & H. Den Uil. 1997. *An evaluation of three routes for the production of liquid fuels from biomass*. ECN-report ECN.

Bravo, E. (2007) Encendiendo el debate sobre biocombustibles: cultivos energéticos y soberanía alimentaria en América Latina. *Ediciones Le Monde diplomatique "el diplo"/Capital Intelectual, Bs. As.*

- Brown, R. M. (2004) Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 487-495.
- Bu'lock, J. & B. Kristiansen (1987) *Biología Básica*, Ed. *Acribia SA: Zaragoza*, 195.
- Bu'lock, J. & B. Kristiansen (1991) *Introducción a la Biología Básica en: Biología Básica. Barcelona, Ed. Acribia SA*, 3-10.
- Buranov, A. U. & G. Mazza (2008) Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, 28, 237-259.
- Canché-Escamilla, G., D. Los Santos-Hernández, S. Andrade-Canto & R. Gómez-Cruz (2005) Obtención de celulosa a partir de los desechos agrícolas del banano. *Información tecnológica*, 16, 83-88.
- CONAE (2006) *Combustibles y Combustibles y biocombustibles. Seminario Internacional de Biocombustibles Organización Latinoamericana de Energía, Brasilia, Brasil, abril de 2006*, <http://www.olade.org/biocombustibles/Documents/PDF-22-6%20Mexico.pdf>.
- Cuzens, J. E. & W. A. Farone. 1996. Method of separating acids and sugars resulting from strong acid hydrolysis. Google Patents.
- Chaplin, M. F. & J. F. Kennedy. 1994. *Carbohydrate analysis: a practical approach*. IRL Press Ltd.
- Dahlman, O., A. Jacobs & J. Sjöberg (2003) Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. *Cellulose*, 10, 325-334.

- Evers, A. D., L. O'Brien & A. B. Blakeney (1999) Cereal structure and composition. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50, 629-650.
- Fengel, D. & G. Wegener. 1983. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter.
- Galbe, M. & G. Zacchi (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 618-628.
- Glazer, A. N. & H. Nikaido. 2007. *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. Cambridge University Press.
- Gregg, D. & J. N. Saddler. 1996. A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. In *Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 711-727. Springer.
- Guerra, F. J., Mallén, C., Struck, A., Varela, T. (2008) Proyecto Final: Producción de Bioetanol. Laboratorio de Procesos de Separación.
- Higuchi, T. (1990) Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Science and Technology*, 24, 23-63.
- Holtzapple, M., J.-H. Jun, G. Ashok, S. Patibandla & B. Dale (1991) The ammonia freeze explosion (AFEX) process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28-29, 59-74.
- INEGI (2008) Agenda Estadística de los Estados Unidos Mexicanos. [http://www.inegi.gob.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/agenda/2008/Agenda\\_2008.pdf](http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/agenda/2008/Agenda_2008.pdf).

- Jolkin, Y. (1989) Tecnología de las producciones hidrolíticas. *Edit. Lesnaya Prom. Moscú.*
- Leon, C. d. (1991) Untersuchung des technologischen Gebrauchswertes der mexikanische Kiefernart *P. pseudostrobus* Lindley. Dissertation, Forstliche Fakultät der Universität Gottingen. .
- Lima, L. 2013. Evaluación de la composición química y propiedades físicas de madera y corteza de cuatro coníferas para la producción de bioenergía. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- López-Miranda, J., N. O. Soto-Cruz, O. M. Rutiaga-Quiñones, H. Medrano-Roldán & K. Arévalo-Niño (2009) Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25, 95-102.
- Lynd, L. R. (1996) Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annual review of energy and the environment*, 21, 403-465.
- Malmström\*, K., J. Savolainen & E. O. Terho (1999) Allergic alveolitis from pine sawdust. *Allergy*, 54, 532-533.
- Mandels, M. & D. Sternberg (1976) Recent advances in cellulase technology. *Journal of Fermentation Technology (Japan)*.
- Marten, M. R., S. Velkovska, S. A. Khan & D. F. Ollis (1996) Rheological, mass transfer, and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Biotechnology progress*, 12, 602-611.

