



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Obtención de un hidrolizado
detoxificado a partir de biomasa
lignocelulósica de *Panicum maximum*
para su uso como sustrato en la
fermentación alcohólica**

Carlos Rafael Castillo Saldarriaga

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá, Colombia

2014

Obtención de un hidrolizado detoxificado a partir de biomasa lignocelulósica de *Panicum maximum* para su uso como sustrato en la fermentación alcohólica

Carlos Rafael Castillo Saldarriaga

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de
Magister en Ingeniería Química

Director:

Mario Enrique Velásquez Lozano, Ph.D.

Línea de Investigación:

Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Grupo de Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2014

Education is the most powerful weapon we can use to change the world.

Nelson Mandela

Agradecimientos

A Dios y al Espíritu Santo por darme fortaleza, sabiduría y brindarme la luz para cumplir con esta ardua tarea.

Al profesor Mario Enrique Velásquez por concederme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y su confianza.

Al profesor Alvaro Orjuela, Tim Whitehead y David Hodge por darme la valiosa oportunidad de tener mi primera experiencia internacional por medio de una estancia muy enriquecedora en Michigan State University.

A Juan Pablo Ortiz, gracias por tus consejos, guía y apoyo incondicional, siempre te estaré agradecido. Le debo muchas!.

A mis compañeros de laboratorio Diana, Yina, Helver, Luisa y Mario, por su compañía en las extensas jornadas de trabajo.

Al personal administrativo del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental por su disposición y apoyo en conocimientos, materiales y espacios de trabajo.

Al programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias y la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres por su apoyo económico. Entidades como estas, que colocan su granito de arena en la formación de magister y doctores en Colombia y para Colombia son las que necesita nuestro país.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, mis padres, Vicky y Carlos, mi hermana, María Victoria, mi abuela, Ata, y mi novia, Sandra Jimena, gracias por comprender todo este tiempo lejos de casa, por su apoyo incondicional, sus valiosas palabras de animo en los momentos críticos, esto es por ustedes y para ustedes.

Resumen

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de una alta concentración de sólidos en la etapa de pretratamiento e hidrólisis enzimática empleando como materia prima biomasa lignocelulósica de *Panicum maximum*. Posteriormente, se evaluaron dos tratamientos de detoxificación de hidrolizados con el objetivo de ser usados como sustrato para la producción de etanol. Como pretratamiento se seleccionó ácido sulfúrico diluido. Las condiciones de pretratamiento evaluadas fueron: concentración de ácido sulfúrico (0.5; 1; 1.5 %p/v) y concentración de sólidos (5; 8.5; 12% p/p) a una temperatura de 130°C por 60 minutos. Posteriormente, se determinó la digestibilidad de la biomasa pretratada con una hidrólisis enzimática usando un complejo de celulasas y β -glucosidasa a una temperatura de 50°C y pH 4.8 durante 48 horas. Se empleó un diseño central compuesto de 10 corridas con dos bloques para el análisis de la etapa de pretratamiento. La mejor condición de pretratamiento con ácido diluido fue: 1.5 %p/v y 12 %p/p con una recuperación de sólidos del 58% y una concentración de azúcares reductores de 16.7 g/L (61% de conversión de celulosa a glucosa) en la prueba de digestibilidad. El estudio de la hidrólisis enzimática, se dividió en dos etapas: determinación de la concentración mínima de enzimas e hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos. En la primera, se realizó un diseño experimental de 11 corridas con el método de superficie de respuesta evaluando diferentes concentraciones de enzima en una hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con 5% p/p de sólidos. En la segunda etapa, se manejó la misma concentración inicial de biomasa pretratada, realizando dosificaciones de biomasa y enzimas para alcanzar concentraciones finales de sólidos de 7, 9, 10, 12, 15 y 20 %p/p. La mayor concentración de azúcares reductores fue de 67 g/L con una concentración de sólidos final del 20 %p/p a las 48 horas. Para la detoxificación se empleó el tratamiento de hidróxido de sodio, carbón activado y una combinación de ambos, evaluando la fermentabilidad del hidrolizado detoxificado. El hidrolizado con mejores resultados fue el detoxificado con el tratamiento de hidróxido de sodio alcanzando una concentración de etanol de 19.5 g/L y una productividad de 0.81 g etanol/L/h.

Palabras claves: concentración de sólidos, Detoxificación, Fermentación, Hidrólisis enzimática, Pretratamiento.

Abstract

The objective of this investigation was to study the effect of high solids loading of lignocellulosic biomass on pretreatment and enzymatic hydrolysis to ethanol production. Also, two detoxification methods on hydrolysates were evaluated. Lignocellulosic biomass of *Panicum maximum* was used as feedstock. Diluted sulfuric acid was selected as biomass pretreatment. Conditions evaluated were: sulfuric acid concentration (0.5; 1; 1.5 %w/v) and solids loading (5; 8.5; 12% w/w). Pretreatment was conducted at 130°C and 60 minutes. Subsequently, pretreated biomass digestibility was determined with an enzymatic hydrolysis using cellulase complex and β -glucosidase at 50°C and a pH 4.8 during 48 hours. Response surface methodology (RSM) was used to design the experiments matrix. Best conditions of diluted acid pretreatment were: 1.5 % w/v and 12 %w/w with 58% solid recovery and 16.7 g/L (61% cellulose conversion to glucose) total reducing sugars (TRS) after digestibility test. This condition was used to pretreat all biomass for the following experiments. The enzymatic hydrolysis studied was divided in two stages: (1) determination of minimum enzymes load and (2) enzymatic hydrolysis with high solids loading. First stage was carried out with RSM. Different enzyme dosages were evaluated with 5 %w/w pretreated biomass loading. In second stage, consecutive enzyme and pretreated biomass dosages were done to achieve final solids loading of 7, 9, 10, 12, 15 and 20% w/w. The highest TRS was 67 g/L with a final solid loading of 20 %w/w. Detoxification methods consisted of sodium hydroxide, carbon activated and a combination of them. Detoxification quality was evaluated through fermentability of hydrolysates. Sodium hydroxide was the best method with 19.5 g/L ethanol concentration. Ethanol productivity was 0.81 g ethanol /L/h.

Keywords: High solids loading, Detoxification, Fermentation, Enzymatic hydrolysis, Pretreatment.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	X
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Introducción	1
1. Marco Teórico	5
1.1. Biomasa lignocelulósica.....	5
1.1.1. Composición fisicoquímica de la biomasa lignocelulósica	6
1.1.2. Producción de etanol a partir de biomasa	8
1.2. Pretratamiento	10
1.2.1. Tipos de pretratamiento	10
1.3. Hidrólisis enzimática	16
1.3.1. Celulasas	16
1.3.2. Enzimas complementarias	18
1.3.3. Hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos	18
1.4. Detoxificación y fermentación de hidrolizados	20
1.4.1. Inhibidores de la fermentación alcohólica.....	20
1.4.2. Detoxificación de hidrolizados	21
1.4.3. Fermentación de hidrolizados	21
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo General.....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
3. Materiales y Métodos	27
3.1. Materia prima.....	27
3.1.1. Preparación del material	27
3.1.2. Caracterización granulométrica de la biomasa	28
3.1.3. Caracterización fisicoquímica de la biomasa.....	28
3.2. Pretratamiento con ácido diluido.....	28
3.2.1. Condiciones de operación del pretratamiento.....	29
3.2.2. Digestibilidad de la biomasa pretratada	31
3.2.3. Cuantificación de carbohidratos	32
3.3. Hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos	33
3.3.1. Concentración mínima de enzimas.....	33

3.3.2. Hidrólisis enzimática por lote alimentado	35
3.4. Detoxificación y fermentación.....	36
3.4.1. Métodos de detoxificación.....	36
3.4.2. Fermentación de hidrolizados	37
4. Resultados y Análisis	39
4.1. Caracterización de la biomasa de <i>Panicum maximum</i>	39
4.2. Pretratamiento con ácido sulfúrico diluido	45
4.2.1. Fracción sólida del pretratamiento	48
4.2.2. Balance de Materia.....	61
4.3. Hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos.....	72
4.3.1. Dosis de enzimas.....	72
4.3.2. Hidrólisis enzimática tipo lote alimentado.....	79
4.4. Fermentación de hidrolizados.....	87
4.5. Rendimiento Global para la producción de etanol a partir de <i>Panicum maximum</i>	95
Conclusiones	105
Recomendaciones	107
Bibliografía	109
A. Anexo: Determinación del porcentaje de humedad	125
B. Anexo: Determinación de carbohidratos estructurales y lignina	127
C. Anexo: Determinación del porcentaje de cenizas	129
D. Anexo: Curvas de calibración para los métodos analíticos por HPLC	131
E. Anexo: Curvas de calibración para azúcares reductores por método DNS	140

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.....	8
Figura 1-2: Acción del pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica.	10
Figura 1-3: Efecto del pH en la solubilización de la hemicelulosa y lignina. (A) Biomasa sin tratar. (B) Cambio de estructura a diferentes valores de pH.....	12
Figura 1-4: Acción de las celulasas sobre la biomasa lignocelulósica.	17
Figura 3-1: Dosificación de biomasa pretratada en la hidrólisis enzimática tipo lote alimentado.....	35
Figura 3-2: Esquema del sistema de fermentación de hidrolizados a escala de laboratorio.	38
Figura 4-1: Perfil granulométrico de <i>P. maximum</i>	41
Figura 4-2: <i>Panicum maximum</i> molido y tamizado.	42
Figura 4-3: Composición de diferentes tipos de pasto reportados en la literatura.	44
Figura 4-4: Biomasa pretratada de <i>Panicum maximum</i> a diferentes concentraciones de sólidos.	48
Figura 4-5: Biomasa pretratada de <i>Panicum maximum</i> a diferentes concentraciones de ácido.	49
Figura 4-6: Valores previstos respecto a los experimentales para la recuperación de sólidos.	52
Figura 4-7: Perturbaciones de la concentración de ácido (A) y concentración de sólidos (B) sobre la recuperación de sólidos.	52
Figura 4-8: Interacción entre la concentración de sólidos y concentración de ácido sobre la recuperación de sólidos (Para la concentración de sólidos: B+, 12 %p/p; B-, 5 %p/p).53	53
Figura 4-9: (a) Diagrama de Pareto estandarizado para la recuperación de sólidos; (b) Contorno de superficie de respuesta para la recuperación de sólidos de acuerdo al modelo.	55
Figura 4-10: Valores previstos respecto los experimentales para la concentración de azúcares reductores.	57
Figura 4-11: Perturbaciones de la concentración de ácido (A) y concentración de sólidos (B) sobre la concentración de azúcares reductores.	58
Figura 4-12: Interacción entre la concentración de sólidos y concentración de ácido sobre la concentración de azúcares reductores (Para la concentración de sólidos: B+, 12 %p/p; B-, 5 %p/p).	59
Figura 4-13: (a) Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de azúcares reductores; (b) Contorno de superficie de respuesta para la concentración de azúcares reductores de acuerdo al modelo.	60

Figura 4-14: Valores previstos respecto los experimentales para el rendimiento de celulosa.....	64
Figura 4-15: Perturbaciones de la concentración de ácido (A) y concentración de sólidos (B) sobre el rendimiento de celulosa en el pretratamiento.....	64
Figura 4-16: Interacción entre concentración de sólidos y concentración de ácido sobre el rendimiento de celulosa (Para la concentración de sólidos: B+, 12 %p/p; B-, 5 %p/p). ...	65
Figura 4-17: (a) Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de celulosa; (b) Contorno de superficie de respuesta para el rendimiento de celulosa.....	66
Figura 4-18: Valores previstos respecto los experimentales para el rendimiento de hemicelulosa.....	68
Figura 4-19: Perturbaciones de la concentración de ácido (A) y concentración de sólidos (B) sobre el rendimiento de hemicelulosa.	69
Figura 4-20: Interacción entre concentración de sólidos y concentración de ácido sobre rendimiento de hemicelulosa (Para la concentración de sólidos: B+, 12 %p/p; B-, 5 %p/p).	70
Figura 4-21: (a) Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de hemicelulosa; (b) Contorno de superficie de respuesta para el rendimiento de hemicelulosa.....	71
Figura 4-22: Valores previstos respecto los experimentales para el rendimiento de celulosa.....	75
Figura 4-23: Perturbaciones de la concentración del complejo de celulasas (A) y concentración de β -glucosidasa (B) sobre la concentración de azúcares reductores.....	76
Figura 4-24: Interacción entre la concentración del complejo de celulasas y concentración de β -glucosidasa sobre la concentración de azúcares reductores (Para la concentración de β -glucosidasa: B+, 1.77 CBU/g; B-, 0 CBU/g).	77
Figura 4-25: (a) Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de azúcares reductores; (b) Contorno de superficie de respuesta para la concentración de azúcares reductores de acuerdo al modelo (Condiciones de proceso: 50°C; agitación magnética; 48 horas).....	78
Figura 4-26: (a) Concentración de azúcares reductores totales (ART) respecto al tiempo, (b) Rendimiento de celulosa respecto al tiempo.....	82
Figura 4-27: Valores finales de la concentración de ART y rendimiento de celulosa respecto a la concentración de sólidos (%p/p)	84
Figura 4-28: Concentración de glucosa en el hidrolizado luego de aplicar las diferentes estrategias de detoxificación.	88
Figura 4-29: Consumo de glucosa, producción de etanol y glicerol durante la fermentación de cada hidrolizado detoxificado: hidrolizado sin detoxificar y detoxificado con hidróxido de sodio (NaOH).	92
Figura 4-30: Consumo de glucosa, producción de etanol y glicerol durante la fermentación de cada hidrolizado detoxificado: detoxificación con carbón activado (CA) y detoxificación con CA + NaOH.....	93
Figura 4-31: Balance de materia para la producción de etanol a partir de <i>Panicum maximum</i>	96

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Pastos y forrajes sembrados en Colombia.....	6
Tabla 1-2: Efecto de los diferentes pretratamientos sobre la estructura de la biomasa... 14	14
Tabla 1-3: Ventajas y desventajas de los pretratamientos.....	15
Tabla 1-4: Complejos multi-enzimáticos y acción de algunas enzimas complementarias.	18
Tabla 1-5: Efecto de inhibidores de la fermentación sobre la producción de etanol.....	21
Tabla 1-6: Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de detoxificación.....	22
Tabla 3-1: Información del ecotipo y cosecha de <i>Panicum maximum</i>	27
Tabla 3-2: Diseño experimental para el pretratamiento con ácido diluido de <i>P. maximum</i>	30
Tabla 3-3: Diseño experimental para la determinación de la dosis de enzimas mínima en la hidrólisis enzimática.....	34
Tabla 4-1: Porcentaje de humedad de una muestra fresca de <i>P. maximum</i>	39
Tabla 4-2: Caracterización granulométrica de la biomasa de <i>Panicum maximum</i>	40
Tabla 4-3: Resultados de los ensayos de pretratamiento de <i>Panicum maximum</i>	47
Tabla 4-4: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de recuperación de sólidos....	51
Tabla 4-5: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de concentración de azúcares reductores.....	56
Tabla 4-6: Ensayos para comprobar los modelos desarrollados para la recuperación de sólidos y concentración de azúcares reductores.....	61
Tabla 4-7: Rendimiento de celulosa y hemicelulosa bajo diferentes condiciones de pretratamiento.....	62
Tabla 4-8: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de rendimiento de celulosa....	63
Tabla 4-9: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de rendimiento de hemicelulosa.	67
Tabla 4-10: Concentración de azúcares reductores a las 24 y 48 horas (g/L) junto con el rendimiento de celulosa de los ensayos de dosificación de enzimas durante la hidrólisis enzimática con una concentración de 5 %p/p de <i>P. maximum</i> pretratado.....	73
Tabla 4-11: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de concentración de azúcares reductores.....	74
Tabla 4-12: Azúcares reductores totales (ART) y rendimiento de celulosa (Y_{Cel}) de la hidrólisis enzimática a diferentes concentraciones de sólidos.....	81
Tabla 4-13: Estudio comparativo de la hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos.....	86

Tabla 4-14: Concentración final y rendimiento de biomasa (Y_x), glicerol (Y_{GII}) y etanol (Y_P), y productividad de etanol (η) en una fermentación de hidrolizado de *P. maximum*. 94

Tabla 4-15: Rendimiento de celulosa por cada tratamiento de detoxificación 97

Introducción

El uso desmesurado de combustibles fósiles en distintos sectores económicos ha generado un efecto nocivo sobre el planeta. Un ejemplo claro es la acumulación de gases como dióxido de carbono y óxidos nitrosos causantes del efecto invernadero. Teniendo en cuenta que el sector del transporte es uno de los mayores contribuyentes en la emisión de estos gases, la solución más próxima ha consistido en el cambio de tipo de combustible. Por lo anterior, en la actualidad se ha empezado a reemplazar los combustibles de origen fósil por los obtenidos por procesos de transformación biológica como el etanol o biogás y transformación química como el biodiesel logrando disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero [Balat, 2011]. Estos combustibles alternativos, presentan ventajas sobre los tradicionales, al usar materia prima renovable, otorgándoles la categoría de sostenibles y biodegradables.

Colombia al encontrarse en una zona tropical, ha centrado su producción de biocombustibles al biodiesel a partir de aceite de palma y etanol utilizando como materia prima los jugos de la caña de azúcar [Quintero *et al*, 2010], siendo el etanol su producto con mayor prospección y crecimiento. En el 2013 la producción de etanol alcanzó 365 millones de litros. Para el país, en el año 2014, la proyección ronda los 456 millones de litros con 6 plantas en funcionamiento a un 80% de capacidad [USDA, 2013]. Lamentablemente el uso de la caña de azúcar, y otras materias primas como maíz, trigo y sorgo, han despertado una problemática alrededor de satisfacer la demanda energética a coste de sacrificar la seguridad alimentaria de una creciente población mundial.

Para solucionar este inconveniente, surge como alternativa a las materias primas convencionales, el uso de biomasa lignocelulósica proveniente de residuos agroindustriales. En Colombia se han realizado investigaciones de producción de etanol empleando residuos como bagazo de caña, cascarilla de café, cascarilla de arroz, residuos de banano y demás frutas tropicales, raquis de palma y residuos de floricultura [Aguilar, 2011; Triana, 2010; Monsalve *et al*, 2006; Tejeda *et al*, 2010; Piñeros-Castro y Velásquez-Lozano, 2014; Quevedo, 2011]. La dificultad de emplear estos residuos se basa en que algunos de ellos se han convertido en materia prima para nuevas cadenas

productivas, masificando su uso en sistemas de cogeneración o compostaje. Razones como estas han obligado a explorar una segunda alternativa para la obtención de la materia prima como son los cultivos energéticos.

Dependiendo de las condiciones geográficas, agronómicas, económicas y biológicas de cada país, se han estudiado diferentes cultivos energéticos: en Estados Unidos son predominantes las investigaciones empleando *Panicum virgatum* (*switchgrass*), Europa se ha centrado en el estudio de un híbrido de *Miscanthus* conocido como *Miscanthus x giganteus* [Murnen *et al*, 2007]. En Brasil, EMBRAPA (Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria) luego de un proyecto de 10 años escogió al pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) como un cultivo energético con posibilidades de uso por su alto rendimiento de biomasa y bajos requerimientos de nitrógeno, sin descartar especies de *Andropogon*, *Brachiaria* y *Paspalum atratum* [Ferreira-Leitao *et al*, 2010].

A nivel nacional, se han realizado exploraciones iniciales con pasto maralfalfa (*Pennisetum sp.*) obteniendo un rendimiento de 117 mg etanol/g biomasa pretratada [Mateus, 2012], pasto gigante (*Pennisetum purpureum*) [Cardona *et al*, 2013] y *King grass* (*Pennisetum hybridum*) con un rendimiento promedio de 141.5 mg etanol/g biomasa [Cardona *et al*, 2014]. Sin embargo, solo se ha explorado una especie en particular, ignorando el potencial de otras como posibles especies sustitutas de las materias primas tradicionales. Colombia cuenta con suelos ácidos, gran irradiación solar y períodos de sequías prolongados, por lo cual, el *Panicum maximum* surge como una alternativa a los cultivos energéticos habituales empleados en el país. Esta gramínea es del tipo C₄, lo cual le otorga características únicas como producción de mayor área foliar, mejor uso de la radiación, buen crecimiento en ambientes con alta temperatura y luminosidad (factores propios de las zonas con clima subtropical y tropical) y uso eficiente del nitrógeno presente en el suelo [Ugarte, 2012]. Adicionalmente, la especie en particular posee gran cantidad de celulosa y lignina en su pared celular, es resistente a sequías por tener un amplio sistema radicular y puede alcanzar rendimientos de 30 a 40 toneladas/ha/año de forraje seco [Bernal, 1994]. Teniendo en cuenta que en Colombia se dispone de 7,4 millones de hectáreas hábiles para el desarrollo de agro-carburantes [Proexport, 2012], el *Panicum maximum* tiene grandes posibilidades de convertirse en una carta más para la baraja energética del país.

A pesar de tener un buen potencial, el uso de la biomasa lignocelulósica como sustrato para la producción de etanol aún mantiene problemas para su implementación a gran escala. Existen altos costos asociados a la transformación de la biomasa en etapas como pretratamiento e hidrólisis enzimática [Wyman, 2007]. Por esto, todos los esfuerzos se han centrado en el uso eficiente de la materia prima e intensificación de operaciones, buscando reducir la demanda energética global aprovechando la biomasa disponible junto con los efluentes y residuos asociados a cada etapa del proceso [Alvira *et al*, 2010].

Como solución próxima para disminuir los costos de producción se plantean dos opciones. La primera consiste en el uso de altas concentraciones de sólidos, de esta manera se logra disminuir la cantidad de agua empleada en cada etapa del proceso, asimismo se logra incrementar la concentración de azúcares en el hidrolizado. La segunda opción se basa en la determinación de cargas enzimáticas mínimas respecto a la biomasa empleada y el uso de complejos enzimáticos que faciliten la remoción de azúcares residuales de hemicelulosa y lignina que no logran ser retirados en el pretratamiento [Huang *et al*, 2011].

Por todo lo anterior, el presente trabajo evalúa la biomasa lignocelulósica de *Panicum máximum* como una nueva alternativa de materia prima para la producción de etanol en condiciones de alta concentración de sólidos durante el pretratamiento e hidrólisis enzimática. Inicialmente se caracterizó y analizó la composición química de la materia prima respecto a otras empleadas en la literatura (sección 3.1 y 4.1). Luego, se estudió la influencia de la concentración de sólidos en el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido sobre la recuperación de biomasa pretratada, su digestibilidad en una hidrólisis enzimática, rendimiento de celulosa y hemicelulosa (sección 3.2 y 4.2). Posteriormente, se determinó la concentración mínima de celulasas y β -glucosidasas, y se realizó la evaluación de un proceso por lote alimentado de biomasa pretratada y enzimas para lograr una hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos (sección 3.3 y 4.3). Al haberse manejado altas concentraciones de sólidos en el pretratamiento e hidrólisis enzimática, pueden presentarse inhibidores de fermentación en el hidrolizado. Por esto, al final del trabajo, se evaluaron dos tratamientos de detoxificación: hidróxido de calcio y carbón activado, mediante pruebas de fermentabilidad (sección 3.4 y 4.4).

1. Marco Teórico

1.1. Biomasa lignocelulósica

De acuerdo con la ASTM International, la biomasa se define como cualquier material que fue o hizo parte de un organismo vivo, y puede ser usado mediante un proceso de transformación o directamente como combustible [ASTM International, 2011]. La biomasa lignocelulósica está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina. En la **Sección 1.1.1**, se trata a profundidad las características de cada uno de estos componentes. Gracias a la biodiversidad presente en Colombia, existe una gran variedad de pastos y forrajes que se pueden emplear como materia prima para la producción de etanol. Ver **Tabla 1-1**. El uso de pastos y forrajes tiene algunas ventajas: se pueden destinar tierras degradadas para su producción sin empeorar la peligrosa situación de seguridad alimentaria generada por los biocombustibles tradicionales, durante su cultivo y procesamiento, se pueden mezclar diferentes variedades de biomasa y son más económicas que las materias primas convencionales (miel de caña de azúcar y aceite de palma) [Cardona *et al*, 2012].

Uno de los pastos con proyección para ser usado como materia prima en la producción de etanol es *Panicum maximum*. Esta es una gramínea forrajera de crecimiento erecto que alcanza hasta tres metros de altura. Puede crecer desde el nivel del mar hasta 1800 m.s.n.m., es resistente a periodos largos de sequía por su amplio sistema radicular y requiere fertilización nitrogenada después de 8 meses de implantada. En condiciones naturales se puede producir de 12 a 15 toneladas de forraje seco por hectárea por año, lo que equivale entre 60 y 75 toneladas de forraje por hectárea por año. Con cortes cada 7 semanas se alcanzan rendimientos de 30 a 40 toneladas por hectárea por año de forraje seco. *P. maximum* ha sido explorado como sustrato para la producción de enzimas ligninolíticas empleando *Pleurotus ostreatus*, obteniendo buenos resultados de actividad de lacasas [Rangel, 2012; Morales y Velásquez, 2013].

De poder emplearse como materia prima para la producción de etanol, se contribuiría a la intensificación y rentabilidad del proceso, acercando esta gramínea forrajera al concepto de biorefinería.

Tabla 1-1: Pastos y forrajes sembrados en Colombia.
Fuente. Adaptado de Cardona *et al*, 2012.

Nombre científico	m.s.n.m	Rendimiento	Uso
<i>Melinis minutiflora</i> (Gordura)	200-2200	5-20 t/ha/año	Corte, pastoreo, heno y ensilaje.
<i>Brachiaria decumbens</i> (Brachiaria)	0-2000	20 t/ha/año	Corte, pastoreo, heno y ensilaje.
<i>Cynodon plectostachium</i> (Estrella)	0-1700	1-3 t/ha/mes	Pastoreo, heno, ensilaje y mezclas
<i>Dyckanthium aristatum</i> (Angleton)	0-2000	100-150 t/ha/año	Pastoreo y corte
<i>Digitaria decumbens</i> (Pangola)	0-1000	100 t/ha/año	Pastoreo y heno
<i>Echinochloa polystachia</i> (Alemán)	0-1200	12-20 t/ha/corte	Corte y ensilaje
<i>Panicum maximum</i> (Guinea)	0-1800	60-100 t/ha/año	Corte, pastoreo y ensilaje
<i>Paspalum dilatatum</i> (Gramalote)	0-2000	20 t/ha/año	Corte, pastoreo, heno y ensilaje
<i>Pennisetum purpureum</i> (Elefante)	0-2000	80-100 t/ha/corte	Ensilaje
<i>Medicago sativa</i> (Alfalfa)	700-2800	120 t/ha/año	Corte, pastoreo, ensilaje y harina
<i>Pennisetum clandestinum</i> (Kikuyo)	2200-3000	80-100 t/ha/año	Pastoreo
<i>Pennisetum hybridum</i> (King grass)	0-2100	40-60 t/ha/corte	Corte y ensilaje

1.1.1. Composición fisicoquímica de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica se encuentra compuesta (% base seca) por tres constituyentes básicos: celulosa (20% - 50%), hemicelulosa (15% - 35%), y lignina (10% - 30%). También posee componentes minoritarios como proteína (3% - 10%), lípidos (1% - 5%), azúcares solubles (1% - 10%) y minerales (5% - 10%). En algunas plantas como algodón la celulosa corresponde al 80% [Chundawat *et al*, 2011].

La celulosa es el biopolímero más abundante de la tierra. Se encuentra presente en bacterias, hongos, algas y da soporte estructural a la pared celular. Está compuesta por cadenas lineales de β -1,4-glucano que se agregan hasta formar microfibras de 3 a 5 nm de diámetro. Estas microfibras se forman por las fuerzas intra e intermoleculares de los enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno y van der Waals. En las microfibras de celulosa, los enlaces de hidrógeno son muy importantes al determinar la rectitud de la cadena. Por otro lado, los enlaces de hidrógeno que unen

diferentes cadenas también son relevantes, al influir directamente sobre el estado de la celulosa, determinando si es cristalina, para-cristalina o amorfa [Yang *et al*, 2011a]. El grado de polimerización de la celulosa varía entre 100 y 10.000, dependiendo de la biomasa. A la unidad repetitiva de la celulosa se le denomina celobiosa.

La hemicelulosa es un heteropolisacárido formado por pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa y galactosa) y azúcares acetilados. Su estructura se puede clasificar en: (1) xilanos (β -1,4-xilosil con cadenas laterales de arabinosa, ácidos urónicos y ácido acético), (2) mananos (β -1,4-manosil o glucosil-manosil con cadenas laterales de galactosa), (3) β -glucanos con enlaces mixtos (β -1,3-1,4-glucosil), y (4) xiloglucanos (β -1,4-glucosil con cadenas laterales de xilosa) [Chundawat *et al*, 2011]. Dentro de la pared celular de las plantas, la hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las microfibras de celulosa, dando rigidez al sistema celulosa-hemicelulosa-lignina [Hendriks y Zeeman, 2009]. Por lo tanto, para lograr una buena digestibilidad de la biomasa, se debe remover más del 50% de hemicelulosa. Al ser termoquímicamente sensible, se pueden aplicar tratamientos con ambientes extremos de pH o temperatura para su remoción [Agbor *et al*, 2011]. La composición de la hemicelulosa depende del tejido celular y especie de la planta. En las plantas del tipo monocotiledóneas, la hemicelulosa está compuesta mayoritariamente por glucuronoarbinoxilanos, mientras que en las dicotiledóneas, está compuesta por galactoglucomananos.

La lignina es un heteropolímero amorfo compuesto por polímeros de fenil-propano derivados de tres monómeros: *p*-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S). Se encuentra presente en la pared celular de las plantas dando rigidez, impermeabilidad, resistencia al ataque microbiano y estrés oxidativo [Hendriks y Zeeman, 2009]. La composición de la lignina, al igual que en la hemicelulosa, depende del tejido celular y especie de la planta. Las estructuras que conforman la lignina surgen a partir de la polimerización de radicales fenólicos provenientes de las enzimas oxidativas presentes en la pared celular. En las maderas duras, predomina el guayacilo (G) y siringilo (S), mientras que en las blandas, el guayacilo (G) es el de mayor proporción. La lignina puede formar complejos con carbohidratos como la arabinosa.

1.1.2. Producción de etanol a partir de biomasa

La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica consta de cuatro operaciones unitarias básicas: pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y separación del producto final. Ver **Figura 1-1**. En el pretratamiento se busca alterar la estructura macroscópica y microscópica de la biomasa, removiendo hemicelulosa y/o lignina, además de transformar la celulosa cristalina en amorfa. Todo esto, con el objetivo de mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. La biomasa pretratada se coloca en una solución amortiguadora o *buffer*, donde se agrega una concentración específica de un complejo de enzimas (celulosas, β -glucosidasas, xilanasas, pectinasas, entre otras), para degradar los polímeros de carbohidratos en monómeros como glucosa y xilosa. Este hidrolizado, en algunos casos es suplementado con macro y micronutrientes, para ser empleado como fuente de carbono en la fermentación alcohólica.

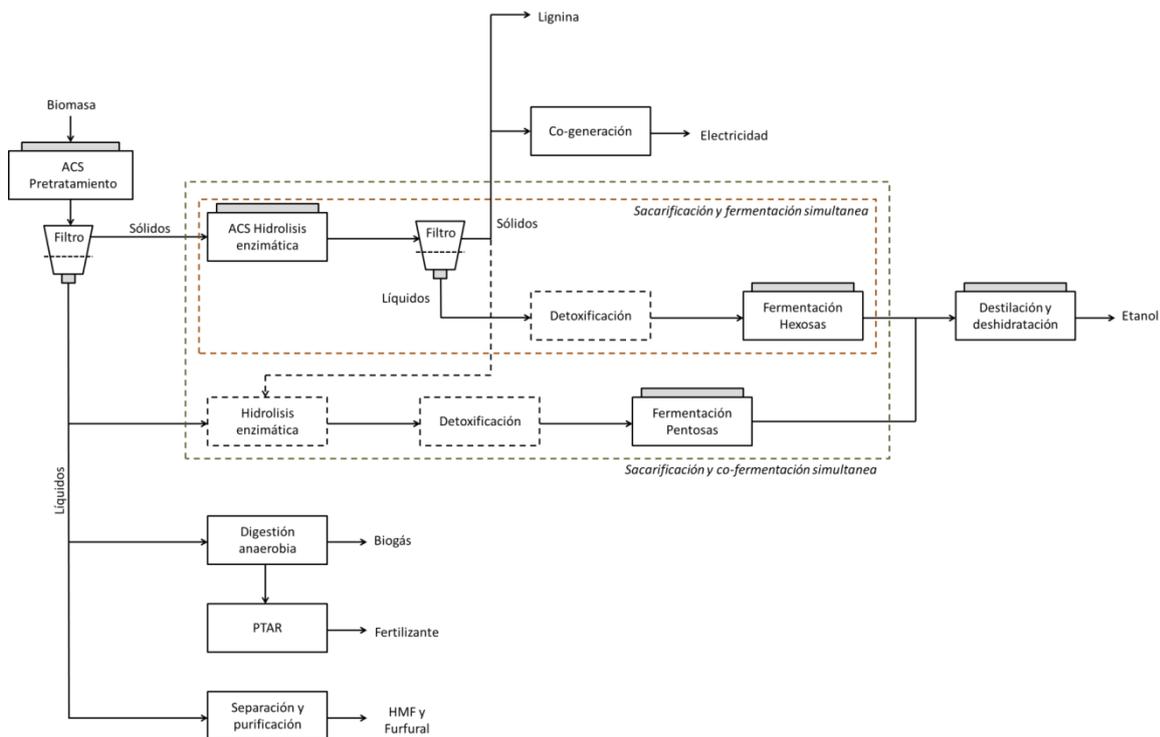


Figura 1-1: Producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

Debido a las altas concentraciones de azúcares que se pueden obtener en la hidrólisis, se recomienda realizar la hidrólisis enzimática junto con la fermentación. Esta operación se denomina **sacarificación y fermentación simultánea (SFS)**.

Algunos microorganismos empleados en la fermentación pueden usar simultáneamente glucosa y xilosa como fuente de carbono durante una SFS. Esta operación recibe el nombre de sacarificación y cofermentación simultánea (SCFS). Procesos como SFS y SCFS se encuentran en estudio al disminuir costos de operación y capital por realizarse en el mismo biorreactor [Mosier *et al*, 2005]. El hidrolizado fermentado se somete a un proceso de destilación y purificación tradicional para obtener el etanol concentrado.

A lo largo de las diferentes operaciones de transformación de la biomasa, se obtienen residuos como lignina, celulosa y hemicelulosa sin reaccionar, y cenizas, que se pueden emplear en sistemas de cogeneración para suplir el elevado gasto energético de las operaciones de separación y purificación. Este tipo de proceso, donde se busca el aprovechamiento de cada una de las corrientes residuales, se denomina Sistema Integrado de Uso de Biomasa (SIUB), o proceso IBUS (*Integrated Biomass Utilization System*) por sus siglas en inglés. Larsen *et al.*, planteó un proceso IBUS con alta concentración de sólidos en la etapa de pretratamiento e hidrólisis enzimática a partir de rastrojo de maíz logrando reducir los costos del etanol hasta un valor de 2.40 US \$/gal, que comparado con el valor a nivel mundial del etanol de 1.95 US\$/gal para la fecha de publicación, era un precio aceptable para la venta [Larsen *et al*, 2008]. Con mejoras en el pretratamiento e hidrólisis enzimática, además del empleo de cepas que puedan fermentar carbohidratos de cinco y seis carbonos, y operaciones adicionales para el aprovechamiento de la lignina, el proceso de producción de etanol puede llegar a ser una realidad comercial.

1.2. Pretratamiento

El objetivo principal de un pretratamiento es mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa presente en la biomasa. Para esto, se debe solubilizar la hemicelulosa, remover la lignina, incrementar la porosidad y descristalinizar la celulosa presente. Ver **Figura 1-2**.

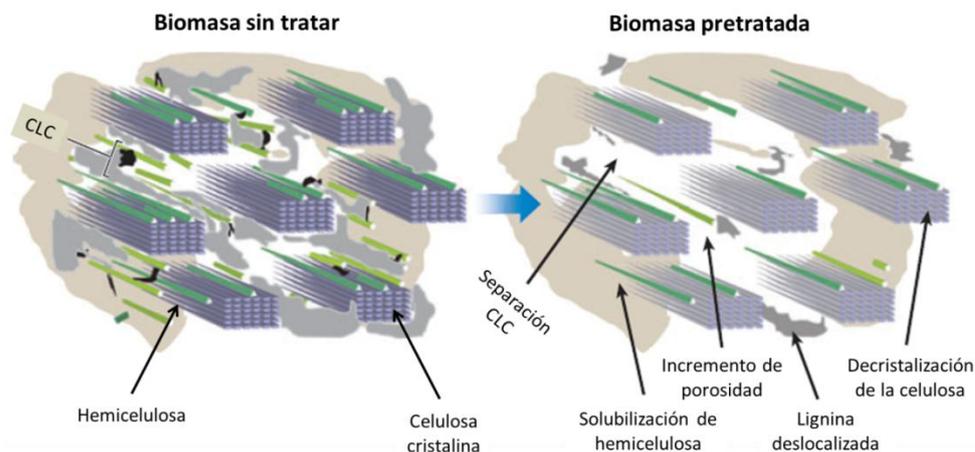


Figura 1-2: Acción del pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica.
Fuente. Adaptado de Chundawat *et al*, 2011.

Para realizar una correcta selección del pretratamiento, se deben tener en cuenta factores como: (1) altos rendimientos con diferentes cultivos en distintos tiempos de cosecha, (2) alta digestibilidad del sólido pretratado, (3) poca degradación de azúcares, (4) mínima producción de compuestos tóxicos, (5) no requerir reducción de tamaño de la biomasa, (6) bajo costo de los reactores, (7) evitar residuos sólidos, (8) mantener efectividad a humedades bajas y (9) favorecer la recuperación de la lignina [Alvira *et al*, 2010].

1.2.1. Tipos de pretratamiento

Al existir una gran variedad de material lignocelulósico para la producción de etanol de segunda y tercera generación, ha sido muy difícil seleccionar un único pretratamiento. Por lo cual se han planteado múltiples opciones tecnológicas. Estas se pueden clasificar en cuatro grupos: físicos, químicos, biológicos y fisicoquímicos.

Pretratamiento Físico (Mecánico). El pretratamiento físico consiste en reducir el tamaño de la biomasa, con lo cual se incrementa el área superficial, y se reduce el

grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, lo que aumenta la digestibilidad durante la hidrólisis enzimática. Entre las operaciones para reducir el tamaño de partícula se encuentran el astillado, desfibración, trituración y molienda. Dependiendo de la operación, ciertas propiedades sobre la biomasa pueden mejorar.

Por ejemplo, en un proceso de molienda, se presentan fuerzas de cizallamiento que reducen el tamaño de partícula hasta 0.2 mm y disminuyen la cristalinidad de la celulosa [Agbor *et al*, 2011]. Los efectos de la molienda dependerán de la duración y el equipo empleado junto con el tipo de biomasa. El consumo de energía de la molienda estará en función del tamaño de partícula a obtener. En la molienda de maderas duras (*hardwoods*) se emplea más cantidad de energía que en la molienda de gramíneas forrajeras o residuos agroindustriales. Sin embargo, esta operación presenta un consumo excesivo de energía al momento de aplicarse en una escala industrial sin importar el tipo de biomasa empleada. Su versatilidad para emplearse antes o después del pretratamiento puede disminuir los costos causados por el consumo de energía, facilitando su implementación.

Takacs *et al.*, plantean como alternativa a los pretratamientos físicos tradicionales, el uso de rayos gamma, los cuales pueden romper los enlaces β -1,4 glucosídicos, aumentando el área superficial y disminuyendo la cristalinidad de la celulosa [Takacs *et al*, 2000]. Por su parte, Karunanithy *et al.*, proponen la extrusión como otra alternativa física de pretratamiento. Por medio de la extrusión se logra destruir las fibras presentes en el material debilitando su estructura e incrementando la accesibilidad a los carbohidratos por parte de las enzimas [Karunanithy *et al*, 2008].

Pretratamiento Biológico. Se basa en la capacidad que tienen los hongos de producir enzimas que degraden la lignina y hemicelulosa presente en la biomasa. Los hongos de la podredumbre blanca son los más efectivos para este tipo de pretratamiento al producir enzimas como: lignina peroxidasas, polifenol oxidasas, peroxidasas dependientes de manganeso y lacasas. Entre estos hongos se encuentran: *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerate*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus* [Alvira *et al*, 2010].

El tiempo de residencia de la biomasa en el pretratamiento es de 10 – 14 días, por la baja velocidad de degradación de los hongos. Con estos tiempos de residencia, consumo de carbohidratos de la biomasa por parte del hongo para su supervivencia,

sumado al costo y espacio requerido para mantener las condiciones de crecimiento del hongo, este pretratamiento se convierte en uno de los más costosos de implementar a gran escala.

Pretratamiento Químico. Sustancias químicas como ácidos, bases, solventes orgánicos y líquidos iónicos pueden ser usadas para la remoción de la lignina o hemicelulosa presente en la biomasa. Por lo general, los pretratamientos químicos son bifásicos, siendo los más comunes el pretratamiento básico y ácido [Chundawat *et al*, 2011]. Como se observa en la **Figura 1-3**, dependiendo del pH al cual se realice el pretratamiento químico, el efecto sobre la biomasa será distinto.

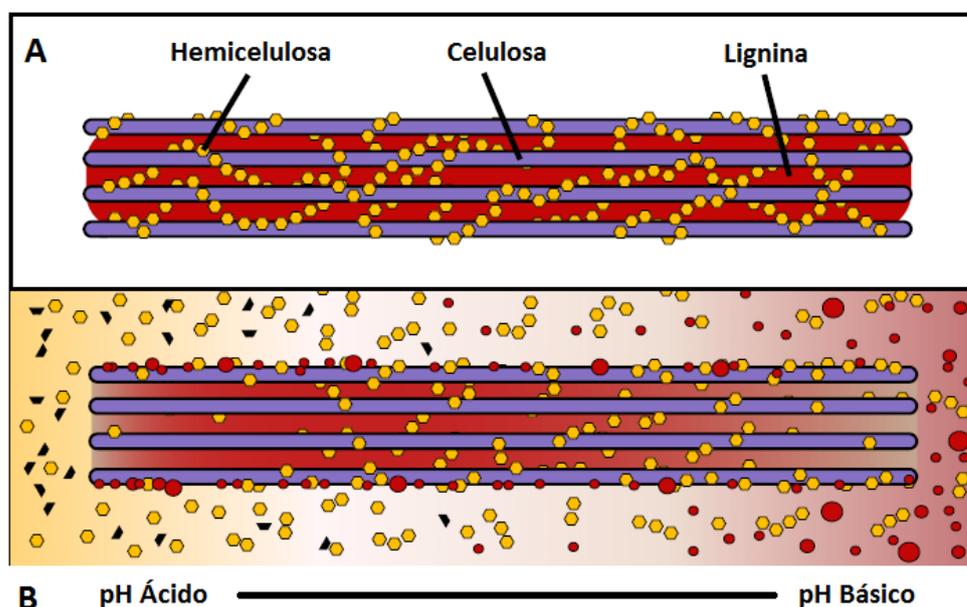


Figura 1-3: Efecto del pH en la solubilización de la hemicelulosa y lignina. (A) Biomasa sin tratar. (B) Cambio de estructura a diferentes valores de pH.

Fuente. Adaptado de Garlock *et al*, 2011.

En el pretratamiento básico se emplean sustancias como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidracina y amonio. Al emplear sustancias básicas se logra disminuir el grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa, además de aumentar el área superficial de la biomasa. La lignina ha sido identificada como un factor negativo durante la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada por adsorber las enzimas, causar interferencia entre los puntos activos de las enzimas y los complejos lignina-carbohidrato, y liberar compuestos derivados tóxicos para los microorganismos. Durante el pretratamiento básico se destruye su estructura degradando los complejos lignina-carbohidrato, mejorando la accesibilidad a la

celulosa. La efectividad de los pretratamientos básicos disminuye conforme aumenta el contenido de lignina en la biomasa.

En el pretratamiento ácido se realiza un proceso de deacetilación de la xilosa presente en la hemicelulosa, incrementando el rendimiento de remoción. Sin embargo, se deben determinar condiciones de operación que favorezcan la degradación de hemicelulosa, pero eviten la formación de furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y compuestos aromáticos derivados de la lignina, conocidos por ser inhibidores de la fermentación. Los ácidos empleados en este pretratamiento son ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido clorhídrico. El ácido sulfúrico es el más empleado para realizar el pretratamiento ácido de la biomasa. Las concentraciones de ácido deben ser menores a 4 %p/v para evitar problemas de corrosión en los equipos, y lograr la factibilidad económica de la fracción líquida residual. Ácidos orgánicos como el fumárico y el maleico, se plantean como alternativas para remplazar los catalizadores ácidos de este pretratamiento, al reducir la formación de furfural, respecto al ácido sulfúrico.

Pretratamiento Fisicoquímico. En esta categoría se encuentran agrupados la mayor parte de los pretratamientos. El pretratamiento de explosión con vapor, agua caliente, ácido diluido, pretratamiento con hidróxido de calcio, oxidación húmeda, explosión con amonio (AFEX), explosión con dióxido de carbono y Organosolv, hacen parte de este grupo.