- Martínez-Guzman, A. (2011) Efecto del método de pretratamiento sobre la sacarificación enzimática de biomasa lignocelulósica. *Tesis de Maestría*.
- Martínez, J. M., J. Reguant, M. Á. Montero, D. Montané, J. Salvadó & X. Farriol (1997) Hydrolytic pretreatment of softwood and almond shells. Degree of polymerization and enzymatic digestibility of the cellulose fraction. *Industrial & engineering chemistry research*, 36, 688-696.
- Mc Cabe, A., J. Polaina Molina, M. Sánchez Hervás, S. Vallés Alventosa, P. Manzanares, P. Martorell Guerola, D. Ramón Vidal & S. Genovés Martínez (2011) Endoxilanas termorresistente obtenida por mutagénesis y su aplicación al proceso de obtención de bioetanol.
- McKendry, P. (2002) Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource technology*, 83, 37-46.
- McLean, B. W., A. B. Boraston, D. Brouwer, N. Sanaie, C. A. Fyfe, R. A. J. Warren, D. G. Kilburn & C. A. Haynes (2002) Carbohydrate-binding modules recognize fine substructures of cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 50245-50254.
- Mesa, L., E. González, C. Cara, M. González, E. Castro & S. I. Mussatto (2011) The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Journal*, 168, 1157-1162.
- Miliarium (2008) Análisis de Riesgos Ambientales, Naciones 9, 28006 Madrid (España).
- Millett, M. A., A. J. Baker & L. D. Satter. 1976. *Pretreatments to enhance chemical, enzymatic, and microbiological attack of cellulosic materials*. US Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory.

- Ng, T. K., A. Ben-Bassat & J. Zeikus (1981) Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Applied and environmental microbiology*, 41, 1337-1343.
- Noack, D. (1995) Cómo aprovechar mejor las maderas de los trópicos. *Actualidad Forestal Tropical (Boletín de la OIMT)*, 3, 12-13.
- Nobles, D. R., D. K. Romanovicz & R. M. Brown (2001) Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant physiology*, 127, 529-542.
- Ojumu, T. & O. Ogunkunle (2005) Production of glucose from lignocellulosic under extremely low acid and high temperature in batch process, auto-hydrolysis approach. *Journal of Applied Sciences*, 5, 15-17.
- Oliva-Domínguez, J. 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Palonen, H., A. Thomsen, M. Tenkanen, A. Schmidt & L. Viikari (2004) Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 117, 1-17.
- Pejó, T. & M. Elía. 2010. *Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas de proceso*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Pérez-Jiménez, J.-A. (2014) Estudio del pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo para su conversión biológica a etanol.

- Ramdahl, T. & G. Becher (1982) Characterization of polynuclear aromatic hydrocarbon derivatives in emissions from wood and cereal straw combustion. *Analytica Chimica Acta*, 144, 83-91.
- Ranatunga, T. D., J. Jervis, R. F. Helm, J. D. McMillan & R. J. Wooley (2000) The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme and microbial technology*, 27, 240-247.
- Runkel, R. & K. Wilke (1951) Chemical composition and properties of wood heated at 140C to 200C in a closed system without free space. Part II. *Holz Roh Werkst*, 9, 260-70.
- Rutiaga-Quiñones, J. G. 2001. *Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen*. Buchverl. Gräfelfing.
- Saeman, J. F. (1945) Kinetics of wood saccharification-hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature. *Industrial & Engineering Chemistry*, 37, 43-52.
- Saha, B. C. & M. A. Cotta (2006) Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnology Progress*, 22, 449-453.
- Saha, B. C., L. B. Iten, M. A. Cotta & Y. V. Wu (2005) Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, 40, 3693-3700.