El pretratamiento con ácido diluido ha sido uno de los más estudiados para incrementar la digestibilidad de la biomasa. Se han evaluado ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácido sulfúrico, siendo este último el más empleado por su bajo costo y facilidad de empleo de las fracciones sólida y líquida resultantes del pretratamiento. Durante el pretratamiento, se mezcla ácido sulfúrico diluido junto con la biomasa para solubilizar la hemicelulosa presente. La mezcla se calienta con vapor a temperaturas de 140°C a 215°C. El tiempo del pretratamiento varía de unos segundos a minutos dependiendo de la temperatura. Con este pretratamiento se puede recuperar más del 80% de la glucosa presente en la biomasa. Entre las desventajas de emplear ácido diluido se encuentra el riesgo a la corrosión de los equipos y si se manejan condiciones extremas (alta temperatura, alta concentración de ácido) generación de productos derivados de la hemicelulosa considerados inhibidores de la fermentación. La fracción líquida residual del pretratamiento con ácido diluido tiene una gran cantidad de azúcares derivados de la hemicelulosa como

la xilosa, fuente de carbono de fermentaciones microbianas para la producción de etanol, butanol, hidrógeno y ácido succínico [Peng *et al*, 2012]. En la **Tabla 1-2**, se observa el efecto de diferentes pretratamientos sobre la estructura de la biomasa, donde IAS, Incremento del área superficial; DC, decristalización de la celulosa; SH, solubilización de la hemicelulosa; RL, remoción de lignina; GCT, generación de compuestos tóxicos. H, mayor efecto; M, efecto medio; L, poco efecto.

En la **Tabla 1-3**, se resumen las ventajas y desventajas de los diferentes pretratamientos empleados para biomasa lignocelulósica.

Tabla 1-2: Efecto de los diferentes pretratamientos sobre la estructura de la biomasa.
Fuente. Adaptado de Alvira *et al.*, 2010.

Pretratamiento	IAS	DC	SH	RL	GCT
Molienda	H	H	-	-	-
Explosión de vapor	H	-	H	M	H
Agua caliente	H	n.d.	H	L	L
Ácido	H	-	H	M	H
Básico	H	-	L	M	L
Oxidativo	H	n.d.	-	M	L
AFEX	H	H	M	H	L
Explosión con CO ₂	H	-	H	-	-

La constante búsqueda por disminuir los costos de la producción de etanol de segunda generación, ha obligado a mejorar la eficiencia en cada una de las operaciones involucradas. Una de las estrategias empleadas en el pretratamiento es el uso de altas concentraciones de sólidos (> 15 %p/p). Con esto, se emplea menos cantidad de agua en el pretratamiento, se logra pretratar mayor cantidad de biomasa, aumentar la concentración de azúcares luego de la hidrólisis enzimática y, por tanto facilitar la producción y separación del etanol en la fermentación. Los costos de capital y producción también se reducen al emplear un reactor más pequeño para obtener la misma cantidad de azúcares y etanol. A pesar de todos estos beneficios, el pretratamiento con alta concentración de sólidos presenta problemas al momento de realizar el cambio de escala, del laboratorio a planta piloto. Entre las dificultades se encuentra el incremento en el consumo de energía al momento de homogenizar la biomasa durante el pretratamiento por la elevada viscosidad. Adicionalmente, existe el riesgo de producir una concentración más alta de inhibidores que afecten la hidrólisis enzimática y fermentación. Autores como Modenbach y Nokes, plantean la necesidad de encontrar condiciones adecuadas para los pretratamientos con alta concentración de sólidos donde se minimice la producción de inhibidores, teniendo en

cuenta el tipo de biomasa junto con todas las variables de proceso que influyen sobre la efectividad y eficiencia del pretratamiento [Modenbach y Nokes, 2012].

Tabla 1-3: Ventajas y desventajas de los pretratamientos.
Fuente. Adaptado de Alvira *et al.*, 2010.

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Biológico	- Degrada lignina y hemicelulosa - Bajo consumo de energía	- Tasa de hidrólisis
Molienda	- Reduce cristalinidad de la celulosa - Solubilización de la hemicelulosa y transformación de la lignina	- Consumo de energía - Generación de compuestos tóxicos
Explosión con vapor	- Costo-beneficio - Rendimiento de celulosa y hemicelulosa en un método de dos pasos	- Degradación parcial de la hemicelulosa
AFEX	- Mayor área superficial - Baja formación de inhibidores	- No es eficiente para biomasa con alto contenido de lignina - Cantidad de amonio
Explosión con CO ₂	- Mayor área superficial - Costo-beneficio - No genera compuestos tóxicos - Remoción de lignina	- No afecta la hemicelulosa y lignina - Altas presiones - Alto costo de oxígeno y catalizador básico
Oxidación húmeda	- Baja formación de inhibidores - Baja demanda energética (exotérmico)	
Ozonólisis	- Reducción contenido de lignina - No genera compuestos tóxicos - Hidrolisis de lignina y hemicelulosa	- Alta cantidad de ozono - Alto costo
Organosolv	- Alto rendimiento de celulosa	- Sistema de separación y recirculación de solventes - Costo del ácido y su recuperación
Ácido concentrado	- Temperatura ambiente	- Problemas de corrosión en el reactor - Formación de inhibidores - Generación de productos de degradación
Ácido diluido	- Menos problemas de corrosión - Menos formación de inhibidores - Recuperación de celulosa	

1.3. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es una reacción heterogénea con múltiples etapas, donde la celulosa se degrada por la acción sinérgica de las enzimas endoglucanasa y exoglucanasa (celobiohidrolasa). Los productos intermedios de esta primera reacción, celuloligosacaridos y celobiosa se degradan a glucosa por la acción de otra enzima, la β -glucosidasa [Yang *et al*, 2011a]. El costo de la hidrólisis enzimática es más bajo que el de una hidrólisis ácida por realizarse a condiciones leves de temperatura, pH y presión, y no causar problemas de corrosión en los equipos, además de obtenerse rendimientos de azúcares de más del 90% en condiciones óptimas.

1.3.1. Celulasas

Las celulasas se producen empleando hongos filamentosos como *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* mediante fermentación sólida o fermentación sumergida. Sin embargo, estas enzimas también son producidas por bacterias, levaduras, algunas plantas y rumiantes [Chandel *et al*, 2012]. La producción de celulasas se realiza por lotes, lote semi-alimentado y de forma continua. Los factores que afectan la producción son: agitación, aireación, presencia de inductores, pH, fuente de carbono y nitrógeno.

Las celulasas son un grupo de enzimas conformado por endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas o β -glucosidasas. Cada una con un rol específico sobre la degradación de la biomasa. En la **Figura 1-4**, se puede observar su modo de acción. Las endoglucanasas rompen los enlaces internos de la celulosa, dejando expuestas las unidades que conforman el polisacárido. Luego, las exoglucanasas rompen estas unidades obteniendo secciones más pequeñas conocidas como celobiosa. Por último, las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa en monómeros conocidos como glucosa. Las celulasas se pueden recuperar del sobrenadante de la hidrólisis enzimática y recircular al sistema incrementando la tasa y rendimiento del proceso, a la vez que disminuye el consumo de enzimas y por lo tanto el costo de esta operación. Al recircular las enzimas, se puede acumular celobiosa y glucosa, lo cual disminuye su actividad por fenómenos de inhibición [Ibíd]. Para evitar este inconveniente se han planteado alternativas como: aumentar la concentración de enzimas, suplementar con β -glucosidasas, remover los azúcares liberados (ultrafiltración) o realizar sacarificación y fermentación simultánea (SFS) [Sun y Cheng, 2002].

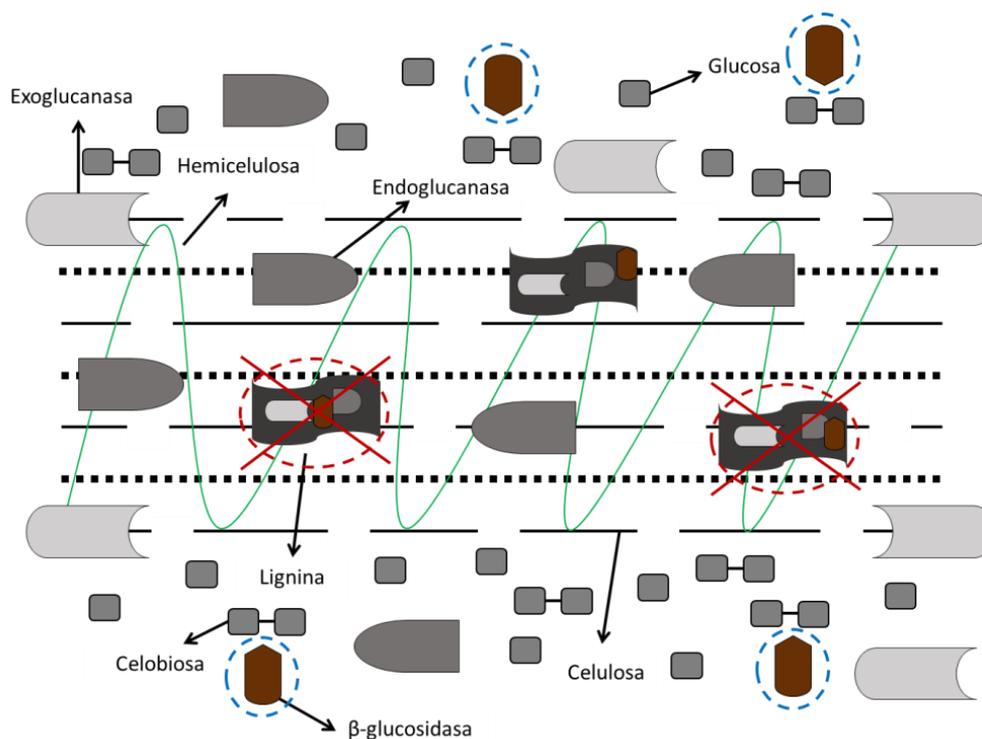


Figura 1-4: Acción de las celulasas sobre la biomasa lignocelulósica.
Fuente. Adaptado de Chandel *et al.*, 2012.

Las β -glucosidasas tienen un rol muy importante en la hidrólisis enzimática al transformar la celobiosas en glucosa evitando problemas de inhibición por producto. Se pueden clasificar según la especificidad al sustrato en: (1) aril- β -glucosidasas que actúan sobre los aril-glucósidos, (2) celobiasas, que hidrolizan la celobiosas en glucosa y (3) enzimas específicas a un grupo de diferentes sustratos [Singhania *et al.*, 2013]. Por otro lado, la mayoría de los hongos filamentosos productores de celulasas secretan altas cantidades de endo y exoglucanasas, junto con bajas cantidades de β -glucosidasas. Debido a esta baja producción, la adición de cocteles enzimáticos con solo celulasas no presentan un buen rendimiento durante la hidrólisis, lo cual obliga a suplementarlos con β -glucosidasas. Para evitar este inconveniente se ha optado por producir los cocteles enzimáticos en co-cultivo, garantizando una alta actividad de celobiasas. En una hidrólisis enzimática de biomasa, la dosis de β -glucosidasas debe ser controlada para evitar problemas de inhibición de glucosa. En la actualidad, existen complejos de celulasas tolerantes a la glucosa, lo cual previene este fenómeno de inhibición.

Las celulasas no solo se emplean para la producción de glucosa en una hidrólisis enzimática, también se usan en la fabricación de detergentes, papel, alimentos y demás industrias de base biotecnológica.

1.3.2. Enzimas complementarias

Además de las celulasas y β -glucosidasas, existen otras enzimas consideradas como complementarias durante la hidrólisis enzimática como: glucuronidasas, acetilesterasas, xilanasas, β -xilosidasas, galactomananasas y glucomanasas [Sun y Cheng, 2002]. Las xilanasas son las enzimas complementarias más empleadas. Su función es degradar la hemicelulosa residual presente en la biomasa pretratada a xilo-oligómeros para incrementar el acceso de las celulasas a la celulosa. Los xilo-oligómeros pueden generar problemas de inhibición sobre las xilanasas, por lo que se recomienda la suplementación o el uso de un complejo enzimático de xilanasas con actividad β -xilosidasas [Modenbach y Nokes, 2013]. En la **Tabla 1-4** se observan algunos complejos multi-enzimáticos, donde CBH1 es celobiohidrolasa; CBH2, celobiohidrolasa 2; EG1, endo- β 1,4-glucanasa 1; BG, β -glucosidasa; EX3, endo- β 1,4-xilanasas 3; BX, β -xilosidasa; E.E., CBH1 + CBH2 + EG1 + BG + EX3 + BX; Cel61A, endo- β 1,4-glucanasa 4; α -Glr, α -glucuronidasa; Abf2, arabinosidasa 2; Cel5A, endo- β 1,4 glucanasa 2; EX2, endo- β 1,4-xilanasas; Cel12A, endo- β 1,4-glucanasa 3.

Complejo de enzimas	Función de enzimas complementarias
Celulasas + β -glucosidasa	Evitar la inhibición (por producto) de las celulasas por la celobiosa
Celulasas + β -glucosidasa + xilanasas	Degradar la hemicelulosa para mejorar la accesibilidad a la celulosa
Celulasas + β -glucosidasa + xilanasas + β -xilosidasa	Evitar la inhibición (por producto) de la xilanasas por los xilooligómeros
Celulasas + β -glucosidasa + pectinasas	Remover la pectina que recubre las microfibras de celulosa
Celulasas + endoxilanasas + α -L-arabinofuranosidasas	Remover el grupo arabinofuranosil que restringe el acceso de las xilanasas a la hemicelulosa
CBH1 + CBH2 + EG1 + BG + EX3 + BX	Sistema enzimático de alta eficiencia al emplear las enzimas esenciales
E.E. + Cel61A + α -Glr + Abf2 + Cel5A + EX2 + Cel12A	Sistema multi-enzimático de alta eficiencia al emplear enzimas esenciales y de acceso.

Tabla 1-4: Complejos multi-enzimáticos y acción de algunas enzimas complementarias.

Fuente. Adaptado de Huang *et al*, 2011.

1.3.3. Hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos

La hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos es una de las opciones más prometedoras para lograr la factibilidad económica de la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Se conoce como una alta concentración de sólidos

valores por encima de 15 %p/p. En la hidrólisis enzimática se debe garantizar una alta concentración de azúcares fermentables para lograr elevadas concentraciones de etanol que reduzcan el costo asociado al proceso de destilación. Por ejemplo, cuando la concentración de etanol al finalizar una fermentación se encuentra por encima de 4 %p/p, la destilación se hace más económica. Para alcanzar esa concentración, durante la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, se debe obtener una concentración de azúcares de al menos 8 %p/p que equivaldría a emplear en una hidrólisis enzimática una concentración de sólidos mayor o igual al 20 %p/p [Larsen *et al*, 2008]. Los costos asociados al proceso no solo se reducen en la etapa de destilación. Cuando se realiza hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos, se obtiene una concentración de glucosa fácilmente equiparable a la obtenida con varios biorreactores en serie con concentraciones de sólidos estándar de 5 %p/p. Con esto, se reduce el gasto energético de la hidrólisis al emplear menos equipos, y disminuye la demanda energética de mezclado, calentamiento y enfriamiento.

A pesar de todas las ventajas mencionadas, la hidrólisis enzimática con una alta concentración de sólidos suspendidos también presenta problemas durante su implementación. La falta de agua disponible en el biorreactor genera problemas de transferencia de masa y lubricidad, incrementando el consumo de energía del sistema de agitación. El tiempo de hidrólisis se alarga al manejar altas concentraciones de sólidos siendo necesario incrementar la dosis de enzimas para manejar tiempos mínimos de 72 horas. Además pueden surgir problemas de inhibición por producto o adsorción y/o desactivación de enzimas por parte de la biomasa pretratada [Yang *et al*, 2011a].

Para manejar altas concentraciones de sólidos en la hidrólisis enzimática se plantean diferentes estrategias de alimentación de sustrato pretratado, enzimas o ambos. La hidrólisis pasa de ser, una operación por lotes a lote alimentado, donde el tiempo de dosificación se convierte en un factor determinante de su rendimiento. Autores como Hodge *et al*, y Yang *et al*, evaluaron el desempeño de una hidrólisis enzimática dosificando enzimas junto con biomasa pretratada hasta alcanzar una concentración de 30 %p/p y 15 %p/p, obteniendo rendimientos del 80 % y 70.6 %, respectivamente [Hodge *et al*, 2009a; Yang *et al*, 2011b]. Ambos estudios, atribuyeron la obtención de rendimientos tan altos, al lavado de la biomasa pretratada previa hidrólisis enzimática. A pesar de remover azúcares fermentables adheridos a la biomasa, el lavado, también retira inhibidores potenciales adsorbidos durante el pretratamiento. Adicionalmente, con la dosificación de enzima, los autores garantizaron el incremento

en la productividad durante la hidrólisis al reemplazar la enzima adsorbida por la lignina residual presente en la biomasa o la enzima desactivada por los extensos tiempos de hidrólisis.

1.4. Detoxificación y fermentación de hidrolizados

Al momento de realizar la fermentación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica, se tienen dos problemas: (1) la presencia de inhibidores de la fermentación como furanos y fenoles formados durante el pretratamiento, adsorbidos en la biomasa y liberados durante la hidrólisis enzimática, y (2) la falta de nutrientes apropiados en el hidrolizado para fomentar el crecimiento microbiano. A continuación se describen algunos de los inhibidores presentes en el hidrolizado junto con estrategias de detoxificación y fermentación.

1.4.1. Inhibidores de la fermentación alcohólica

Durante la producción del hidrolizado (pretratamiento e hidrólisis enzimática) se pueden liberar compuestos como ácidos carboxílicos, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF), compuesto fenólicos y sales inorgánicas, que actúan como inhibidores de la fermentación [Wang y Feng, 2010]. Cada uno de estos compuestos tiene un efecto tóxico particular sobre los microorganismos. Por ejemplo, el furfural e HMF interfieren con la actividad de la deshidrogenasa, una enzima presente en la glucólisis, reduciendo la tasa de crecimiento celular. Los compuestos fenólicos interfieren con el transporte de azúcares e integridad de la membrana. La acción tóxica de los ácidos y aldehídos depende de la capacidad que tengan las sustancias de pasar por la membrana, por lo general alteran la generación de energía dentro de la célula [Pienkos y Zhang, 2009]. En la **Tabla 1-5**, se observa el efecto de algunos compuestos inhibidores de fermentación sobre la producción de etanol. Donde Conc., es la concentración de la sustancia e Inhi., es el porcentaje de inhibición respecto a un patrón.

	<i>E. coli</i> LY01		<i>S. cerevisiae</i>		<i>Z. mobilis</i> CP4		<i>P. stipitis</i>	
	Conc. (g/L)	Inhi. (%)	Conc. (g/L)	Inhi. (%)	Conc. (g/L)	Inhi. (%)	Conc. (g/L)	Inhi. (%)
Furfural	3.5	-38	4.0	79	0.95	40	1.3	9
5-HMF	8.0	50	8.0	50	0.05	16	-	-
4-Hidroxi-Benzaldehído	1.0	-38	1.0	72	-	-	-	-
Siringaldehído	2.0	97	-	-	-	-	-	-
Vainillina	2.5	13	-	-	0.13	33	-	-
	1.5	-38	1.0	25	0.04	38	0.09	54
Ácido acético	3.0	98	1.3	50	-	-	-	-
	15.0	21	6.0	74	-	-	10.0	95
	30.0	69	-	-	-	-	10.0	29
Ácido levulínico	20.0	85	40.0	50	-	-	-	-
Ácido 4-hidroxi benzoico	2.5	79	1.0	30	-	-	-	-
Ácido siríngico	5.0	62	1.0	-17	0.09	9	-	-

Tabla 1-5: Efecto de inhibidores de la fermentación sobre la producción de etanol.

Fuente. Adaptado de Pienkos y Zhang, 2009.

1.4.2. Detoxificación de hidrolizados

La detoxificación o acondicionamiento consiste en reducir los compuestos tóxicos presentes en el hidrolizado para mejorar la fermentación. Los métodos de detoxificación se pueden clasificar en biológicos, físicos y químicos [Palmqvist y Hahn-Hagerdal, 2000]. Mientras que las estrategias biológicas y químicas para detoxificación de hidrolizados consisten en convertir los compuestos tóxicos en otros con menor toxicidad, las físicas, buscan la remoción parcial o total de estas sustancias. Cada método de detoxificación, presenta ventajas y desventajas que deben considerarse al momento de su implementación (Ver **Tabla 1-6**).

1.4.3. Fermentación de hidrolizados

Para la fermentación de hidrolizados, se pueden emplear las tres estrategias de uso común en la producción de etanol de primera generación: fermentación por lotes, lote alimentado y continuo. La estrategia a emplear dependerá del rendimiento y productividad del proceso junto con el costo del biorreactor. En las fermentaciones de hidrolizado, el crecimiento celular está muy relacionado con el pH de la fermentación, debido a la cantidad de ácidos débiles no disociados. Cuando se ajusta el pH del hidrolizado a un valor de 4.6, la fase de adaptación de las células puede durar hasta 17 horas, mientras que en pH mayores o iguales a 5, la replicación celular inicia inmediatamente se realiza la inoculación [Palmqvist y Hahn-Hagerdal, 2000]. Una alternativa para superar el efecto de los ácidos débiles del hidrolizado, consiste

en inocular una concentración de células elevada, con lo cual se logra incrementar la productividad del proceso.

Método de detoxificación	Ventajas	Desventajas
Físicos		
Evaporación	Remueve inhibidores volátiles o inhibidores finales como furfural y ácido acético.	No es efectivo con inhibidores derivados de la lignina.
Extracción con solventes	Remueve inhibidores volátiles y no volátiles.	Se requiere una operación unitaria adicional para remover el solvente.
Tamices moleculares	Remueve inhibidores volátiles y no volátiles	Perdida de azúcares
Químicos		
Ca(OH) ₂ – Overliming	Precipita una gran variedad de inhibidores	Degradación de los azúcares presentes
NH ₄ OH, NaOH, etc.	Neutraliza y precipita inhibidores	Menos efectivo que el Ca(OH) ₂
Zeolitas	Remoción de inhibidores	Menos efectivo que el Ca(OH) ₂
Tierras diatomeas	Remoción de inhibidores	Perdida de azúcares
Carbón activado	Remoción de inhibidores	Perdida de azúcares
Adsorbentes poliméricos	Remoción de inhibidores (alta eficiencia)	Costo y posible pérdida de azúcares
Biológicos		
<i>S. cerevisiae</i> Modificada	Degrada inhibidores en compuestos menos tóxicos	Costo y remoción de los compuestos menos tóxicos para su aprovechamiento
Complejo de lacasas y peroxidasa	Degrada inhibidores fenólicos derivados de la lignina	No degrada furanos, ni ácidos alifáticos. Tiempos largos de degradación
Adaptación	Cepas tolerantes a inhibidores	Manipulación y tiempos largos de tratamiento.

Tabla 1-6: Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de detoxificación.

Fuente. Adaptado de Wang y Feng, 2010.

Por lo regular, el inóculo de la fermentación se produce en un biorreactor aparte del empleado para la fermentación, lo cual aumenta los costos de producción del inóculo si este se necesita más concentrado, de allí, que se plantea la recirculación de células como una opción para inocular el fermentador. El factor más importante a considerar en la recirculación de células, es mantener la viabilidad celular. Esta se garantiza suministrando aire al fermentador durante la etapa de adaptación e inoculación con recirculación de células. El hidrolizado detoxificado también debe suplementarse con lípidos, proteínas, vitaminas, aminoácidos, y demás sustancias que brinden un ambiente favorable para el crecimiento celular y producción de etanol. Cuando la concentración de inhibidores es muy alta, se recomienda realizar una fermentación

tipo lote alimentado o continuo. Con este tipo de fermentación se logra mantener las concentraciones de inhibidores en un nivel tolerable para las células, mejorando la productividad de etanol respecto a una fermentación por lotes [Tahezadeh *et al*, 1999].

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Establecer condiciones para la obtención de un hidrolizado de biomasa lignocelulósica de *Panicum maximum*, evaluando el efecto de métodos de detoxificación para mejorar su fermentabilidad a etanol.

2.2. Objetivos Específicos

Evaluar el efecto de la concentración de sólidos y concentración de ácido sulfúrico diluido en la etapa de pretratamiento previo a la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica de *P. maximum*.

Determinar la concentración enzimática mínima de celulasas y β -glucosidasas para la hidrólisis de biomasa pretratada con ácido sulfúrico a azúcares fermentables.

Determinar la influencia del aumento en la concentración de sólidos de una hidrólisis enzimática empleando biomasa pretratada con ácido sulfúrico diluido.

Evaluar tratamientos de detoxificación del hidrolizado obtenido en un proceso con altas concentraciones de sólidos para mejorar su fermentabilidad a etanol.

3. Materiales y Métodos

En esta sección, se describe como se desarrollaron las diferentes etapas de experimentación junto con las técnicas analíticas empleadas, con el fin de cumplir los objetivos propuestos.

3.1. Materia prima

La biomasa lignocelulósica empleada fue pasto Guinea identificado por el nombre científico de *Panicum maximum* suministrada por el Centro de Investigación La Libertad, afiliado a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica (Puerto López, Meta, Colombia). En la **Tabla 3-1**, se encuentra la información referente al ecotipo y cosecha del *Panicum maximum*.

Tabla 3-1: Información del ecotipo y cosecha de *Panicum maximum*.

<i>Panicum maximum</i> (Biomasa lignocelulósica)	
Latitud de origen	4°N
Ecotipo	CIAT 36000
Morfología	Tallos delgados
Localización del cultivo	Km 17, vía Villavicencio – Puerto López, Meta, Colombia
Elevación	340 m.s.n.m.
Fecha de Siembra	Octubre, 2011
Fecha de Cosecha	Marzo, 2012

3.1.1. Preparación del material

La biomasa lignocelulósica se procesó en una picadora (CID-105P, CID, Santa Catarina, Brasil), logrando reducir el tamaño de los tallos a 5 ± 0.76 cm. El material se colocó en una estufa de secado (LDO-100S, Daihan LabTech Co., Kyonggi-do, Corea) a 60°C por 48 horas para disminuir la humedad y evitar su deterioro. Posteriormente, se empleó un molino de cuchillas para alcanzar el tamaño final promedio del material (2 mm). El material se almacenó a temperatura ambiente en recipientes tapa rosca herméticos completamente llenos.

3.1.2. Caracterización granulométrica de la biomasa

Luego de la adecuación del material, se determinó el tamaño de partícula promedio de la biomasa empleando un análisis por tamizado [ASTM International, 2010]. Se utilizaron tamices estándar Tyler de malla No. 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 170 y 230. La prueba de tamizado se realizó por triplicado. El tamaño de partícula promedio (diámetro medio) se calculó mediante la **Ecuación (3.1)**.

$$\overline{D}_w = \sum_{i=1}^n x_i \overline{D}_{pi} \quad (3.1)$$

Donde:

\overline{D}_w = Diámetro medio de masa

x_i = Fracción másica

\overline{D}_{pi} = Diámetro de partícula en el incremento

El \overline{D}_{pi} se determinó en base al diámetro promedio de las dos mallas consecutivas, por ejemplo, 30/40, 40/50, 50/60, ect. El diámetro de cada tamiz se obtuvo al observar la información consignada en cada uno de ellos.

3.1.3. Caracterización fisicoquímica de la biomasa

La caracterización fisicoquímica de la biomasa se realizó empleando las técnicas del *National Renewable Energy Laboratory* – NREL, analizando el porcentaje de humedad (**Anexo A**), contenido de glucosa y xilosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), porcentaje de lignina ácida soluble e insoluble (**Anexo B**) y ceniza (**Anexo C**) [Sluiter *et al*, 2008a; Sluiter *et al*, 2008b; Sluiter *et al*, 2008c]. Cada una de las técnicas se hizo por triplicado.

3.2. Pretratamiento con ácido diluido

Después de adecuar la biomasa lignocelulósica, se determinó el desempeño del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido evaluando la concentración de ácido y la concentración de sólidos con una posterior prueba de digestibilidad de la biomasa pretratada mediante una hidrólisis enzimática. Al analizar los efectos de las variables experimentales sobre recuperación de sólidos, digestibilidad de la biomasa pretratada, rendimiento de celulosa y hemicelulosa, se determinó la mejor condición de pretratamiento con ácido diluido para los experimentos subsecuentes.

3.2.1. Condiciones de operación del pretratamiento

El ácido empleado en el pretratamiento fue ácido sulfúrico 95 % (Merck, Darmstadt, Alemania). Para la evaluación del pretratamiento se manejaron tres concentraciones de ácido sulfúrico diluido (0.5; 1; 1.5 %p/v) [Jensen *et al*, 2010; Schell *et al*, 2003; Sun & Cheng, 2005] y tres concentraciones de sólidos (5; 8.5; 12 %p/p) [Ballesteros *et al*, 2008; Schell *et al*, 1992]. La temperatura del pretratamiento fue de 130°C con un tiempo de 60 minutos [Sun & Cheng, 2005]. El diseño experimental fue central compuesto de cara centrada con puntos estrella. Estos puntos estrella permiten modelar la curvatura respecto a cada factor experimental. El diseño consistió de 2 bloques y 2 réplicas para los puntos centrales por bloque soportado en el método de superficie de respuesta. En total se obtuvieron 20 experimentos incluyendo 4 repeticiones del punto central (**Tabla 3-2**). Cada bloque representó la repetición en el tiempo de cada experimento. El software Design-Expert ® 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) fue utilizado para la generación y análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental.

A su vez, se generó un modelo cuadrático donde la variable de respuesta fue la recuperación de sólidos (%):

$$E\{Y\} = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_{11} \cdot X_1^2 + \beta_{22} \cdot X_2^2 \quad (3.2)$$

Donde $E\{Y\}$ es el valor esperado de la variable de respuesta, β_0 es el intercepto del modelo, X_1 es la concentración de ácido, X_2 es la concentración de sólidos, β_1 es el coeficiente para la concentración de ácido, β_2 es el coeficiente para la concentración de sólidos, β_{12} es el coeficiente para la interacción entre la concentración de ácido y sólidos, β_{11} es el coeficiente para los efectos de segundo orden de la concentración de ácido y β_{22} es el coeficiente para los efectos de segundo orden de la concentración de sólidos. El significado estadístico y los coeficientes de regresión del modelo se estimaron a partir del análisis de varianza (ANOVA). La precisión del modelo se comprobó mediante el coeficiente de determinación (R^2), el cual, mientras más cercano a 1, representa un mejor ajuste a los datos experimentales [Montgomery, 2004].

La biomasa lignocelulósica y el ácido diluido se colocaron gravimétricamente con respecto a una base total de 100 g (ácido sulfúrico diluido + biomasa seca) en recipientes

de 250 mL tipo tapa rosca Boeco®. El pretratamiento se llevó a cabo en una autoclave automática (AAC046, Astell Scientific, Kent, Inglaterra) garantizando pleno control sobre factores como la temperatura. El tiempo se contabilizó al alcanzarse la temperatura de pretratamiento. A continuación, se realizó una filtración al vacío empleando filtros de membrana para análisis de tipo cualitativo previamente secados y pesados. Mediante este proceso se obtuvieron: una fracción líquida y una sólida. La fracción sólida fue llamada biomasa pretratada, se lavó en su totalidad con agua destilada y fue colocada a secar en una estufa de secado a 45°C hasta peso constante.

Tabla 3-2: Diseño experimental para el pretratamiento con ácido diluido de *P. maximum*.

Experimento	Bloque	CA* (%p/v)		CS* (%p/p)	
		Codificado	Real	Codificado	Real
1	1	-1	0.5	-1	5
2	1	+1	1.5	+1	12
3	1	0	1	-1	5
4	1	0	1	+1	12
5	1	0	1	0	8.5
6	1	0	1	0	8.5
7	1	-1	0.5	0	8.5
8	1	-1	0.5	+1	12
9	1	+1	1.5	-1	5
10	1	+1	1.5	0	8.5
11	2	-1	0.5	-1	5
12	2	+1	1.5	+1	12
13	2	0	1	-1	5
14	2	0	1	+1	12
15	2	0	1	0	8.5
16	2	0	1	0	8.5
17	2	-1	0.5	0	8.5
18	2	-1	0.5	+1	12
19	2	+1	1.5	-1	5
20	2	+1	1.5	0	8.5

*Concentración de ácido (CA); concentración de sólidos (CS).

Con este secado, se logró determinar la recuperación de sólidos pretratados luego del pretratamiento mediante la **Ecuación (3.3)**:

$$\text{Recuperación de sólidos pretratados (\%)} = \frac{m_2 \cdot 100}{m_1} \quad (3.3)$$

Donde:

m_1 = Masa inicial de biomasa (g)

m_2 = Masa final de biomasa pretratada (g)

La fracción líquida se recolectó y congeló a una temperatura de $-8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ para un posterior análisis de glucosa y xilosa por HPLC con el fin de realizar el balance de materia del pretratamiento (Ver **3.2.3**).

3.2.2. Digestibilidad de la biomasa pretratada

Con el objetivo de evaluar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa presente en la biomasa pretratada se realizó una prueba de digestibilidad. Para el desarrollo de la prueba, se empleó biomasa pretratada resultante de cada una de las condiciones evaluadas anteriormente. Cada biomasa pretratada fue sometida a una hidrólisis enzimática con una concentración de sólidos de 5 %p/p empleando una solución tampón de citrato de sodio 50 mM y pH 4.8. Las enzimas utilizadas en la prueba fueron: un complejo de celulasas (NS22086; Lot # VCPI0006) y β -glucosidasas (NS22118; Lot # DCN00218) donadas por la empresa Novozymes A/S (Dinamarca). Las enzimas presentaron una actividad de 1000 unidades de hidrólisis de biomasa (BHU)/g de mezcla y 250 unidades de celobiosa (CBU)/g de mezcla, respectivamente. La unidad de hidrólisis de biomasa mide la actividad enzimática necesaria para hidrolizar celulosa presente en un sustrato complejo en condiciones estándar. Por otra parte, la unidad de celobiosa es la cantidad de enzima necesaria para liberar 2 μmol de glucosa por minuto en condiciones estándar con celobiosa como sustrato. Para observar la ficha técnica de las enzimas dirigirse al **Anexo F**. Estas actividades enzimáticas se verificaron empleando el protocolo descrito por Zhang *et al*, presentando una variación menor al 5% respecto a lo reportado en las fichas técnicas [Zhang *et al*, 2009].

Para la prueba de digestibilidad, se dosificó una actividad de 25 BHU/g de biomasa pretratada de celulasas y 0.27 CBU/g de biomasa pretratada de β -glucosidasas, límites superiores de dosificación de cada enzima según la ficha técnica. Para el ajuste de estas actividades se emplearon los parámetros fisicoquímicos de los enzimas, consignados en las fichas técnicas. Como medio de soporte y temperatura para la hidrólisis enzimática se utilizó una solución tampón de citrato de sodio a 50 mM, pH 4.8 y 50°C , condiciones que garantizan la mejor actividad enzimática según la ficha técnica. Para la preparación de la solución, se disolvieron 105 g de ácido cítrico monohidratado en 375 mL de agua destilada. Luego se agregaron 2 g de hidróxido de sodio granulado hasta alcanzar un pH de 4.3 y se diluyó hasta un volumen de 500 mL. En este punto se tiene una solución de citrato de sodio a 1 M y pH de 4.5. Para obtener la concentración de 50 mM y pH de 4.8,

esta solución de diluyó 1:19. En el caso que el pH no fuera el indicado, su ajuste se realizaba con ácido cítrico monohidratado o hidróxido de sodio.

La hidrólisis se llevó a cabo en recipientes de 50 mL tapa rosca Boeco®. Las condiciones del ensayo fueron: 50°C y agitación magnética durante 48 horas. La concentración inicial de sólidos de la hidrólisis enzimática se ajustó dosificando solución tampón y biomasa pretratada por gravimetría respecto a una base total de 40 g (solución tampón + biomasa pretratada) y manteniéndose constante durante todo el proceso. En el transcurrir del proceso, se efectuaron controles de contaminación microbiana, tomando una muestra de 250 µL cada 12 horas. Los medios para determinar la presencia de contaminación fueron: agar papa-dextrosa (PDA) para hongos y levaduras, mientras que para bacterias se empleó el agar *Luria-Bertani* (LB; 10 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L cloruro de sodio y 15 g/L Agar). Las cajas con medio PDA se incubaron a 25°C por 96 horas y las cajas con medio LB se incubaron a 37°C por 48 horas.

La concentración de azúcares reductores (g/L) se analizó mediante el mismo modelo estadístico empleado para estudiar la variable experimental, recuperación de sólidos, **Ecuación (3.2)**, y usando el mismo software estadístico.

3.2.3. Cuantificación de carbohidratos

La concentración de glucosa y xilosa en la fracción líquida del pretratamiento se obtuvo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Se empleó una columna Shodex Sugar SC1011 empacada en un material de relleno de un copolímero estireno-divinilbenceno sulfo (Ca^{2+}) con unas dimensiones de 8 mm x 300 mm y diseñada exclusivamente para la separación de azúcares (Shodex New York, NY, USA). El equipo utilizado fue un cromatógrafo Dionex (Thermo Scientific, Waltham, MA) con un detector de índice de refracción, RI-101 a una temperatura de 40°C (Shodex New York, NY, USA). Como fase móvil se usó agua desionizada y desgasificada con un flujo de 0.8 mL/min. El volumen de inyección fue 10 µL. La temperatura del horno fue de 80°C. Las curvas de calibración de glucosa y xilosa se pueden observar en el **Anexo D**.

Para la cuantificación de azúcares reductores totales durante la hidrólisis enzimática se empleó el método colorimétrico del ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS) [Ghose, 1987].

Recientemente, la eficacia de emplear este método como alternativa de cuantificación de azúcares en una hidrólisis enzimática ha sido demostrada por otros autores [Saqib & Whitney, 2011; Xiao *et al*, 2012; Wood *et al*, 2012]. La curva de calibración de glucosa se puede observar en el **Anexo E**. Para el desarrollo del método, se colocó una muestra de concentración conocida de glucosa de 0.5 mL en un tubo de ensayo junto con 0.5 mL de reactivo DNS. Los tubos de ensayo se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y luego en agua con hielo por 5 minutos. Luego, se agregó 2.5 mL de agua destilada. Los tubos se dejaron reposar por 10 minutos agitándolos cada 2.5 minutos. La absorbancia se midió a 540 nm en un espectrofotómetro Genesys 10uv® (Thermo Scientific, Waltham, MA). Todas las muestras se procesaron por triplicado. Cuando la concentración de azúcares reductores se encontraba por fuera del rango de cuantificación de la curva de calibración se realizaron diluciones.

3.3. Hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos

Los ensayos de hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos se realizaron en dos etapas. En la primera se determinó la concentración mínima de enzimas del complejo de celulasas (NS22086) y β -glucosidasas (NS22118) para una hidrólisis enzimática con una concentración de sólidos 5 %p/p de biomasa pretratada. Al determinar la mínima concentración de enzimas que se debe emplear para degradar la celulosa presente en la biomasa pretratada se logra disminuir parte de los costos asociados a la hidrólisis. La segunda parte consistió en la evaluación de una estrategia de dosificación de biomasa pretratada-enzima para lograr una hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos que garantice una concentración de azúcares elevada en el hidrolizado. Teniendo en cuenta que este será empleado como sustrato en un proceso de fermentación para la producción de etanol, se busca tener más azúcares que fermentar para lograr incrementar la concentración de etanol al final de la fermentación. A mayor etanol presente en el hidrolizado fermentado, los costos de las operaciones de separación se reducen.

3.3.1. Concentración mínima de enzimas

Para el estudio de la concentración mínima de enzimas se emplearon las mismas condiciones de la prueba de digestibilidad, reportadas en la sección **3.2.2**. Con el fin de

evitar contaminación bacteriana durante los ensayos de hidrólisis enzimática se empleó tetraciclina a una concentración de 10 µg/mL. Por medio de ensayos previos de compatibilidad se logró determinar que esta concentración de tetraciclina no afecta el crecimiento de la levadura, teniendo en cuenta que no se incluye dentro del proceso una operación de recuperación de tetraciclina previa etapa de fermentación.

En los ensayos se manejaron diferentes actividades del complejo de celulasas y β-glucosidasas. El límite inferior de la actividad para las celulasas fue el indicado en la ficha técnica de la enzima (1.30 BHU/g). Para las β-glucosidasas el límite inferior fue cero (0 CBU/g), considerando que los complejos comerciales de celulasas tienen una actividad limitante de esta enzima en su composición y el límite superior fue establecido con base en la ficha técnica (1.77 CBU/g). La dosis de enzima se estableció en función de la cantidad de biomasa pretratada, teniendo en cuenta que la próxima variable a evaluar sería el efecto de la concentración de sólidos (biomasa pretrada) durante la hidrólisis enzimática. La matriz experimental se obtuvo bajo los criterios de un diseño central compuesto con 2 réplicas del punto central, para un total de 11 experimentos (**Tabla 3-3**). Como blanco se realizó una hidrólisis enzimática con biomasa sin tratar con el fin de evidenciar la efectividad del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido. La concentración de azúcares reductores totales se analizó por el método colorimétrico DNS descrito en la sección 3.2.3. La concentración de azúcares reductores (g/L) se analizó mediante el mismo modelo estadístico empleado para estudiar la variable experimental, recuperación de sólidos, **Ecuación (3.2)**, y usando el mismo software estadístico.

Tabla 3-3: Diseño experimental para la determinación de la dosis de enzimas mínima en la hidrólisis enzimática.

Experimento	Complejo celulasas NS22086 (BHU/g)	β-glucosidasa NS22118 (CBU/g)
1	61.44	1.77
2	61.44	0.00
3	31.37	0.89
4	1.30	1.77
5	31.37	0.00
6	31.37	1.77
7	1.30	0.89
8	61.44	0.89
9	31.37	0.89
10	1.30	0.00
11	31.37	0.89

3.3.2. Hidrólisis enzimática por lote alimentado

El objetivo de emplear una hidrólisis enzimática tipo lote alimentado es lograr una alta concentración de sólidos en el medio para conseguir una concentración de azúcares elevada. Como se observa en la **Figura 3-1**, los ensayos iniciaron con una concentración de biomasa pretratada de 5% p/p, realizando dosificaciones de biomasa pretratada y enzimas a las 6, 12 y 24 horas hasta alcanzar concentraciones de sólidos del 7, 9, 10, 12, 15 y 20 %p/p. El tiempo total de hidrólisis enzimática fue de 48 horas.

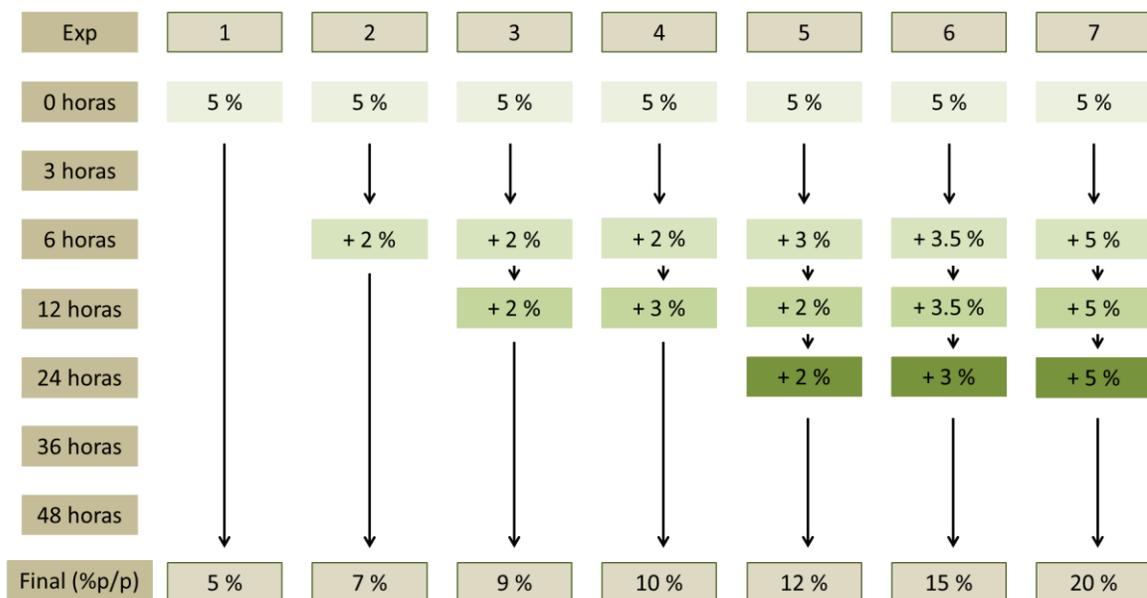


Figura 3-1: Dosificación de biomasa pretratada en la hidrólisis enzimática tipo lote alimentado.

Para cada dosificación se agregó una cantidad de enzima preestablecida (complejo de celulasas – β -glucosidasa): +2 % (36.04 μ L – 4 μ L), +3 % (54.6 μ L – 6 μ L), +3.5 % (64 μ L – 7 μ L) y +5 % (91.53 μ L – 10.07 μ L). La selección de los tiempos de dosificación y tiempo total se realizaron con base en datos obtenidos de ensayos preliminares de hidrólisis enzimática con una concentración de sólidos de 5 %p/p con una dosis de enzima similar a la reportada en la sección 3.2.2. El tiempo final de hidrólisis de estos ensayos preliminares fue de 144 horas realizando muestreos cada 24 horas. En estos ensayos se observó que después de 48 horas de hidrólisis enzimática la concentración

de glucosa no se incrementó de forma significativa, pasando de 15.11 g/L a 16.98 g/L (t=144 h), por esta razón el tiempo final de hidrólisis se fijó en 48 horas. Los tiempos de dosificación se establecieron antes de las 24 horas, por la rápida degradación de la biomasa pretratada al inicio de la hidrólisis, al encontrarse en el medio una concentración de 11.35 g/L de glucosa a las 24 horas de proceso. La dosis de biomasa pretratada en cada tiempo de dosificación se estableció respecto a lo reportado por otros autores tratando de dejar tiempos prudentes para la degradación de celulosa presente en la biomasa pretratada [Lu *et al*, 2010; Rabelo, 2010; Yang *et al*, 2010; Zhao *et al*, 2012]. La dosis de enzima se estableció respecto a la cantidad de biomasa pretratada suministrada en cada dosificación, es decir unidades de enzima por gramo de biomasa pretrada.