- Sandermann, W. & M. Rothkamm (1959) Über die Bestimmung der pH-Werte von Handelshölzern und deren Bedeutung für die Praxis. *Holz als roh-und werkstoff*, 17, 433-440.
- Saucedo-Luna, J., A. Castro-Montoya, M. Chávez-Parga & J. Campos-García (2010) Sacarificación del bagazo de agave tequilana weber.
- Schell, D. J., J. Farmer, M. Newman & J. D. McMILLAN. 2003. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 69-85. Springer.
- SEMARNAP (2000) Guía forestal. Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca, México, D. F., 105 pp.
- Sheehan, J. & M. Himmel (1999) Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the US Department of Energy's research and development activities for bioethanol. *Biotechnology Progress*, 15, 817-827.
- Shimizu, K. (1991) Chemistry of hemicelluloses. *Wood and cellulosic chemistry*, 177-214.
- Shimizu, K., K. Sudo, H. Ono, M. Ishihara, T. Fujii & S. Hishiyama (1998) Integrated process for total utilization of wood components by steam-explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 14, 195-203.
- Solomon, S. 2007. *Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC*. Cambridge University Press.

- Sun, R., J. M. Fang, P. Rowlands & J. Bolton (1998) Physicochemical and Thermal Characterization of Wheat Straw Hemicelluloses and Cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2804-2809.
- Taherzadeh, M. J., R. Eklund, L. Gustafsson, C. Niklasson & G. Lidén (1997) Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 36, 4659-4665.
- TAPPI, T. (2000) Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 205 sp-06. *Forming handsheets for physical tests of pulp*.
- Texas, S. d. (2004) Peligros y Control del Aserrín. División de Compensación para Trabajadores. (TDI/DWC). Pub No. HS98-134B (9-04). Austin, Texas.
- Thring, R. W., E. Chornet & R. P. Overend (1990) Recovery of a solvolytic lignin: Effects of spent liquor/acid volume ratio, acid concentration and temperature. *Biomass*, 23, 289-305.
- Tomas-Pejo, E., J. Oliva & M. Ballesteros (2008) Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67, 874.
- Torget, R. W., J. S. Kim & Y. Lee (2000) Fundamental aspects of dilute acid hydrolysis/fractionation kinetics of hardwood carbohydrates. 1. Cellulose hydrolysis. *Industrial & engineering chemistry research*, 39, 2817-2825.
- Tuor, U., K. Winterhalter & A. Fiechter (1995) Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, 41, 1-17.

Ucar, G. & M. Balaban (2003) Hydrolysis of polysaccharides with 77% sulfuric acid for quantitative saccharification. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 27, 361-382.

Valencia, M. & F. López (1999) Variación de la densidad de la madera dentro y entre árboles de *Pinus rudis* Endl. *Sierra Las Alazanas, Arteaga, Coah. Foresta-AN. Nota Técnica*.

Vázquez-Contreras (2003) E. Bioquímica y Biología Molecular en Línea. *Instituto de Química, UNAM*.

Vázquez-Ortega, P. (2013) Producción de etanol de segunda generación por medio del proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. *Tesis de Maestría*.

Wise, L. E., M. Murphy & A. A. d'Addieco (1946) Chlorite Holocellulose, its Fractionation and Bearing on Summative Wood Analysis and on Studies on the Hemicelluloses. *Paper Tr. J.*, 122, 35.

www.infocana.gob.mx Bases técnicas para el fomento para la producción de biocombustibles en el país a partir de caña de azúcar 2010. [http://www.infocana.gob.mx/materiales/Web\\_BIOCOMBUSTIBLES.pdf](http://www.infocana.gob.mx/materiales/Web_BIOCOMBUSTIBLES.pdf), consultado 24 de Noviembre 2012.

www.juventudrebelde.cu Nuevo proyecto para utilizar el aserrín de forma ecológica. <http://www.juventudrebelde.cu/cuba/2007-07-31/nuevo-proyecto-para-utilizar-el-aserrin-de-forma-ecologica/> Cuba Revisado 5 de Diciembre 2012.

Wyman, C. E. (1994) Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. *Bioresource Technology*, 50, 3-15.

Wyman, C. E., B. E. Dale, R. T. Elander, M. Holtzapple, M. R. Ladisch & Y. Lee (2005) Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource technology*, 96, 1959-1966.

Zeikus, J. (1980) Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 34, 423-464.

Zhang, Y. H. P. & L. R. Lynd (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*, 88, 797-824.