La solución tampón, pH, agitación, temperatura fue la misma de la sección 3.2.2. El antibiótico a emplear y la concentración mínima de enzimas en cada dosis se calculó en base a los resultados del inciso 3.3.1. Los ensayos se realizaron por triplicado. La concentración de azúcares reductores totales se determinó por el método de DNS (Ver 3.2.3).

3.4. Detoxificación y fermentación

Para estos ensayos se seleccionó el hidrolizado obtenido a partir de las mejores condiciones determinadas en la sección 3.3.2. Este hidrolizado se empleó para evaluar las dos últimas etapas de la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, en este caso, *Panicum maximum*: detoxificación del hidrolizado y fermentación. En la etapa de detoxificación se emplearon dos tratamientos: hidróxido de sodio y carbón activado usando unas condiciones de proceso previamente establecidas por otros autores [Hodge *et al*, 2009b; Millati *et al*, 2002; Miyafuji *et al*, 2003; Rodrigues *et al*, 2001]. En la fermentación se empleó *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo de referencia, determinando luego de 24 horas, concentración de etanol, rendimiento y productividad.

3.4.1. Métodos de detoxificación

Para la detoxificación de los hidrolizados se emplearon tres tratamientos: detoxificación con hidróxido de sodio, carbón activado y una combinación de ambos. Cada uno de los métodos de detoxificación se aplicó sobre 150 mL de hidrolizado.

Detoxificación con hidróxido de sodio. El pH del hidrolizado se ajustó a un valor de 12 usando hidróxido de sodio. Las condiciones de la detoxificación fueron de 60°C a 150 rpm por 1 hora [Millati *et al*, 2002; Hodge *et al*, 2009b].

Detoxificación con carbón activado. El hidrolizado se mezcló con 3.75 g de carbón activado (Merck, Darmstadt, Alemania), 2.5 %p/p, a una temperatura de 60°C, 150 rpm por 1 hora [Miyafuji *et al*, 2003; Rodrigues *et al*, 2001].

Combinación de métodos. Primero se realizó una detoxificación con carbón activado seguida del tratamiento con hidróxido de sodio [Hodge *et al*, 2009b].

Luego de la detoxificación, cada hidrolizado fue centrifugado a 15000 rpm por un tiempo de 10 minutos. El sobrenadante se filtró al vacío empleando una membrana de nitrato de celulosa de 0.45 µm. Todo esto para retirar sólidos suspendidos y disminuir interferencias en la fermentación.

3.4.2. Fermentación de hidrolizados

La levadura empleada para los ensayos de fermentación fue *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red® (Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, France). La levadura se mantuvo en una solución de glicerol al 30 %p/v en un criocongelador a $-70 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Para los ensayos, la activación de la levadura se realizó en medio líquido extracto de levadura y malta (YM) a $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 24 horas. Luego se realizó un cultivo en medio PDA a $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Después de 48 horas de crecimiento, se incubó en un recipiente tipo Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de trabajo de 50 mL de medio YM modificado (50 g/L glucosa, 5 g/L peptona, 3 g/L extracto de levadura, 3 g/L extracto de malta, 1 g/L de cloruro de amonio, 0.4 g/L fosfato ácido de potasio) a $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 24 horas. El cultivo fue centrifugado en un recipiente estéril a 10000 rpm por 10 min. Las células de levadura fueron resuspendidas en solución salina 0.85 %p/v ajustando la población celular a un valor aproximado de 1×10^9 células/mL.

A cada uno de los hidrolizados detoxificados se les ajustó el pH a un valor de 5 empleando hidróxido de sodio o ácido sulfúrico según sea el caso. El volumen de fermentación fue de 50 mL de hidrolizado suplementado con 0.33 g de *Yeast Nitrogen Base* – YNB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) [Banerjee *et al*, 2012]. Cada hidrolizado suplementado se

inoculó con 10 %v/v garantizando una concentración inicial de células de 1×10^7 células/mL. La fermentación se llevó a cabo a una temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, con agitación magnética por 24 horas. Con el fin de garantizar condiciones anaerobias se usaron recipientes tipo tapa rosca Boeco® de 50 mL, acoplando un sistema de *air-locks* (**Figura 3-2**). Este accesorio permite la salida de dióxido de carbono, subproducto de la fermentación evitando la entrada de oxígeno, de esta manera se garantiza la formación de una atmósfera anaeróbica al interior del sistema experimental. La cuantificación de glucosa, etanol y glicerol se realizó por HPLC. Se empleó una columna Bio-Rad Aminex HPX-87H (Bio-Rad Philadelphia, PA, USA). El equipo utilizado fue un cromatógrafo Dionex (Thermo Scientific, Waltham, MA) con un detector de índice de refracción, RI-101 a una temperatura de 40°C (Shodex New York, NY, USA). Como fase móvil se usó una solución de ácido sulfúrico 5 mM desionizada y desgasificada con un flujo de 0.6 mL/min. El volumen de inyección fue 20 μL . La temperatura del horno fue de 65°C . Ver **Anexo D**. La concentración final de biomasa se determinó por peso seco con el objetivo de determinar rendimientos masicos respecto al consumo de sustrato.

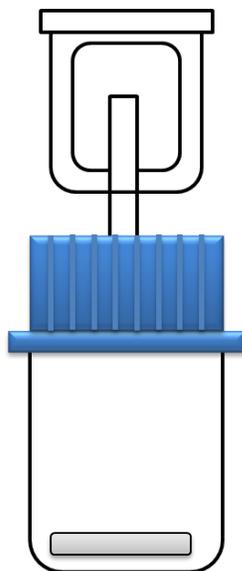


Figura 3-2: Esquema del sistema de fermentación de hidrolizados a escala de laboratorio.

4. Resultados y Análisis

4.1. Caracterización de la biomasa de *Panicum maximum*

Antes de iniciar la caracterización de la biomasa de *P. maximum*, se determinó el contenido de humedad de la muestra fresca (Sluiter *et al*, 2008c). En la **Tabla 4-1**, se puede observar el contenido de humedad:

Tabla 4-1: Porcentaje de humedad de una muestra fresca de *P. maximum*.

Masa Pasto Inicial (g)	Masa Pasto Final (g)	ST* (%)	ST* Promedio (%)	Humedad (%)	Humedad Promedio (%)
1.000	0.233	23.33		76.67	
1.094	0.224	20.48	23.27 ± 2.77	79.52	76.73 ± 2.77
0.992	0.258	26.01		73.99	

*ST: Sólidos Totales.

La biomasa se secó en una estufa de secado a 105 ± 5 °C por 5 horas. La humedad promedio de la biomasa fresca (pasto recién cosechado) fue de 76.73 ± 2.77 %, lo que correspondió a una concentración de sólidos promedio de 23.27 ± 2.77 %. La biomasa fresca se pasó por una picadora y un molino de cuchillas para reducir su tamaño según lo estipulado en la sección 3.1.1. El tamaño de partícula de *Panicum maximum* seco y molido, se evaluó en una serie de tamices con tamaño de malla 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 170 y 230. El análisis granulométrico se realizó por triplicado, obteniendo los valores promedio de masa retenida junto con el promedio de la fracción másica en cada tamiz y la fracción másica acumulada. Los valores se encuentran en la **Tabla 4-2**.

Utilizando los valores de la **Tabla 4-2**, se obtiene la **Figura 4-1**, que relaciona la fracción másica retenida y acumulada respecto al diámetro de partícula medio. Se observó que la biomasa empleada en los experimentos (72 %), tenía un diámetro medio entre 0.1375 (100/120) y 0.5125 mm (30/40), con un diámetro de partícula promedio del pasto tamizado fue de 0.27 mm.

Tabla 4-2: Caracterización granulométrica de la biomasa de *Panicum maximum*.

Tamiz	$\overline{D_p}$ (mm)	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
		MR (g)	FMR (%)	MR (g)	FMR (%)	MR (g)	FMR (%)
30	>0.6	18.8	14.1	19.8	15.2	22.3	16.7
30/40	0.5125	18.3	13.7	16.9	13.0	19.9	14.9
40/50	0.3625	22.4	16.8	29.1	22.4	31.3	23.4
50/60	0.275	8.1	6.1	6.4	4.9	7.5	5.6
60/80	0.215	25.8	19.3	21.7	16.7	20.5	15.3
80/100	0.165	19.6	14.7	14.3	11.0	9.0	6.7
100/120	0.1375	5.6	4.2	5.2	4.0	4.6	3.4
120/140	0.1155	4.1	3.1	3.3	2.5	3.4	2.5
140/170	0.098	5.3	4.0	4.8	3.7	6.9	5.2
170/230	0.0765	1.5	1.1	1.7	1.3	2.6	1.9
Colector	<0.0765	4.0	3.0	6.9	5.3	5.9	4.4

MR: Masa retenida en cada tamiz; FMR: Fracción másica en cada tamiz.

(a) Masa retenida y fracción másica retenida en cada uno de los ensayos de granulometría.

Tamiz	$\overline{D_p}$ (mm)	PMR (g)	PFM (%)	FMA (%)	Φ_1
30	>0.6	20.3 ± 1.5	15.3 ± 1.1	15.3	0.15
30/40	0.5125	18.4 ± 1.2	13.9 ± 0.8	29.2	0.14
40/50	0.3625	27.6 ± 3.8	20.8 ± 2.9	50.0	0.21
50/60	0.275	7.3 ± 0.7	5.5 ± 0.5	55.5	0.06
60/80	0.215	22.7 ± 2.3	17.1 ± 1.7	72.6	0.17
80/100	0.165	14.3 ± 4.3	10.8 ± 3.3	83.4	0.11
100/120	0.1375	5.1 ± 0.4	3.9 ± 0.3	87.3	0.04
120/140	0.1155	3.6 ± 0.4	2.7 ± 0.3	90.0	0.03
140/170	0.098	5.7 ± 0.9	4.3 ± 0.6	94.3	0.04
170/230	0.0765	1.9 ± 0.5	1.5 ± 0.4	95.8	0.01
Colector	<0.0765	5.6 ± 1.2	4.2 ± 0.9	100.00	0.04

PMR: Promedio masa retenida; PFM: Promedio fracción másica retenida; FMA: Fracción másica acumulada.

(b) Promedio de masa retenida y fracción másica retenida de los ensayos de granulometría.

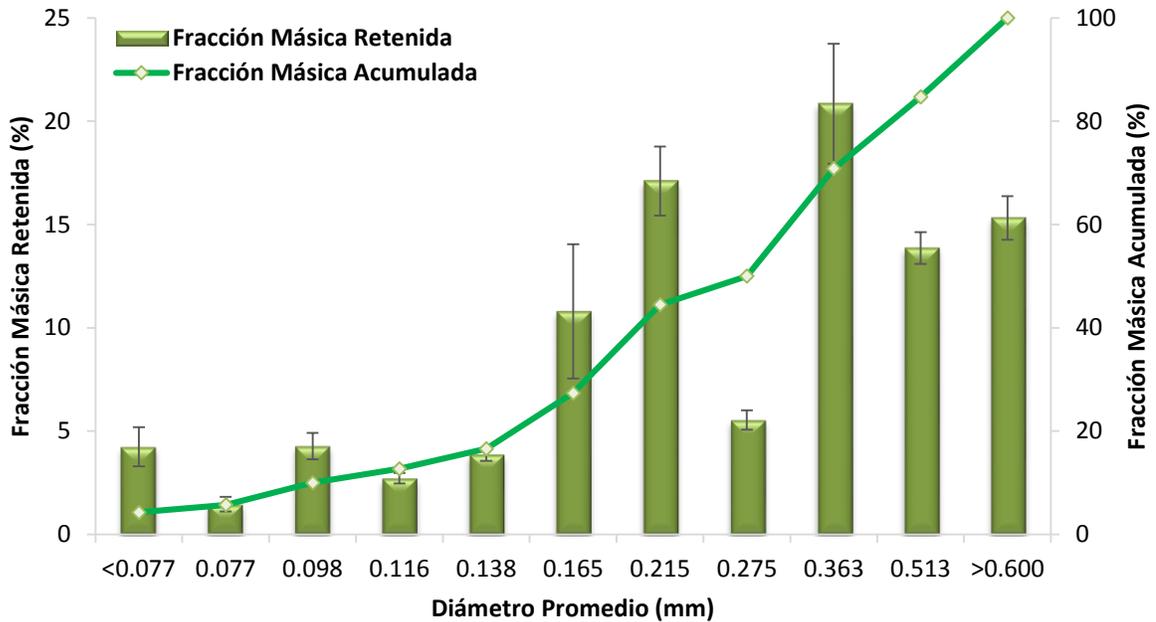


Figura 4-1: Perfil granulométrico de *P. maximum*

En la **Figura 4-2**, se observa la apariencia del *P. maximum* luego del proceso de tamizado, evidenciándose diferentes tamaños de partícula en el pasto debido a la gran heterogeneidad del producto obtenido luego de la molienda. Ray *et al*, evaluaron el efecto de dos tamaños de partícula promedio (6.35 y 2 mm) de biomasa de rastrojo de maíz sobre el rendimiento de celulosa y hemicelulosa de un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido empleando dos concentraciones de sólidos, 3.3 %p/p y 25 %p/p. Adicionalmente, se identificó el posible efecto que podrían tener estos tamaños de partícula en un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) con 20 %p/p, encontrando que no existían diferencias significativas en ninguna de las variables de respuesta evaluadas al emplear diferentes tamaños de partícula [Ray *et al*, 2013]. Sin embargo, los tamaños de partícula promedio evaluados en el estudio anterior son relativamente grandes en comparación a otros reportes. Rabelo *et al*, empleó biomasa de bagazo de caña con un tamaño de partícula promedio de 1.689 mm para estudiar el pretratamiento de hidróxido de calcio, peróxido de hidrógeno e hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos [Rabelo, 2010]. Rojas, estudió la posibilidad de producir azúcares fermentables empleando fibra prensada de palma con un tamaño de partícula promedio de 1 mm [Rojas, 2011]. Quevedo, evaluó la degradación de residuos de crisantemo con un tamaño de partícula promedio de 0.38 mm para la producción de

azúcares [Quevedo, 2011]. De lo anterior se puede concluir que aún no existe un tamaño de partícula específico para evaluar las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática sobre biomasa lignocelulósica. Adicionalmente, teniendo en cuenta que al implementar el proceso de adecuación de biomasa a gran escala, no emplear una clasificación por tamaño de la biomasa podría disminuir costos de producción. Por lo anterior, se decidió emplear la biomasa heterogénea proveniente del proceso de molienda sin realizar una exclusión por tamaño.



Figura 4-2: *Panicum maximum* molido y tamizado.

La caracterización fisicoquímica de la biomasa se realizó empleando las técnicas del *National Renewable Energy Laboratory – NREL* [Sluiter *et al*, 2008a; Sluiter *et al*, 2008b; Sluiter *et al*, 2008c]. Para determinar el contenido de celulosa y hemicelulosa a partir de glucosa y xilosa, respectivamente, se tuvo en cuenta que durante la hidrólisis ácida empleada para la caracterización de la biomasa hubo pérdida de moléculas de agua por evaporación, con lo cual se estableció un factor de relación entre los pesos moleculares de la celulosa/glucosa y hemicelulosa/xilosa:

$$Celulosa (\% p/p) = glucosa (\% p/p) * \frac{162}{180} \tag{4.1}$$

$$Hemicelulosa(\% p/p) = \sum [xilosa + arabinosa + galactosa](\% p/p) * \frac{132}{150} \tag{4.2}$$

La composición de la biomasa de *Panicum maximum* fue (%p/p, base seca): 31.6 ± 3.2 para glucosa; 21.9 ± 0.1 para xilosa; 24.9 ± 1.3 para lignina ácida insoluble; 0.5 ± 0.1 para lignina ácida soluble; 8 ± 0.4 para ceniza; 13.1 ± 0.6 para otros componentes. La relación de glucosa respecto a xilosa fue de $31.6/21.9$ (1.44). A partir de la **Ecuación (4.1)**, se obtuvo un contenido de celulosa de 28.4 ± 2.9 %p/p para la biomasa de *P. maximum*. Para las condiciones del método analítico empleado, se presentó un sobreposicionamiento de picos cromatograficos y poca resolución de arabinosa, galactosa y manosa por lo cual solo se cuantificó el contenido de xilosa, siendo la única variable empleada para determinar la concentración de hemicelulosa según la **Ecuación (4.2)**, cuyo valor fue de 19.3 ± 0.09 %p/p. La relación de celulosa respecto a hemicelulosa fue de $28.4/19.3$ (1.47).

Para determinar la reproducibilidad de la composición fisicoquímica de la biomasa se empleó el coeficiente de variación y la desviación estándar de los datos. Dentro de las propiedades evaluadas, los valores de desviación estándar junto con coeficiente de variación más elevados se presentaron en la lignina ácida soluble con 0.2 y 20%, respectivamente. Este resultado se atribuyó a la falta de sensibilidad del cálculo propuesto por el reporte técnico TP-510-42618 de la NREL [Sluiter *et al*, 2008b], en el cual, se han establecido valores de absortividad (ϵ) dependientes de la biomasa a caracterizar. Por ejemplo, entre el rastrojo de maíz (30 L/g cm) y el *pinus radiata* (12 L/g cm) la diferencia de esta constante experimental es de 2.5 veces en orden de magnitud. Al no encontrarse un valor específico de absortividad para el *P. maximum*, se empleó el valor reportado por Mateus, donde la absortividad fue igual a 110 L/g cm para la gramínea *Pennisetum sp.* [Mateus, 2011].

Cabe resaltar que la variable de lignina ácida soluble no es tan relevante para este estudio, por centrarse en la producción de azúcares (conversión de celulosa a glucosa) en condiciones de alta concentración de sólidos tanto en pretratamiento como hidrólisis enzimática. La composición de *P. maximum* se comparó con dos variedades de gramíneas: *switchgrass (Panicum virgatum)* tipo Alamo, tipo Shawnee y tipo Dacotah, y *Miscanthus x giganteus*. Ver **Figura 4-3**.

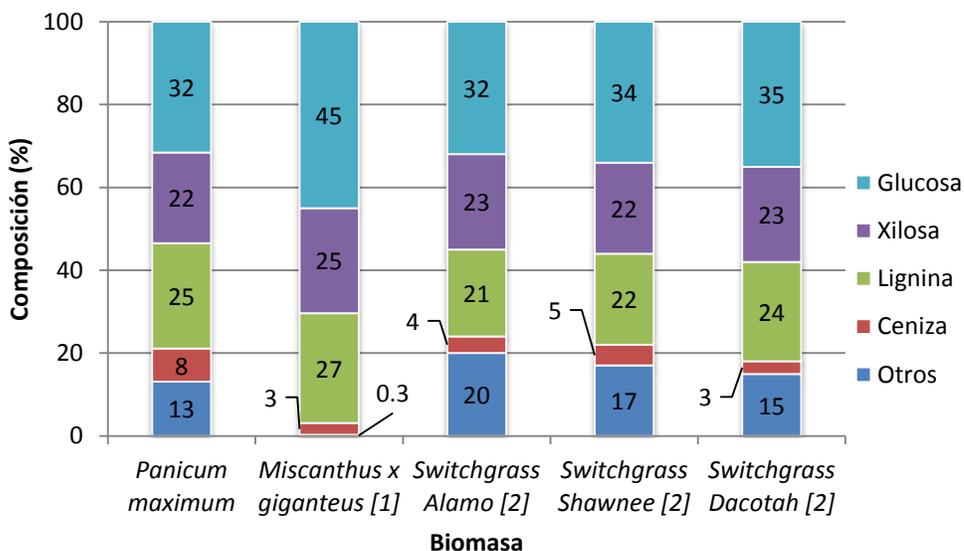


Figura 4-3: Composición de diferentes tipos de pasto reportados en la literatura.
Fuente. [1] Hage *et al*, 2010; [2] Wyman *et al*, 2011.

El contenido de celulosa de *P. maximum* fue similar al *switchgrass* variedad Alamo con 32 %p/p y menor al *switchgrass* variedad Dacotah y *Miscanthus* con 35 %p/p y 42 %p/p, respectivamente [Hage *et al*, 2010; Wyman *et al*, 2011]. No se encontraron grandes diferencias entre el contenido de hemicelulosa y lignina de los diferentes pastos. Las desviaciones promedio de contenido de hemicelulosa y lignina correspondieron a 1.26 %p/p y 2.05 %p/p. El contenido de ceniza más alto correspondió al *Panicum maximum* con un valor de 8 %p/p. Para las tres variedades de *switchgrass*, el contenido de ceniza fue menor al 5 %p/p [Wyman *et al*, 2011], mientras que para el *Miscanthus* fue menor al 3 %p/p [Hage *et al*, 2010]. En la ceniza quedan atrapados la mayor cantidad de cationes básicos presentes en la biomasa lignocelulósica [Esteghlalian *et al*, 1997]. Por ejemplo, en otros tipos de biomasa lignocelulósica como la madera blanda (*softwood*) las concentraciones de cationes básicos son: 22.4 – 28.5 %p/p, Ca²⁺; 12.4 – 9.8 %p/p, K⁺; 4.3 – 2.8 %p/p, Mg²⁺, mientras que para la madera dura (*hardwood*): 19 – 27.1 %p/p, Ca²⁺; 12.2 – 20.4 %p/p, K⁺; 2.2 – 3.6 %p/p, Mg²⁺ [Pitman, 2006]. Los cationes tienden a neutralizar una proporción del ácido sulfúrico empleado en algunos pretratamientos de biomasa para producción de etanol [Esteghlalian *et al*, 1997]. La propiedad de neutralizar una fracción del ácido, se conoce como capacidad neutralizante (CN). Para esta investigación, el contenido de ceniza del *P. maximum* no se consideró crítico, sin

embargo, se recomienda el estudio de diferentes épocas de cosecha y suplementación de minerales desde la siembra para disminuir este constituyente en la biomasa.

4.2. Pretratamiento con ácido sulfúrico diluido

La evaluación del pretratamiento con ácido diluido se realizó empleando un diseño experimental central compuesto de cara centrada con puntos estrella. Las variables evaluadas fueron: concentración de sólidos (%p/p) y concentración de ácido sulfúrico (%p/v), obteniéndose fracciones sólidas y líquidas con diferentes características. Antes de iniciar la explicación de como se realizaron cada uno de los cálculos para el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, se debe recalcar que estos se expresan en términos de glucosa y xilosa, los cuales son equivalentes más no iguales a celulosa y hemicelulosa. El calculo de los rendimientos de celulosa y hemicelulosa se encuentra en la sección **4.2.3**.

En primera medida se realizó el cálculo de la fracción másica de glucosa (X_G) con el fin de determinar cual era la cantidad disponible de glucosa en cada fracción sólida pretratada, la cual tiene un alto potencial de ser liberada en una posterior hidrólisis enzimática. Para esto, primero se determinó mediante la **Ecuación (4.3)**, la cantidad de glucosa liberada (g) en la fracción líquida del pretratamiento (G_{FL}). Durante un pretratamiento con ácido diluido se puede degradar parte de la celulosa presente en la biomasa a glucosa, por lo tanto resulta importante conocer cual fue esa perdida en esta etapa:

$$G_{FL} = C_{GFL} \times \left[\frac{M_T - M_S}{\rho_L \times 1000} \right] \quad (4.3)$$

Donde:

- G_{FL} = g de glucosa en fracción líquida del pretratamiento
- C_{GFL} = g/L de glucosa en fracción líquida del pretratamiento
- M_T = g totales de carga (biomasa más ácido diluido) en el sistema
- M_S = g de biomasa inicial en el sistema
- ρ_L = densidad del ácido diluido en g/mL

Para emplear la **Ecuación (4.3)** se debe asumir: (1) densidad y volumen constante de la solución de ácido, y (2) despreciar la pérdida de azúcares adsorbidos en la biomasa.

Conociendo la cantidad de glucosa liberada en la fracción líquida (G_{FL}), se empleó la **Ecuación (4.4)** para encontrar la cantidad de glucosa retenida en términos de biomasa seca (G_R):

$$G_R = G_B - \frac{G_{FL}}{M_S} \quad (4.4)$$

Donde: G_R = g de glucosa retenida por g de biomasa
 G_B = g de glucosa por g de biomasa
 G_{FL} = g de glucosa en fracción líquida del pretratamiento
 M_S = g de biomasa inicial en el sistema

Conociendo los gramos de glucosa retenida por gramo de biomasa (G_R), se procedió a calcular mediante la **Ecuación (4.5)** la fracción másica de la glucosa en la biomasa pretratada (X_G). Esta variable muestra la concentración indirecta de celulosa en la biomasa resultante del pretratamiento:

$$X_G = \frac{G_R \times 100}{RS} \quad (4.5)$$

Donde: X_G = g de glucosa retenida por g de biomasa pretratada
 G_R = g de glucosa retenida por g de biomasa
 RS = porcentaje (%) de recuperación de sólidos

A partir de los datos experimentales se puede calcular el porcentaje de pérdida de glucosa (P_{GP}) que ocurre en el pretratamiento. Se determinó inicialmente mediante la **Ecuación (4.6)**, la máxima concentración teórica de glucosa que se puede presentar en la fracción líquida del pretratamiento (C_{MGFL}), si la totalidad de la celulosa fuese degradada a glucosa, teniendo en cuenta la cantidad de biomasa colocada:

$$C_{MGFL} = \frac{M_S \times G_B \times \rho_L \times 1000}{M_T - M_S} \quad (4.6)$$

Donde: C_{MGFL} = máxima concentración teórica de glucosa (g/L)
 M_S = g de biomasa inicial en el sistema
 M_T = g totales de carga (biomasa más ácido diluido) en el sistema
 G_B = g de glucosa por g de biomasa
 ρ_L = densidad del ácido diluido en g/mL

Con la concentración máxima teórica de glucosa en la fracción líquida del pretratamiento (C_{MGFL}), fue posible determinar el porcentaje de pérdida de glucosa (P_{GP}), por medio de la **Ecuación (4.7)**:

$$P_{GP} = \frac{C_{GFL} \times 100}{C_{MGFL}} \quad (4.7)$$

Donde: P_{GP} = Pérdida de glucosa en la biomasa
 C_{GFL} = g/L de glucosa en fracción líquida del pretratamiento
 C_{MGFL} = máxima concentración teórica (g/L) de glucosa en la fracción líquida del pretratamiento

Para el cálculo de la fracción másica (X_x) y la pérdida de xilosa (P_{XP}), se emplearon ecuaciones análogas a la **Ecuación (4.5)** y **Ecuación (4.7)**. Los resultados se muestran en la **Tabla 4-3**.

Tabla 4-3: Resultados de los ensayos de pretratamiento de *Panicum maximum*.

Exp.	Fracción Sólida				Fracción Líquida			
	RS (%)	AR (g/L)	X_G	X_x	CG (g/L)	P_{GP} (%)	CX (g/L)	P_{XP} (%)
1	59.06	16.07	0.52	0.22	0.37	2.22	4.71	40.89
2	57.82	16.76	0.52	0.14	2.19	5.08	19.13	64.07
3	55.75	16.84	0.53	0.07	1.05	6.31	9.49	82.38
4	62.25	14.17	0.49	0.18	1.16	2.69	14.41	48.26
5	59.71	14.67	0.50	0.12	1.35	4.60	13.90	68.34
6	58.91	14.40	0.51	0.11	1.28	4.36	14.59	71.73
7	73.77	12.75	0.42	0.26	0.45	1.53	2.70	13.27
8	73.62	10.43	0.42	0.28	0.60	1.39	1.64	5.49
9	54.91	17.87	0.52	0.05	1.57	9.44	10.16	88.19
10	55.80	15.09	0.52	0.07	2.20	7.50	16.47	80.97
11	61.40	16.35	0.50	0.22	0.39	2.35	4.47	38.80
12	58.69	18.97	0.51	0.13	2.00	4.64	19.43	65.07
13	56.23	15.55	0.52	0.07	1.10	6.61	9.40	81.60
14	62.69	15.58	0.49	0.18	1.21	2.81	14.48	48.49
15	58.76	14.56	0.51	0.12	1.30	4.43	13.87	68.19
16	58.51	15.26	0.52	0.12	1.32	4.50	13.80	67.85
17	66.13	14.90	0.47	0.29	0.50	1.70	2.74	13.47
18	71.49	12.01	0.44	0.29	0.63	1.46	1.70	5.69
19	55.23	18.57	0.52	0.05	1.61	9.68	10.13	87.93
20	56.96	18.10	0.51	0.07	2.18	7.43	16.39	80.58

Para la fracción sólida, RS: recuperación de sólidos (%); AR: concentración de azúcares reductores después de la prueba de digestibilidad (g/L) por medio de una hidrólisis enzimática; X_G : fracción másica de glucosa en la biomasa pretratada; X_X : fracción másica de xilosa en la biomasa pretratada. Respecto a la fracción líquida, CG: concentración de glucosa (g/L); P_{GP} : pérdida de glucosa (%); CX: concentración de xilosa (g/L); P_{XP} : pérdida de xilosa (%).

4.2.1. Fracción sólida del pretratamiento

Al realizar un análisis cualitativo de las fracciones sólidas obtenidas de las diferentes condiciones experimentales evaluadas, se encontraron diferencias en formas de agregación y color. En la **Figura 4-4**, se observa biomasa pretratada obtenida bajo la misma condición de ácido sulfúrico diluido a diferentes concentraciones de sólidos. El proceso de hidrólisis enzimática se puede ver afectado por la presencia de partículas gruesas en la biomasa pretratada, fenómeno que se presentó cuando se empleó una concentración de sólidos elevada durante el pretratamiento.

Adicionalmente, se presentaron agregados de biomasa donde la superficie estaba pretratada mientras que el interior no, por el difícil acceso del ácido diluido (0.5 %p/v) en un sistema con concentraciones de sólidos de 12 %p/p.

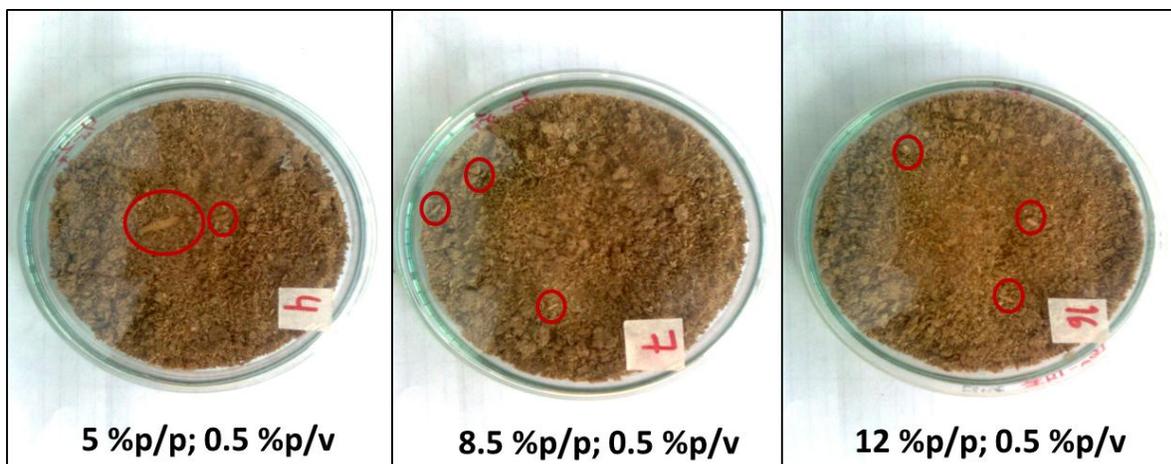


Figura 4-4: Biomasa pretratada de *Panicum maximum* a diferentes concentraciones de sólidos.

En la **Figura 4-5**, se observa biomasa pretratada obtenida a diferentes concentraciones de ácido diluido y una concentración constante de sólidos (12 %p/p). Al aumentar la concentración de ácido se disminuyó la presencia de agregados. Además, la biomasa pretratada bajo condiciones más severas presentaba un aroma más dulce, debido a la degradación de azúcares presentes en la biomasa, que para este tipo de pretratamiento, son generalmente monosacáridos derivados de la hemicelulosa [Wei, 2013].

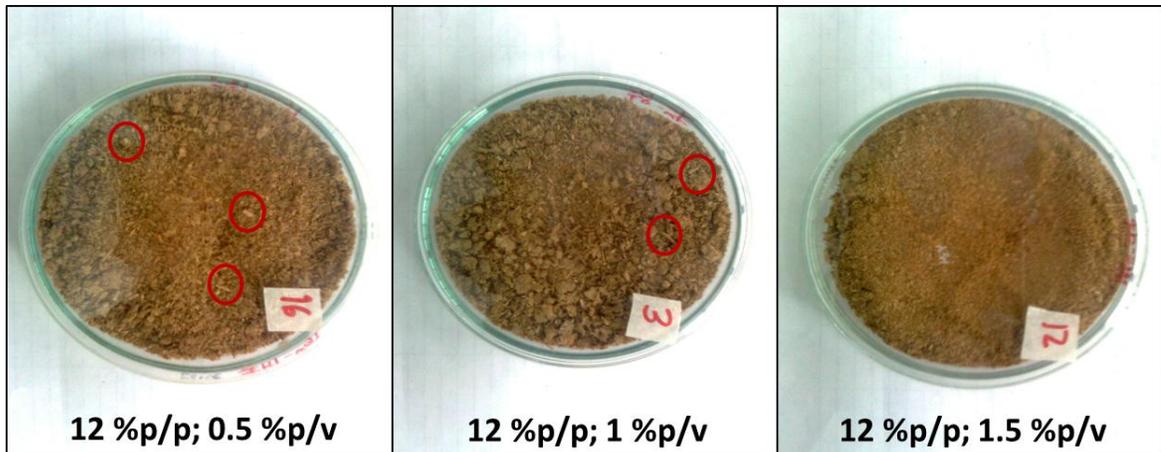


Figura 4-5: Biomasa pretratada de *Panicum maximum* a diferentes concentraciones de ácido.

Durante el pretratamiento con ácido diluido se determinaron las variables de respuesta: recuperación de sólidos (%), fracción másica de glucosa (X_G), fracción másica de xilosa (X_X), en términos de celulosa y hemicelulosa equivalente, y digestibilidad de la biomasa pretratada luego de una hidrólisis enzimática de 48 horas por medio de la concentración de azúcares reductores (g/L). En términos de fracción másica de la biomasa pretratada obtenida en las diferentes condiciones evaluadas, la fracción másica de glucosa (X_G) presentó valores de 0.43 y 0.53 g glucosa/g biomasa pretratada, más altos respecto a la biomasa sin tratar, 0.316 g glucosa/g biomasa. Estos resultados, estuvieron acorde a lo esperado debido a la pequeña cantidad de celulosa solubilizada en forma de glucosa durante el pretratamiento con ácido diluido.

Se observó un efecto menos intenso cuando la concentración de sólidos se incrementó al mantener la concentración de ácido constante. Es decir, la fracción másica de glucosa equivalente a celulosa se redujo mientras que la fracción másica de xilosa equivalente a hemicelulosa aumentó. Este efecto pudo presentarse gracias a la capacidad

neutralizante (CN) de la biomasa y su humectación. La incidencia de esta capacidad neutralizante se incrementó al aumentar la concentración de sólidos y disminuyó la degradación de hemicelulosa. Para determinar la capacidad neutralizante del *Panicum maximum*, se colocó una muestra de pasto en una solución de 0.5 %p/v de ácido sulfúrico. El pH de la solución de ácido se midió antes y después de agregar el pasto. La diferencia de pH se empleó para calcular la capacidad neutralizante mediante la **Ecuación (4.8)** [Esteghlalian *et al*, 1997]:

$$CN = MW_{AS} \times \frac{[10^{-pHa} - 10^{-pHb}]}{CS} \quad (4.8)$$

Donde: CN = Capacidad neutralizante
 MW_{AS} = Peso molecular del ácido sulfurico
 pHa = pH luego de agregar la biomasa seca
 pHb = pH antes de agregar la biomasa seca
 CS = Concentración de sólidos

Para el *Panicum maximum*, la capacidad neutralizante fue de 24.28 ± 2.4 mg H₂SO₄/g de biomasa seca. De acuerdo con lo reportado por Castro *et al*, la CN del *P. maximum* fue similar a la de *Panicum virgatum* (16.7 mg H₂SO₄/g de biomasa seca), álamo (25.8 mg H₂SO₄/g de biomasa seca) y a la paja de canola (19.7 mg H₂SO₄/g de biomasa seca), y menor al rastrojo de maíz (43.7 mg H₂SO₄/g de biomasa seca) [Castro *et al*, 2011]. La diferencia de capacidad neutralizante de las dos plantas perennes, *P. maximum* y *P. virgatum*, se podría explicar con el contenido de ceniza como se mencionó anteriormente.

4.2.1.1. Recuperación de sólidos

Uno de los objetivos al realizar un pretratamiento es mejorar la accesibilidad a la celulosa y recuperar la mayor cantidad de sólidos posible. Para la recuperación de sólidos se desarrolló el siguiente modelo cuadrático a partir de los datos obtenidos:

$$RS(\%) = 58.10 - 24.79 \cdot CA + 3.50 \cdot CS - 1.31 \cdot CA \cdot CS + 12.44 \cdot CA^2 - 0.07 \cdot CS^2 \quad (4.9)$$

Donde, CA es la concentración de ácido sulfúrico (%p/v) y CS es la concentración de sólidos (%p/p). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) se observan en la

Tabla 4-4. El valor F del modelo fue de 10.47, lo que implica que es significativo y solo existe 2.05% de probabilidad de alteración por ruido. La falta de ajuste del modelo fue no significativa, con valor F de 31.48 y un valor P de 0.1301, por lo tanto, el modelo puede usarse para predecir el comportamiento de la recuperación de sólidos en los ensayos de pretratamiento bajo las condiciones evaluadas.

Tabla 4-4: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de recuperación de sólidos.

	Suma de cuadrados	GL ^b	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P ^a
Modelo	399.71	5	79.94	10.47	0.0205
R ² = 0.9249					
R ² -Adj = 0.8403					
R ² -Pred = 0.2857					
Precisión Adec.= 9.631					
A: Conc. Sólidos	91.96	1	91.96	12.04	0.0256
B: Conc. Ácido	239.65	1	239.65	31.38	0.0050
AB	33.93	1	33.93	4.44	0.1027
A ²	9.25	1	9.25	1.21	0.3328
B ²	29.47	1	29.47	3.86	0.1210
Residual	30.54	4	7.64		
Falta de ajuste	30.22	3	10.07	31.48	0.1301
Error puro	0.32	1	0.32		
Correlación total	430.26	9			

(^aLa variable es significativa si su valor P<0.05; ^bGL: grados de libertad).

La precisión adecuada mide la señal del ruido, en modelos experimentales es deseable que su valor sea superior a 4. Para el modelo de recuperación de sólidos el valor fue de 9.631, lo cual indica que el modelo presenta una señal adecuada para reproducir los resultados experimentales. El valor del coeficiente de determinación (R²) fue de 0.9249 a 95% de confianza, garantizando el ajuste del modelo. El modelo cuadrático obtenido puede explicar el 92.49% de la variabilidad de la respuesta y el 7.51% de la variación total no se le puede atribuir a las variables estudiadas. Sin embargo, el coeficiente de determinación previsto R², 0.2857, del análisis de varianza no fue cercano al valor del coeficiente de determinación ajustado R², 0.8403, lo cual podría explicar la variabilidad de los valores previstos respecto a los experimentales, a pesar de esto, este tipo de variaciones son esperadas en modelos experimentales cuadráticos [Eslahi *et al*, 2013]. Ver **Figura 4-6**.

A continuación se muestra la interacción entre la concentración de sólidos y la concentración de ácido sobre la recuperación de sólidos. La curvatura de las líneas muestra que existe una interacción entre ambos factores experimentales que determina el comportamiento de la variable de respuesta. Ver **Figura 4-8**. Se observa una gran variación para la menor concentración de ácido, 0.5 %p/v. Además, no existen diferencias significativas en la recuperación de sólidos al emplearse una concentración de ácido de 1.5 %p/v.

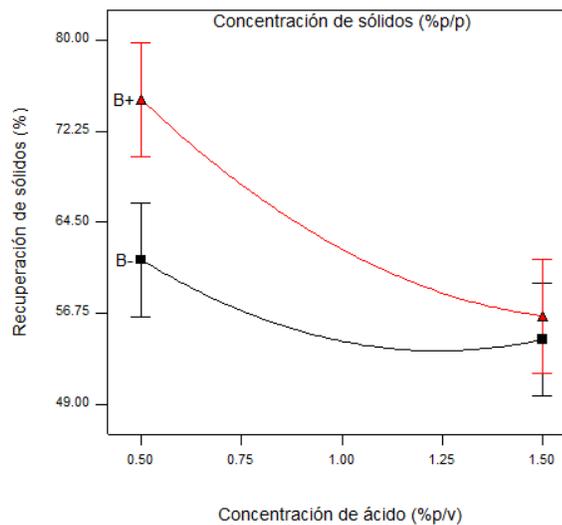
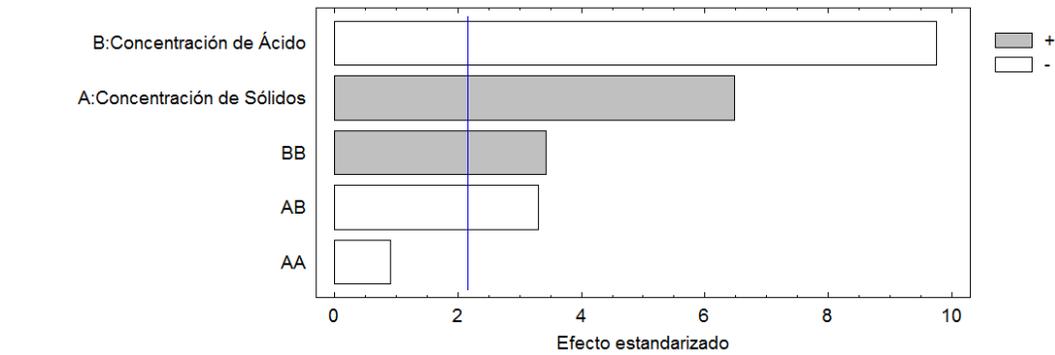


Figura 4-8: Interacción entre la concentración de sólidos y concentración de ácido sobre la recuperación de sólidos (Para la concentración de sólidos: B+, 12 %p/p; B-, 5 %p/p).

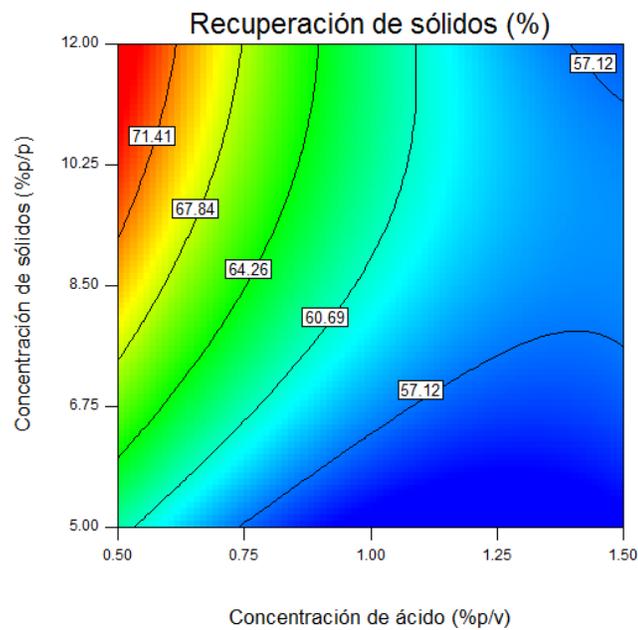
De acuerdo a la **Tabla 4-3**, la recuperación de sólidos presentó valores entre 55% y 74%, dependiendo de la condición del pretratamiento. Li *et al*, realizaron un pretratamiento sobre *switchgrass* (*Panicum virgatum*) con una concentración de sólidos de 1.2 %p/p empleando ácido sulfúrico diluido, 3 %p/p a una temperatura de 160°C por 20 minutos, logrando recuperar 59.3 % de sólidos [Li *et al*, 2010]. Por otro lado, Cheng *et al*, estudiaron dos pretratamientos alcalinos sobre paja de arroz: (1) pretratamiento con hidróxido de calcio a una temperatura de 95°C con una concentración de paja de arroz de 10 %p/p y una dosis de base de 0, 5 y 10 %p/p respecto a la biomasa, y (2) pretratamiento con hidróxido de sodio a una temperatura de 55°C con una concentración de 20 %p/p y una dosis de base de 0, 2 y 4 %p/p respecto a la biomasa. En ambos casos la recuperación de sólidos fue superior al 80% [Cheng *et al*, 2010]. Mateus, evaluó un

pretratamiento ácido de una gramínea conocida como *Pennisetum sp.*, a una concentración de ácido de 0.8, 1.2 y 2 %p/p, y unas temperaturas de 110°C hasta 190°C, manteniendo una concentración de sólidos de 15 %p/p, logrando una recuperación de sólidos de un 47.3% a un 65.5% [Mateus, 2011]. Los valores de recuperación de sólidos reportados por este trabajo coinciden con lo especificado por otros autores que han trabajado con otras gramíneas como se observó anteriormente. La diferencia de recuperación de sólidos en los diferentes pretratamientos y especialmente entre los ácidos y los básicos es su selectividad hacia un componente de la biomasa. Los pretratamientos ácidos son selectivos a la hemicelulosa, mientras que los pretratamientos básicos lo son a la lignina, al encontrarse esta última en menor proporción en la mayoría de las diferentes especies de biomasa lignocelulósica, la recuperación de sólidos cuando se realiza este tipo de pretratamientos puede ser mayor. Como se observa en la **Figura 4-9b**, ambos factores experimentales, concentración de ácido y concentración de sólidos, tuvieron influencia sobre la recuperación de sólidos. En el diagrama de Pareto estandarizado (**Figura 4-9a**) se visualiza el efecto negativo de la concentración de ácido sobre la recuperación de sólidos (valor P: 0.0050), mientras que la concentración de sólidos presentó un efecto positivo (valor P: 0.0256). Por ejemplo, cuando la concentración de ácido se incrementó de 0.5 %p/v hasta 1.5 %p/v a una concentración de sólidos constante de 8.5 %p/p, la recuperación de sólidos disminuyó 70% y 56 %, respectivamente. Esta pérdida de masa se atribuye a la degradación de diferentes componentes de la biomasa como hemicelulosa (en especial xilosa), lignina y otros extractos, dependiendo del pretratamiento seleccionado y las condiciones. Esta tendencia también fue evidenciada en los ensayos de Mateus, al incrementar la concentración de ácido de 0.8 %p/p a 2 %p/p manteniendo una temperatura y concentración de sólidos constante de 130°C y 15 %p/p, la recuperación se redujo de 61.6% a 56.2% [Ibid].