Zogaj, X., M. Nitz, M. Rohde, W. Bokranz & U. Römling (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39, 1452-1463.

## **Anexos**

### **Determinación de lignina**

Las muestras se desecaron hasta peso constante en la estufa a una temperatura de 100°C durante 8 horas. Se desecaron las cápsulas vacías en la estufa durante 20 minutos y se transfirieron al desecador 10 minutos, posteriormente se pesaron. En una balanza analítica (Adventurer) se pesó 1 g de cada muestra y se depositaron en matraces Erlenmeyer de 250ml, se les añadieron 25 ml de ácido sulfúrico (pureza del 96%, al 72%) y 2.5 ml de ácido bromhídrico (al 40%), se taparon y se dejaron reposar durante dos horas. Posteriormente cada matraz se le agregó 100 ml de agua destilada. Los matraces se colocaron en parrillas eléctricas y se mantuvieron en hervor durante 5 minutos, para después dejarse enfriar un poco. Posteriormente manteniendo la muestra en papel filtro, se filtró a vacío y se lavó perfectamente con agua destilada caliente, hasta eliminar los ácidos del papel filtro, realizando una prueba indicadora de ausencia de ácido con papel tornasol. El sólido se transfirió a cajas de aluminio taradas, posteriormente se introdujeron a la estufa donde permanecieron durante 12 horas a 105°C. Transcurrido el tiempo se retiraron las cápsulas de la estufa, se pasaron al desecador y se enfriaron. Una vez que las cajas se enfriaron, se pesaron. Se desecó durante una hora adicional para comprobar que se alcanzó el peso constante (Runkel y Wilke, 1995).

### **Cálculo:**

% Lignina:  $(W \text{ lignina} / Psc \text{ harina}) * 100$

$Psc = 1 - (\%H) / 100 * Ph$

Donde:

Psc= Peso seco calculado

%H = Porcentaje de humedad en la muestra

Ph = Peso húmedo

## **Determinación de holocelulosa (Wise, 1946)**

### **Procedimiento**

Se pesaron 2 g. de madera libre de extraíbles (el tamaño de partícula fue el que pasó por malla 40 y fue retenido en malla 60), se colocó la muestra en un matraz Erlenmeyer de boca ancha de 250 ml y se agregó una solución que contenía 0.6 g de clorito de sodio en 69 mL de agua a la que previamente se le añadieron 4 gotas de ácido acético.

Se mantuvo el matraz tapado con un vidrio de reloj y se dejó en baño de agua a 75°C durante una hora agitando ocasionalmente.

Después de una hora se le adicionaron 4 gotas del ácido y 0.6 g del clorito de sodio lentamente, se agitó y se dejó reposar. Se repitió el procedimiento anterior una hora después, se dejó reposar y se repite una vez más (4 horas en total o hasta que tome un color blanco).

Se dejó enfriar la muestra poniendo el matraz de reacción en un recipiente que contenía agua con hielo. Posteriormente sobre un filtro de vidrio de porosidad media que previamente fue pesado en una balanza, se hizo pasar el contenido del matraz de reacción aplicando vacío.

El material separado se lavó con agua fría destilada y luego con acetona.

Finalmente se pasó a una estufa de secado y se dejó secar hasta peso constante a la temperatura de 40°C, para posteriormente dejar la holocelulosa separada en un desecador. El contenido de holocelulosa del material a analizar se reportará como porcentaje.

### **Determinación de alfa-celulosa (ASTM D 1103-60, 1977)**

La  $\alpha$ -celulosa debe ser determinada sobre madera libre de lignina y de extraíbles (Harina usada para determinación de holocelulosa).

#### **Equipos**

Baño maría con termostato o cualquier otro aparato para mantener -la temperatura de  $20 \pm 0.1$  °C y lo suficientemente grande para contener 3 vasos de precipitados de 250 mL en posición vertical.

Crisoles-filtro de vidrio "frited" de porosidad mediana.