De acuerdo con los resultados experimentales, la máxima recuperación de sólidos fue de 73%, alcanzada a una concentración de ácido de 0.5 %p/v y 12 %p/p de concentración de sólidos. A pesar de ser la mejor condición para la recuperación de sólidos, la fracción másica de glucosa de la biomasa pretratada fue la más baja, 0.43 ± 0.01 , y la fracción de xilosa más alta, con 0.29 ± 0.01 , posiblemente por el poco efecto del nivel inferior de concentración de ácido evaluado sobre la hemicelulosa presente en la biomasa.



(a)



(b)

Figura 4-9: (a) Diagrama de Pareto estandarizado para la recuperación de sólidos; (b) Contorno de superficie de respuesta para la recuperación de sólidos de acuerdo al modelo.

4.2.1.2. Prueba de digestibilidad

La prueba de digestibilidad de la biomasa pretratada consistió en realizar una hidrólisis enzimática con una concentración de sólidos de 5 %p/p, manteniendo constante el tiempo de hidrólisis, pH de la solución tampón y la dosis de enzimas. Como variable de respuesta de este ensayo se empleó la concentración de azúcares reductores totales (g/L) al finalizar la hidrólisis enzimática. Con esta prueba se puede evaluar de forma directa la efectividad del pretratamiento sobre la biomasa, mejorando la accesibilidad de

las enzimas a la celulosa. El modelo cuadrático desarrollado a partir de los datos obtenidos:

$$AR(g/L) = 25.21 - 5.06 \cdot CA - 1.99 \cdot CS + 0.66 \cdot CA \cdot CS + 1.62 \cdot CA^2 + 0.06 \cdot CS^2 \quad (4.10)$$

Donde, CA es la concentración de ácido sulfúrico (%p/v) y CS es la concentración de sólidos (%p/p). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) se observan en la **Tabla 4-5**. El valor F del modelo fue de 9.81. Por otro lado, la falta de ajuste del modelo fue no significativa, con valor F de 26.83 y un valor P de 0.1408.

Tabla 4-5: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de concentración de azúcares reductores.

	Suma de cuadrados	GL ^b	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P ^a
Modelo	36.42	5	7.28	9.81	0.0230
R ² = 0.8864					
R ² -Adj = 0.8304					
R ² -Pred = 0.2411					
Precisión Adec. = 9.289					
A: Conc. Sólidos	11.02	1	11.02	14.84	0.0183
B: Conc. Ácido	18.27	1	18.27	24.61	0.0077
AB	5.13	1	5.13	6.91	0.0583
A ²	1.97	1	1.97	2.65	0.1790
B ²	1.144x10 ⁻³	1	1.144x10 ⁻³	1.541x10 ⁻³	0.9706
Residual	2.97	4	0.74		
Falta de ajuste	2.93	3	0.98	26.83	0.1408
Error puro	0.036	1	0.036		
Correlación total	39.39	9			

(^aLa variable es significativa si su valor P<0.05; ^bGL: grados de libertad).

Para el modelo de concentración de azúcares reductores el valor de la precisión adecuada fue de 9.289. El valor del coeficiente de determinación (R²) fue de 0.8864 a 95% de confianza, garantizando el ajuste del modelo. El modelo cuadrático obtenido puede explicar el 88.64% de la variabilidad de la respuesta y el 11.36% de la variación total no se le puede atribuir a las variables estudiadas. De nuevo, el coeficiente de determinación previsto R², 0.2411, del análisis de varianza no fue cercano al valor del coeficiente de terminación ajustado R², 0.8304. En la **Figura 4-10**, se observan las

variaciones de la concentración de azúcares reductores respecto a los valores previstos y experimentales.

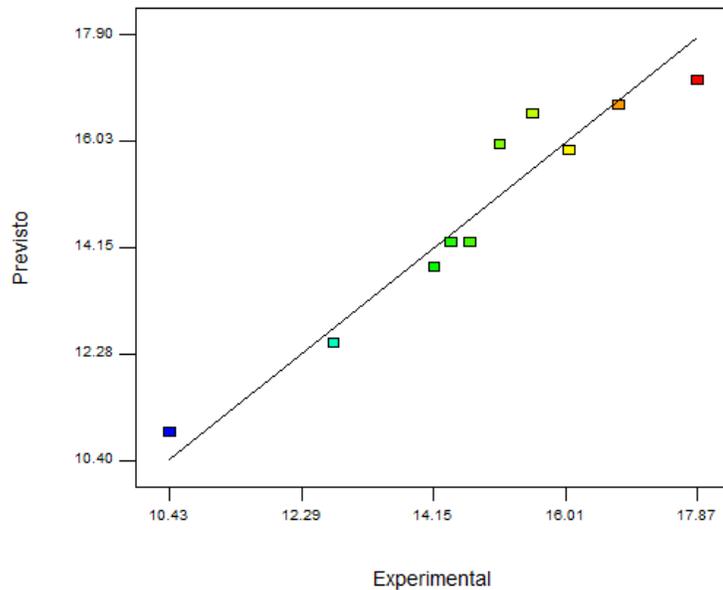


Figura 4-10: Valores previstos respecto los experimentales para la concentración de azúcares reductores.

En la **Figura 4-11**, se observan dos curvas pronunciadas para los factores experimentales evaluados: concentración de ácido (A) y concentración de sólidos (B). En una gráfica de perturbación, una curva pronunciada evidencia la sensibilidad del factor sobre la variable de respuesta. En este caso, ambos factores experimentales tienen un efecto sobre la concentración de azúcares reductores, donde la línea que representa la concentración de ácido presenta una pendiente positiva, favoreciendo el incremento en la variable de respuesta. La línea que representa la concentración de sólidos es cóncava hacia arriba, mostrando un efecto negativo.

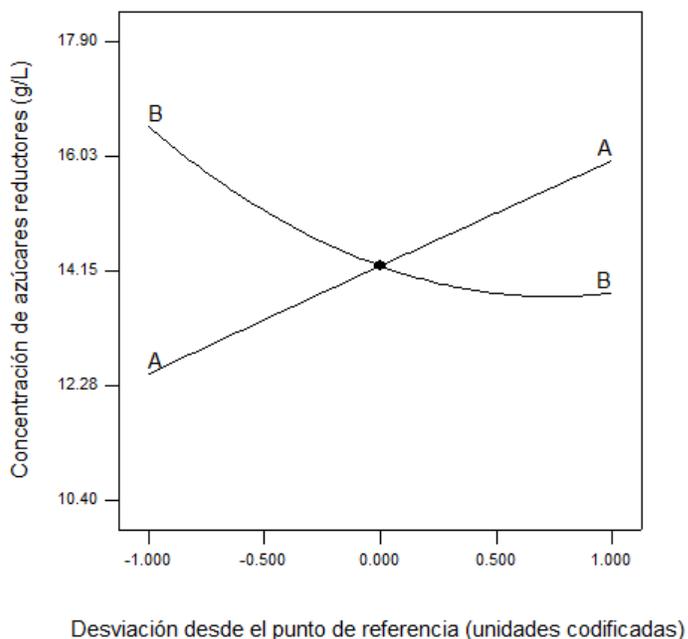


Figura 4-11: Perturbaciones de la concentración de ácido (A) y concentración de sólidos (B) sobre la concentración de azúcares reductores.

A continuación se muestra la interacción entre la concentración de sólidos y la concentración de ácido sobre la concentración de azúcares reductores totales. A pesar que ambos factores se representen por medio de una línea recta, la pendiente es diferente, por lo tanto no son paralelas y si existe una interacción sobre ellas que influye en la variable de respuesta. En la **Figura 4-12**, se observa una gran variación para la menor concentración de ácido, 0.5 %p/v. Efecto contrario al que se evidencia con la mayor concentración, 1.5 %p/v, donde no existieron diferencias significativas sobre la concentración de azúcares reductores. Schell *et al*, evaluaron la conversión de celulosa a glucosa durante una hidrólisis enzimática de biomasa de paja de maíz pretratada con ácido sulfúrico diluido a diferentes concentraciones de ácido, observando un incremento en la conversión de 60% a 87% cuando se incrementaba la concentración de ácido en el pretratamiento de 0.5 a 1.4 %p/p. Condiciones más severas en el pretratamiento aumentan la accesibilidad de las enzimas a la celulosa presente incrementando la porosidad de la biomasa y disminuyendo la cristalinidad [Schell *et al*, 2003].

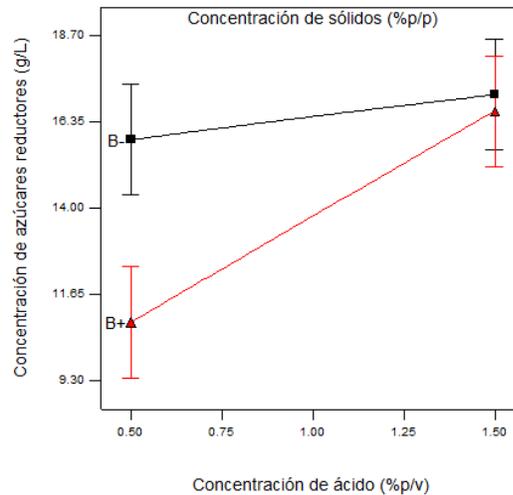
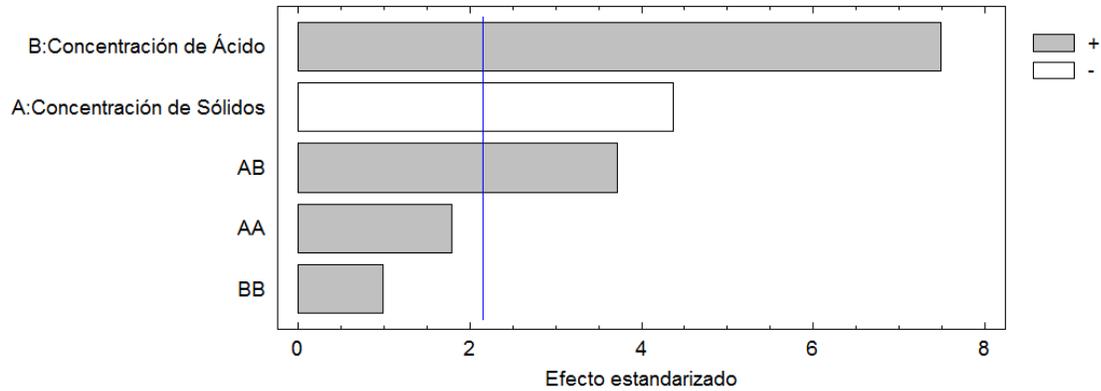


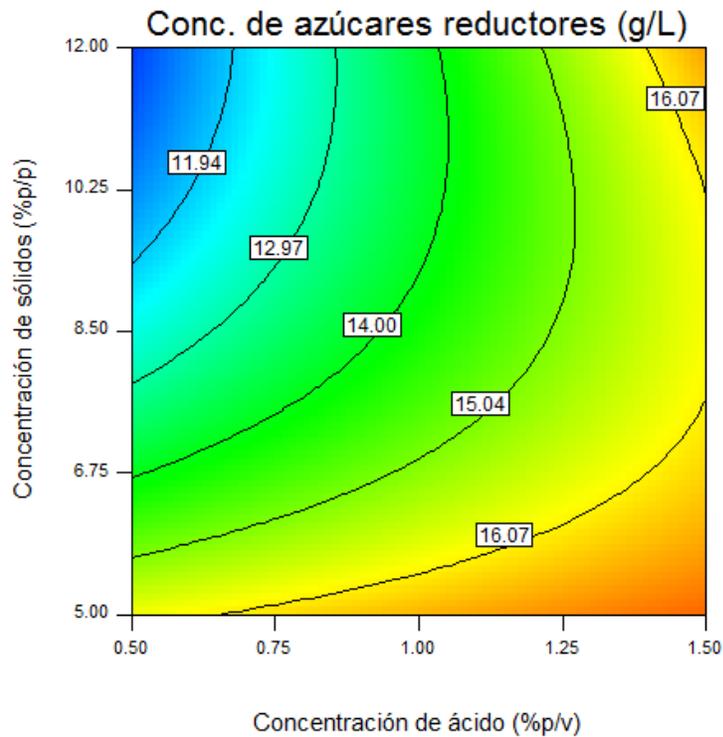
Figura 4-12: Interacción entre la concentración de sólidos y concentración de ácido sobre la concentración de azúcares reductores (Para la concentración de sólidos: B+, 12 %p/p; B-, 5 %p/p).

La mayor concentración de azúcares reductores fue de 19 g/L a una concentración de ácido de 1.5 %p/v y concentración de sólidos de 12 %p/p. De acuerdo a la **Figura 4-13a**, para la hidrólisis enzimática, los factores experimentales presentaron un efecto opuesto respecto a lo que se evidenció con la recuperación de sólidos. La concentración de ácido (valor P: 0.0077) tuvo un efecto positivo sobre la concentración de azúcares reductores, y la concentración de sólidos (valor P: 0.0183) una influencia negativa. Por ejemplo, cuando la concentración de sólidos se incrementó de 5 %p/p a 12 %p/p a una concentración de ácido constante, 0.5 %p/v, la concentración de azúcares reductores de la hidrólisis enzimática disminuyó de 16 g/L a 11 g/L. No se presentaron diferencias significativas en la concentración de azúcares reductores cuando se evaluaron las concentraciones de sólidos de 8.5 %p/p y 12 %p/p a una concentración de ácido de 1 %p/v. Ver **Figura 4-13b**.

El mismo comportamiento se observó al emplear una concentración de ácido de 1.5 %p/v bajo las concentraciones de sólidos antes mencionadas. Esta respuesta pudo haberse presentado a causa de un fenómeno de inhibición por sustrato (celobiosa) de las β -glucosidasas presentes durante la hidrólisis enzimática.



(a)



(b)

Figura 4-13: (a) Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de azúcares reductores; (b) Contorno de superficie de respuesta para la concentración de azúcares reductores de acuerdo al modelo.

De acuerdo a la **Ecuación (4.8)** y **Ecuación (4.9)**, que describen el comportamiento de la recuperación de sólidos (%) y concentración de azúcares reductores (g/L) para la fracción sólida obtenida de los ensayos de pretratamiento, se evaluaron tres condiciones experimentales para comprobar la capacidad de predicción de los modelos

experimentales. A continuación se muestran las condiciones evaluadas junto con los resultados obtenidos:

Tabla 4-6: Ensayos para comprobar los modelos desarrollados para la recuperación de sólidos y concentración de azúcares reductores.

Exp.	CA (%p/v)	CS (%p/p)	RSE (%)	RSM (%)	ARE (g/L)	ARM (g/L)
CM1	1.2	7	54.74	56.48	13.35	16.01
CM2	1	11	61.57	61.71	14.22	14.34
CM3	0.5	12	74.37	73.25	13.54	11.73

RSE, recuperación de sólidos experimental; RSM, recuperación de sólidos según el modelo (4.1); ARE, concentración de azúcares reductores experimental; ARM, concentración de azúcares reductores según el modelo (4.2).

La desviación promedio entre la recuperación de sólidos obtenida de los ensayos CM1, CM2 y CM3, y la prevista por el modelo, fue de 0.5 %. Mientras que la desviación promedio entre la concentración de azúcares reductores obtenida de los ensayos y la prevista por el modelo, fue de 0.77 g/L. Estos valores son aceptables para los modelos desarrollados a partir de los datos experimentales.

4.2.2. Balance de Materia

Con el fin de estimar los rendimientos de celulosa y hemicelulosa en el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido respecto a la biomasa pretratada, se realizó un balance de materia empleando las concentraciones de glucosa y xilosa determinadas en la fracción líquida residual del pretratamiento. A estos rendimientos calculados a partir de datos experimentales se les aplicó un tratamiento estadístico ANOVA de forma similar a las dos variables de respuesta analizadas previamente: recuperación de sólidos y digestibilidad, para determinar la influencia de las variables experimentales sobre ellos. Para el cálculo del rendimiento de celulosa y hemicelulosa en el pretratamiento con ácido diluido se empleó la **Ecuación (4.10)** y **Ecuación (4.11)**:

$$Y_{P_{cel}} = \frac{g \text{ de celulosa luego del pretratamiento}}{g \text{ de celulosa en la biomasa sin pretratar}}$$

(4.11)

$$Y_{PHem} = \frac{g \text{ de hemicelulosa luego del pretratamiento}}{g \text{ de hemicelulosa en la biomasa sin pretratar}} \quad (4.12)$$

En la **Tabla 4-7**, se encuentran consignados los rendimientos de celulosa y hemicelulosa junto con la cantidad recuperada respecto a una base de 1 g de biomasa pretratada.

Tabla 4-7: Rendimiento de celulosa y hemicelulosa bajo diferentes condiciones de pretratamiento.

Exp.	Biomasa*		Biomasa recuperada		Rendimiento	
	Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Celulosa (g)	Hemicelulosa (g)	Celulosa	Hemicelulosa
1	0.284	0.193	0.278	0.114	0.978	0.591
2	0.284	0.193	0.270	0.069	0.949	0.359
3	0.284	0.193	0.266	0.034	0.937	0.177
4	0.284	0.193	0.277	0.100	0.973	0.517
5	0.284	0.193	0.271	0.061	0.954	0.317
6	0.284	0.193	0.272	0.055	0.956	0.283
7	0.284	0.193	0.280	0.167	0.985	0.867
8	0.284	0.193	0.280	0.182	0.986	0.945
9	0.284	0.193	0.258	0.023	0.906	0.119
10	0.284	0.193	0.263	0.037	0.925	0.190
11	0.284	0.193	0.278	0.118	0.977	0.612
12	0.284	0.193	0.271	0.067	0.954	0.349
13	0.284	0.193	0.266	0.036	0.934	0.184
14	0.284	0.193	0.276	0.099	0.972	0.515
15	0.284	0.193	0.272	0.061	0.956	0.318
16	0.284	0.193	0.272	0.062	0.955	0.322
17	0.284	0.193	0.280	0.167	0.983	0.865
18	0.284	0.193	0.280	0.182	0.985	0.943
19	0.284	0.193	0.257	0.023	0.903	0.121
20	0.284	0.193	0.263	0.037	0.926	0.194

*Los valores se determinaron en base a un gramo de biomasa empleando el análisis de composición de la sección 4.1.

4.2.2.1. Rendimiento de celulosa

Cuando se lleva a cabo un pretratamiento, uno de los objetivos principales consiste en no degradar la celulosa presente en la biomasa, por ser esta el sustrato de la hidrólisis enzimática para una posterior degradación a glucosa. Al establecer el rendimiento de celulosa del pretratamiento, se tiene conocimiento de la proporción de celulosa que no fue degradada y se encuentra disponible en la biomasa pretratada.

Para el rendimiento de celulosa se desarrolló el siguiente modelo cuadrático a partir de los datos obtenidos:

$$Y_{Cel} = 1.018 - 0.104 \cdot CA - 0.0005 \cdot CS + 0.005 \cdot CA \cdot CS + 0.0008 \cdot CA^2 - 0.00004 \cdot CS^2 \quad (4.13)$$

Donde, CA es la concentración de ácido sulfúrico (%p/v) y CS es la concentración de sólidos (%p/p). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) se observan en la **Tabla 4-8**. El valor F del modelo fue de 34.30. La falta de ajuste del modelo fue no significativa, con un valor F de 0.49 y un valor P de 0.75. Para el modelo de rendimiento de celulosa, la precisión adecuada fue de 18.19, indicando la reproducibilidad de los resultados experimentales a partir del modelo estadístico. El valor del coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.9917 a 95% de confianza, por lo cual, el modelo estadístico puede explicar el 99.17% de la variabilidad de la respuesta y el 0.83% de la variación no se le puede atribuir a las variables estudiadas.

Tabla 4-8: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de rendimiento de celulosa.

	Suma de cuadrados	GL ^b	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P ^a
Modelo	6.44x10 ⁻³	5	1.29x10 ⁻³	34.30	0.0022
$R^2 = 0.9917$					
$R^2\text{-Adj} = 0.9887$					
$R^2\text{-Pred} = 0.8395$					
Precisión Adec. = 18.19					
A: Conc. Sólidos	1.35x10 ⁻³	1	1.35x10 ⁻³	35.95	0.0039
B: Conc. Ácido	4.76x10 ⁻³	1	4.76x10 ⁻³	126.75	0.0004
AB	3.06x10 ⁻⁴	1	3.06x10 ⁻⁴	8.15	0.0461
A ²	1.72x10 ⁻⁴	1	1.72x10 ⁻⁴	0.46	0.5358
B ²	3.44x10 ⁻⁶	1	3.44x10 ⁻⁶	0.092	0.7772
Residual	1.50x10 ⁻⁴	4	3.76x10 ⁻⁵		
Falta de ajuste	8.97x10 ⁻⁵	3	2.99x10 ⁻⁵	0.49	0.7499
Error puro	6.05x10 ⁻⁵	1	6.05x10 ⁻⁵		
Correlación total	6.59x10 ⁻³	9			

(^aLa variable es significativa si su valor P<0.05; ^bGL: grados de libertad).