#### **Reactivos**

Solución de hidróxido de sodio ( $17.5 \pm 0.1\%$ )

NOTA 2. La solución de sosa (17.5%) prácticamente libre de carbonato, se preparó diluyendo NaOH (50%) con agua destilada libre de CO<sub>2</sub>. La solución de NaOH (50%) se mantuvo en existencia, (el carbonato de sodio y otras impurezas insolubles pueden precipitarse). Se diluyó la solución libre de precipitado para preparar una solución de 17.5%, la concentración a la cual será  $17.5\% \pm 0.1\%$  de NaOH.

#### **Solución de sosa (8.3%)**

La solución de sosa (8.3%) se preparó por dilución de NaOH (50%) con agua destilada.

Ácido acético (10%). Se mezcló una parte en peso de ácido acético glacial con 9 partes de agua destilada.

#### **Procedimiento**

Se pesa 1.0g de materia prima (holocelulosa) secada a 105°C por 8 horas, se midieron 12.5 ml de solución de sosa (17.5%) en una probeta graduada, se ajustó y se mantuvo a 20°C. Se agregaron 2.5 ml de solución de sosa a la holocelulosa en un vaso de precipitados de 250 ml, el cual se mantuvo a 20°C en un baño de agua y se cubrió con un vidrio de reloj. Se agito ligeramente la holocelulosa con una varilla de vidrio con punta plana (10 mm de •diámetro) manteniendo la materia prima completamente con la solución de sosa. Posteriormente después de 2 minutos se remueve con la varilla presionando y

removiendo hasta que las partículas estén separadas unas de otras. Después de cinco minutos se agregó la primera porción de sosa (17.5%), se agregaron 2.5 ml más de la solución de sosa y se removió totalmente la mezcla con la varilla. Posteriormente después de otros 5 minutos añadir 2.5 ml de sosa y se agito.

Después de 15 minutos de la adición de la primera porción de sosa se agregó 2.5 ml de sosa y se agito nuevamente con la varilla de vidrio. Se dejó reposar la mezcla a 20°C durante 30 minutos, haciendo un total de 45 minutos para el tratamiento con NaOH.

Al termino de los 45 minutos del tratamiento cáustico, se agregaron 16.5 ml de agua destilada a 20°C a la mezcla. Posteriormente se agito la mezcla contenida en el vaso de precipitados y se dejó reposar a 20°C durante una hora, antes de filtrarlo.

La adición de los 16.5 ml de agua a los 12.5 ml de la solución de sosa original (17.5%) reduce la concentración de sosa a 8.3%

Se filtró la celulosa con ayuda de succión en un crisol de vidrio resistente a álcalis de porosidad mediano. Posteriormente todo el residuo de holocelulosa se pasó al crisol y se continuó el lavado con agua destilada a 20°C, asegurándose de que todas las partículas hayan pasado del vaso de precipitados al crisol. Éste paso se repitió dos veces.

Se vaciaron 7.5 ml de ácido acético al 10% en el crisol, cubriendo el material y se mantuvo el ácido en el material por tres minutos más, posteriormente se lavó con agua destilada a 20°C y se drenó completamente. Se repitió el lavado hasta que el residuo de celulosa quedo libre de ácido, posteriormente se realizó una prueba indicadora de ausencia de ácido a la pulpa lavada, con papel tornasol.

Finalmente se secó el fondo y los lados del crisol con un paño, para luego dejarlos toda la noche en un horno para secar a una temperatura de 100-105°C.

Después de ese tiempo, se enfrían en un desecador por una hora, antes de pesarlos.

### **Cálculos y Reporte**

Se calcula el porcentaje (%) de  $\alpha$ -celulosa en base al peso seco de la muestra de madera seca en estufa, de la siguiente manera:

$$\% \text{ de } \alpha\text{-celulosa} = (w_2 - w_1) \times 100$$

Donde:

$w_1$  = Peso de la muestra original de madera seca en estufa.

$w_2$  = Peso del residuo de  $\alpha$ -celulosa secada en estufa.

### **Solubilidad en solventes orgánicos**

La obtención de extractos se realiza utilizando los siguientes solventes de polaridad ascendente: ciclohexano, acetona, metanol y agua caliente, de manera sucesiva. Para los solventes orgánicos de polaridad ascendente se emplean equipos Soxhlet, siendo las extracciones por periodos de 6 horas por solvente.

Para las extracciones en agua caliente se emplearon condensadores durante 4 horas a reflujo. Una vez terminados los periodos de extracciones se obtendrá la harina libre de extraíbles.

Los solventes son recuperados en un rotavapor aplicando vacío y el extracto respectivo fue colocado en un desecador hasta peso constante.

### **Ensayo de papel filtro**

Buffer de acetatos 0.05 M:

1 L de ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 0.10 M (2.97 ml en 1 L de agua destilada).

1 L de acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 0.05 M (6.47 g en 1 L de agua destilada).

El pH se ajustó a 4.7 y se diluyó a 2L. Se utilizó el extracto enzimático comercial

Celluclast 1.5L NOVOZYMES. Se preparó una solución de glucosa de concentración 1 g/L para la elaboración de la curva de calibración (figura 7).

Se disolvieron 0.1 g de celulosa en 10 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M.

Luego se enrollaron las tiras de papel filtro y se colocaron en tubos de prueba. Se adicionaron 0.5 mL de la solución enzimática y 1.0 mL de solución buffer. Se mezcló brevemente con formación de vortex y se incubó por durante una hora a 50°C. La reacción se detuvo por inmersión de los tubos en un baño con hielo. Se tomaron 0.1 mL de muestra y se adicionó agua hasta completar 1 ml.

Posteriormente se adicionaron 3 mL de reactivo DNS a cada tubo para detener la reacción, se agitaron vigorosamente, luego se colocaron en un baño de agua a ebullición durante cinco minutos. Las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente, se transfirieron a celdas calorimétricas y se leyó la absorbancia a 550 nm con el espectrofotómetro (Turner SP-830), utilizando agua como blanco. Se leyó la concentración de glucosa que corresponde a la absorbancia desde la curva de calibración.

### **Actividad Enzimática**

De acuerdo a la Unión Internacional de bioquímica, una unidad internacional de enzima (IU), fue definida como el potencial que puede catalizar un  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto. La actividad de la celulosa es equivalente a la potencia para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto. Frecuentemente se emplea papel filtro como sustrato para la medición de la actividad celulítica, debido a que su composición está bien definida, dando resultados reproducibles. La (IU) obtenidos con papel filtro (FPU), se conoce como la unidad de papel filtro (FPU).

### **Material:**

Papel filtro Whatman No. 1, cortado en tiras de 1 x 6 cm (50 mg).

Buffer de acetatos de sodio 0.1 M y pH=4.7.

Extracto enzimático Comercial: Cellucats 1.5 Novozyme.

Estándares de glucosa, diluidos en Buffer de acetatos de sodio.

Reactivo DNS, para la cuantificación de glucosa.

**Metodología:**

1 mL de enzima, se diluye en 9 mL de buffer de acetatos (1:10)

0.5 ml de solución enzimática diluida, 1.0 ml de buffer de acetatos y una tira de papel filtro, se vierten en un tubo de ensayo con una capacidad de al menos 25 mL cuidando que el papel este sumergido completamente.

1.5 ml buffer de acetatos y 3.0 ml de DNS se vierten en un tubo para el Espectro cero.

1.0 ml buffer de acetatos, 0.5 mL de enzima, 3.0 ml de DNS se vierten en un tubo para el Blanco (enzima).

0.5 mL de estándar (de cualquiera de los estándares que se hacen para la curva de calibración), 1.0 ml buffer de acetatos, 3.0 ml de DNS se vierten en un tubo para el Estándar.

Posteriormente los tubos se agitan, para homogenizar la mezcla y se incuban por 1 hora a 50°C.

Al tubo con la tira de papel filtro se le añaden 3 ml de reactivo DNS.

Los tubos se sometieron en agua hirviendo durante 5 min, incluyendo, blancos, enzimáticos, estándares de glucosa y el espectro cero.

Después de la ebullición, los tubos se transfirieron a un baño de agua fría, hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Se añadieron 20 ml de agua destilada a cada tubo. Se mezcló completamente el tubo, invirtiendo varias veces (Nota: Esto es importante).

Una vez precipitado la pulpa de la tira del papel filtro, se tomó el sobrenadante y se midió en un espectro de absorbancia a 540 nm.

Se determinó la cantidad de azúcares reductores como glucosa.

**Datos de Curva de calibración:**

Solución stock: 10 mg/mL de glucosa

Diluciones o estándares de glucosa:

0.1 mL ss + 0.9 mL de buffer = 6.7 mg/mL

0.2 mL ss + 0.8 mL de buffer = 6.0 mg/mL

0.3 mL ss + 0.7 mL de buffer = 5.0 mg/mL

0.4 mL ss + 0.6 mL de buffer = 4.0 mg/mL

0.5 mL ss + 0.5 mL de Buffer = 3.3 mg/mL

0.6 mL ss + 0.4 mL de buffer = 6.7 mg/mL

0.7 mL ss + .03 mL de Buffer = 2.0 mg/mL

Se calculó la ecuación de la recta a partir de las absorbancias obtenidas de las diferentes concentraciones de la curva de calibración.

La concentración obtenida, se multiplico por el factor de dilución (10), empleado en la dilución de la enzima

Calculo de las unidades de papel filtro (FPU)

1 IU = 1  $\mu$ mol/min de substrato convertido

= 1  $\mu$ mol/min de glucosa

= 0.18 mg/min

La cantidad de glucosa producida, está relacionada con 0.5 mL de solución enzimática, en 60 min; por lo tanto, se emplea la siguiente ecuación, para la determinación de la actividad enzimática del celluclats.

$$FPU = \frac{\text{Concentración de glucosa (mg)}}{\left(0.18 \frac{\text{mg}}{\text{min}}\right) * (0.5 \text{ mL}) * (60 \text{ min})} \text{ unidades mL}^{-1}$$

Por consiguiente se cuantifico el volumen necesario de celluclats para suministrar 25 UPF/g de celulosa:

$$\text{Vol. celluclats} = \frac{25 \text{ UPF}}{\text{gr celulosa}} * \frac{\text{mL}}{\text{UPF}} * \text{gr biomasa pretratada (\% celulosa)}$$

### **Activación de levadura**

Levadura *S. cerevisiae*, se activó en medio de cultivo sintético (YDP), empleando glucosa como fuente de carbono. Para ello:

Inocular la cepa en caja Petri y posteriormente en tubo inclinado, para ello se necesita el 1% de extracto de levadura, 2% de Dextrosa y 2 % de peptona de caseína, 2% de agar bacteriológico y agua destilada necesaria(para caja y tubo inclinado preparar 50 ml para c/u). El medio de cultivo, fue incorporado sobre una parrilla eléctrica para someter el medio sintético a agitación, a una temperatura de 50 °C por 5 min para disolver, posteriormente se esterilizo en autoclave (Marca) a 15 psi por 15 min (cuando es en tubo inclinado meter el tubo a esterilizar junto el medio sintético).

Posteriormente se vierte en caja Petri. Una vez solidificado se toma un asa de muestra y se inocula en la caja en forma de estría. Finalmente se incuba a condiciones de 28 °C, 12 horas.

Posteriormente se lleva a cabo el mismo procedimiento en tubo inclinado. Concluido las 12 horas:

En un matraz de volumen necesario, se llevó a cabo una mezcla con una relación de 1% de extracto de levadura, 2% de Dextrosa y 2 % de peptona de caseína y agua destilada necesaria para producir el medio de cultivo sintético.

El matraz con el medio de cultivo, fue incorporado sobre una parrilla eléctrica para someter el medio sintético a agitación, a una temperatura de 50 °C por 5 min, posteriormente se esteriliza en autoclave a 15 psi por 15 min.

Una vez enfriado el medio sintético, se incorporó a la cámara de cultivo, para evitar cualquier tipo de contaminación y tomar una pequeña porción de colonia, con un asa previamente esterilizada térmicamente y se siembra en el medio de cultivo esterilizado.

Finalmente este de incuba en un shaker a condiciones de 28 °C, 80 rpm y 12 horas.