En la **Figura 4-14**, se observan las variaciones del rendimiento de celulosa respecto a los valores previstos y experimentales.

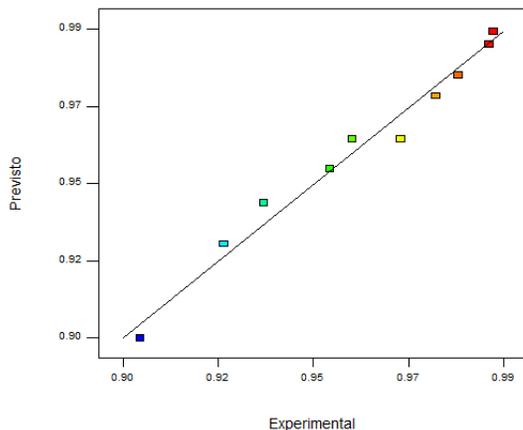


Figura 4-14: Valores previstos respecto los experimentales para el rendimiento de celulosa.

En la **Figura 4-15**, se observan dos curvas pronunciadas para los factores experimentales evaluados: concentración de ácido (A) y concentración de sólidos (B); ambos factores experimentales tuvieron influencia sobre el rendimiento de celulosa, donde la línea que representa la concentración de ácido presenta una pendiente negativa, por lo tanto, al aumentar su valor, el rendimiento de celulosa del pretratamiento disminuye. La línea que representa la concentración de sólidos presenta una pendiente positiva, favoreciendo el incremento del rendimiento de celulosa a un valor constante de concentración de ácido.

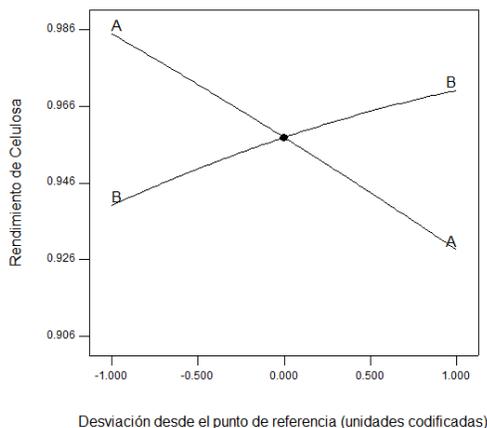


Figura 4-15: Perturbaciones de la concentración de ácido (A) y concentración de sólidos (B) sobre el rendimiento de celulosa en el pretratamiento.

En la **Figura 4-16**, se observa la gráfica de interacción entre la concentración de sólidos y la concentración de ácido sobre el rendimiento de celulosa. Ambos factores se representaron por medio de una línea recta con pendiente diferente, por lo tanto no son paralelas, justificando la existencia de una interacción sobre ellas que afecta directamente el rendimiento. En la menor concentración de ácido, 0.5 %p/v, no existieron diferencias significativas sobre el rendimiento de celulosa, mientras que en la mayor concentración, 1.5 %p/v, se evidencia una gran variación sobre el rendimiento.

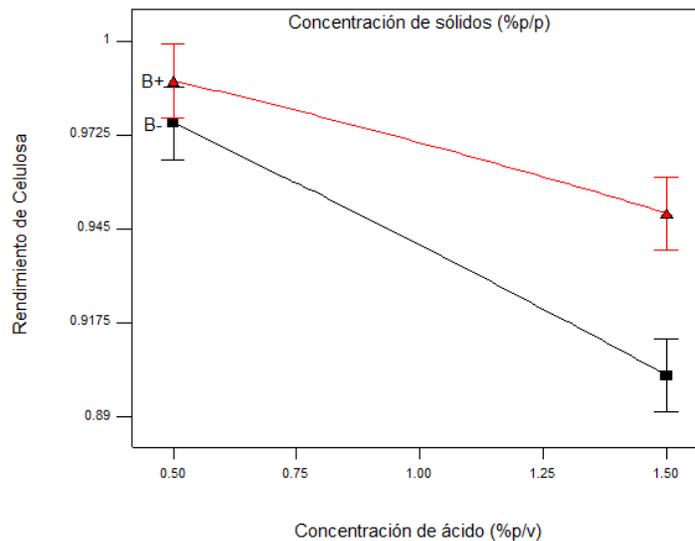


Figura 4-16: Interacción entre concentración de sólidos y concentración de ácido sobre el rendimiento de celulosa (Para la concentración de sólidos: B+, 12 %p/p; B-, 5 %p/p).

En la **Figura 4-17a**, se observa que la concentración de ácido (valor P: 0.0004) tuvo un efecto negativo sobre el rendimiento de celulosa, mientras que la concentración de sólidos (valor P: 0.0039) tuvo una influencia positiva. Por ejemplo, cuando la concentración de ácido se incrementó de 0.5 %p/v a 1.5 %p/v a una concentración de sólidos constante, 5 %p/p, el rendimiento de celulosa disminuyó de 0.978 a 0.906. El efecto presentado por las variables experimentales sobre el rendimiento de celulosa, fue similar al evidenciado en la recuperación de sólidos, lo cual garantiza que la biomasa pretratada bajo una concentración de sólidos alta y una concentración de ácido baja, tendrá una mayor proporción de celulosa. Por otro lado, en la **Figura 4-17b**, se evidencia como el rendimiento no es afectado significativamente a una concentración de ácido de 0.5 %p/v cuando se realizaron cambios en la concentración de sólidos, caso contrario al incrementar la concentración de ácido.

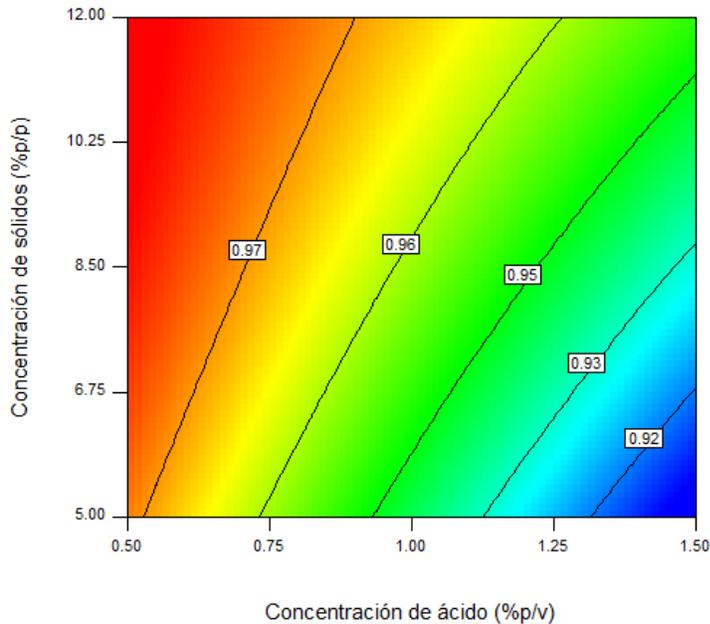
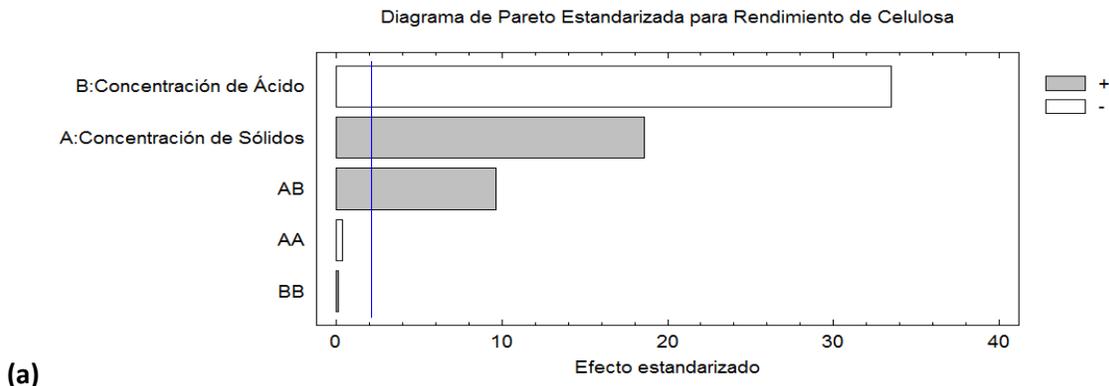


Figura 4-17: (a) Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de celulosa; (b) Contorno de superficie de respuesta para el rendimiento de celulosa.

Zhu *et al*, realizaron un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido evaluando diferentes concentraciones de ácido, 0.2, 0.5 y 1 %p/p, en un intervalo de temperaturas de 160°C a 180°C sobre biomasa de paja de maíz, obteniendo un rendimiento de celulosa promedio en todos sus ensayos mayor al 88% [Zhu *et al*, 2005]. Para este trabajo el menor

rendimiento fue de 90.3% para celulosa, siendo la peor condición, aún superior a lo reportado por Zhu *et al* (2005).

4.2.2.2. Rendimiento de hemicelulosa

La principal característica del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido es su selectividad hacia la degradación de la hemicelulosa presente en la biomasa, facilitando la accesibilidad de las enzimas a la celulosa en una hidrólisis enzimática. Con el fin de lograr determinar la efectividad de esa degradación durante los ensayos del pretratamiento, se establece el rendimiento de hemicelulosa en la fracción sólida de biomasa pretratada. Con los datos experimentales de rendimiento de hemicelulosa se desarrolló el siguiente modelo cuadrático:

$$Y_{Hem} = 1.157 - 0.192 \cdot CA - 0.06 \cdot CS - 0.016 \cdot CA \cdot CS + 0.733 \cdot CA^2 - 0.0002 \cdot CS^2 \quad (4.14)$$

Donde, CA es la concentración de ácido sulfúrico (%p/v) y CS es la concentración de sólidos (%p/p). El análisis de varianza (ANOVA) se observa en la **Tabla 4-9**.

Tabla 4-9: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de rendimiento de hemicelulosa.

	Suma de cuadrados	GL ^b	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P ^a
Modelo	0.73	5	0.15	50.61	0.0010
R ² = 0.9866					
R ² -Adj = 0.9818					
R ² -Pred = 0.8535					
Precisión Adec. = 21.3					
A: Conc. Sólidos	0.14	1	0.14	49.52	0.0021
B: Conc. Ácido	0.50	1	0.50	173.47	0.0002
AB	3.24x10 ⁻³	1	3.24x10 ⁻³	1.12	0.3489
A ²	1.26x10 ⁻⁴	1	1.26x10 ⁻⁴	0.044	0.8447
B ²	0.080	1	0.080	27.72	0.0062
Residual	0.012	4	2.89x10 ⁻³		
Falta de ajuste	0.011	3	3.66x10 ⁻³	6.34	0.2822
Error puro	5.78x10 ⁻⁴	1	5.78x10 ⁻⁴		
Correlación total	0.74	9			

(^aLa variable es significativa si su valor P<0.05; ^bGL: grados de libertad).

El valor F del modelo fue de 50.61. Con un valor F de 6.34 y valor P de 0.2822, la falta de ajuste fue no significativa. La precisión adecuada fue de 21.3. El coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.9866 a 95% de confianza, por esto, el modelo estadístico obtenido de los datos experimentales tiene la capacidad de explicar el 98.66% de la respuesta y el 1.34% de la variación no se puede atribuir a las variables estudiadas en los ensayos. A continuación se observan las variaciones de los valores previstos y experimentales para la variable de respuesta, rendimiento de hemicelulosa. Ver **Figura 4-18**.

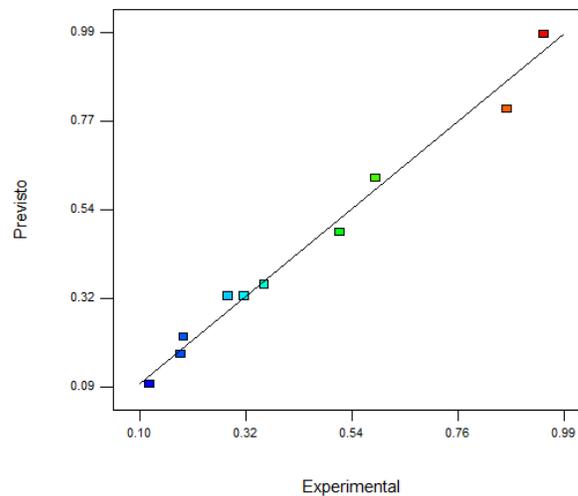


Figura 4-18: Valores previstos respecto los experimentales para el rendimiento de hemicelulosa.

De acuerdo con las perturbaciones, **Figura 4-19**, los factores evaluados, concentración de ácido (A) y concentración de sólidos (B), presentaron un efecto sobre el rendimiento de hemicelulosa. La concentración de ácido se represento con una línea de tendencia cóncava hacia abajo, por lo tanto, al incrementar la concentración de ácido en los ensayos, el rendimiento de hemicelulosa disminuye. Por otro lado, la línea que representa la concentración de sólidos presenta una pendiente positiva, observándose un incremento en el rendimiento de hemicelulosa al emplear concentraciones de sólidos elevadas.

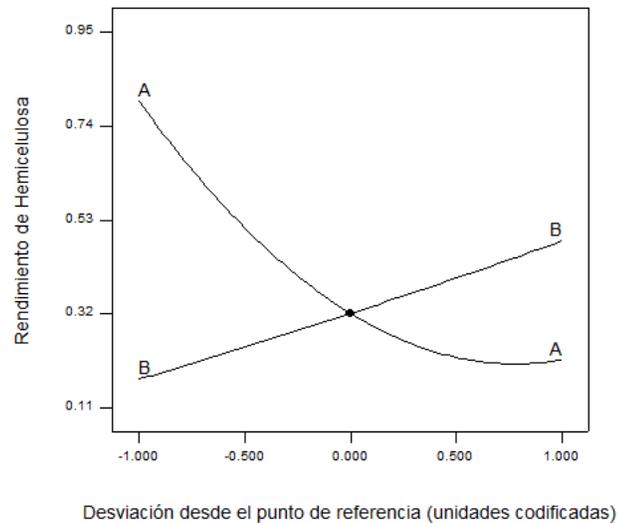


Figura 4-19: Perturbaciones de la concentración de ácido (A) y concentración de sólidos (B) sobre el rendimiento de hemicelulosa.

La **Figura 4-20**, presenta la interacción entre la concentración de sólidos y la concentración de ácido en el rendimiento de hemicelulosa. Ambos factores se representaron como líneas no paralelas, evidenciando una interacción que afecta el rendimiento de hemicelulosa. Hubo diferencias significativas en cada una de las concentraciones de sólidos a una concentración de ácido constante (límite superior o inferior), demostrando la sensibilidad de la respuesta a los factores estudiados. Zhu *et al*, evaluaron diferentes concentraciones de ácido (0.2, 0.5 y 1 %p/p) y temperaturas (160, 170 y 180°C) en un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido sobre paja de maíz. El menor rendimiento de hemicelulosa se presentó en las condiciones más extremas de sus ensayos, 1 %p/p concentración de ácido y 180 °C con un valor de 5.6%. Sin embargo, se presentaron grandes variaciones en el rendimiento de hemicelulosa (40% a 26%) cuando se maneja el nivel inferior de la concentración de ácido, 0.2 %p/p. Comportamiento similar a lo presentado en este trabajo pero con una combinación de variables experimentales de pretratamiento diferentes [Zhu *et al*, 2005].

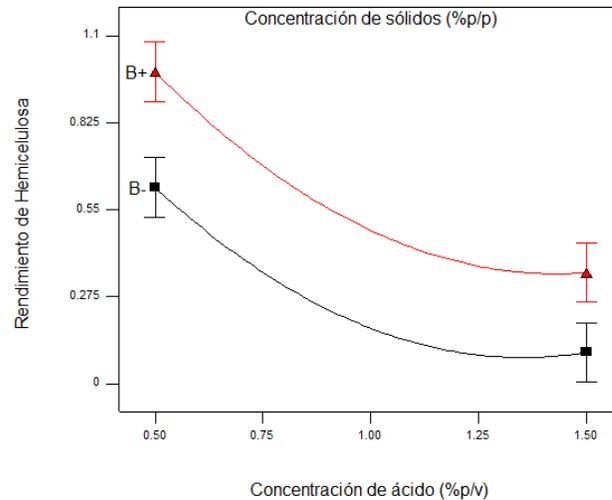


Figura 4-20: Interacción entre concentración de sólidos y concentración de ácido sobre rendimiento de hemicelulosa (Para la concentración de sólidos: B+, 12 %p/p; B-, 5 %p/p).

El diagrama de Pareto, **Figura 4-21a**, muestra de nuevo un efecto negativo de la concentración de ácido (valor P: 0.0002) sobre el rendimiento de hemicelulosa en la biomasa pretratada. Como en un pretratamiento con ácido diluido se busca degradar la hemicelulosa presente en la biomasa lignocelulósica, para las condiciones evaluadas, altas concentraciones de ácido favorecieron el fenómeno. Esto coincide con lo reportado por Mateus, donde al comparar diferentes concentraciones de ácido (0.8, 1.2 y 2 %p/p) a una temperatura de 130°C y concentración de sólidos de *Pennisetum sp.*, de 15 %p/p, el rendimiento de hemicelulosa se incrementó de 27.15% a 66.7% [Mateus, 2011]. Por otro lado, la concentración de sólidos (valor P: 0.0021), tuvo una influencia positiva sobre el rendimiento de hemicelulosa, a mayor concentración de sólidos, mayor rendimiento de hemicelulosa. Para el presente proyecto, un alto rendimiento de hemicelulosa en el pretratamiento no es deseado, por la inexistencia de hemicelulasas durante la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada. En consecuencia, para disminuir el rendimiento de hemicelulosa del pretratamiento se debe manejar una alta concentración de ácido junto con una baja concentración de sólidos. Sin embargo, en la **Figura 4-21b**, se observa para el límite superior de la concentración de ácido, 1.5 %p/v y los límites establecidos para concentración de sólidos, 5 %p/p y 12 %p/p, rendimientos de hemicelulosa de 0.120 a 0.354, respectivamente. Al mantener la concentración de ácido en el límite superior evaluado en los ensayos, se garantiza un rendimiento de hemicelulosa bajo (<0.38), y por consiguiente, una buena degradación de la misma. Una medición indirecta de la

degradación de hemicelulosa, es la recuperación de sólidos. Teniendo en cuenta la selectividad del pretratamiento con ácido diluido hacia la hemicelulosa, la poca recuperación de sólidos en algunas condiciones evaluadas se podría justificar con una alta degradación de hemicelulosa. En los ensayos realizados, uno de los menores valores para la recuperación de sólidos, 58%, se presentó al emplear el límite superior de ambas variables de estudio. Al degradarse la mayor cantidad de hemicelulosa presente en la biomasa, también se incrementa la accesibilidad de las enzimas a la celulosa. Esta tendencia se observó en los resultados del ensayo de digestibilidad de la biomasa pretratada, donde las condiciones de 1.5 %p/v concentración de ácido y 12 %p/p concentración de sólidos, presentaron la concentración más alta de azúcares reductores con 19 g/L.

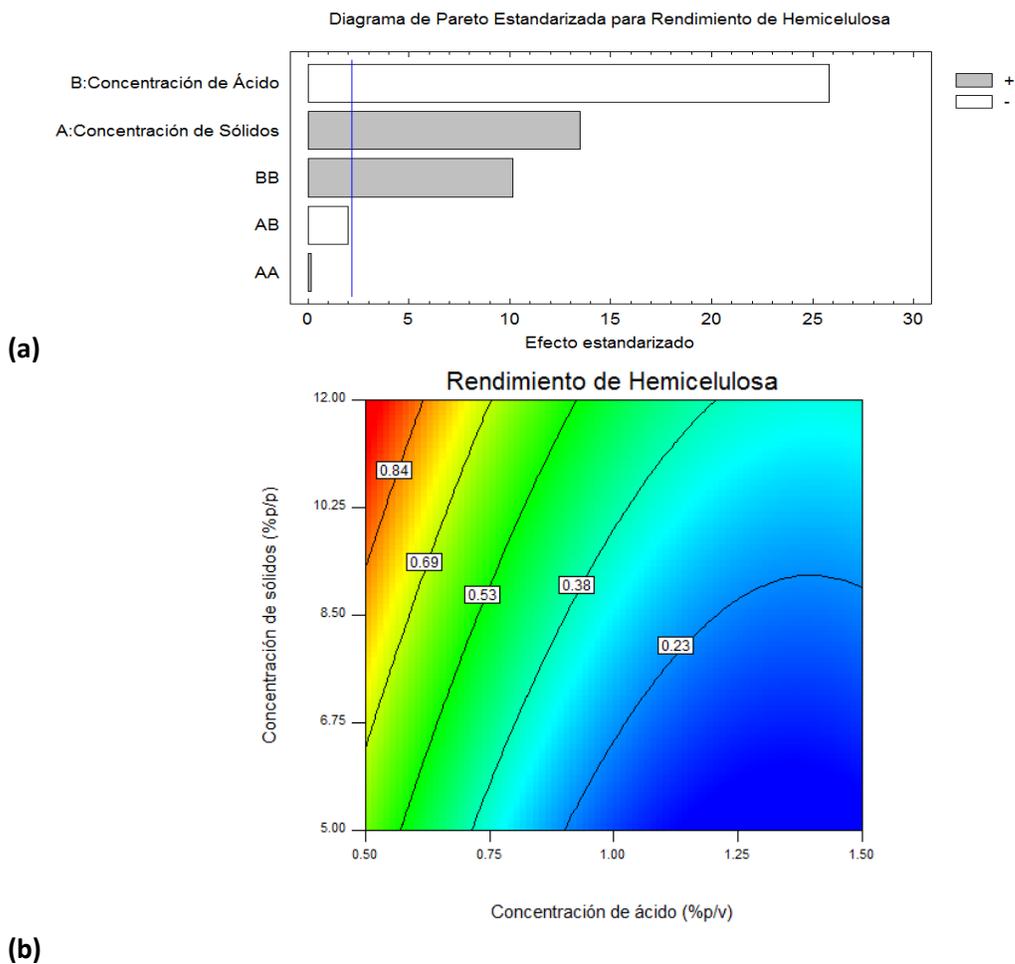


Figura 4-21: (a) Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de hemicelulosa; (b) Contorno de superficie de respuesta para el rendimiento de hemicelulosa.

De la etapa de pretratamiento con ácido sulfúrico diluido se logran extraer varias conclusiones: a una concentración de sólidos de 12 %p/p, se puede garantizar una recuperación de sólidos cercana al 74% y un rendimiento de celulosa en la biomasa pretratada con valores cercanos a 0.986. Por otro lado, el límite superior evaluado para la concentración de ácido, 1.5 %p/v, favoreció la degradación de hemicelulosa presente en la biomasa al obtenerse rendimientos de 0.359. Esta degradación favoreció la accesibilidad de las enzimas a la celulosa, al obtenerse concentraciones de azúcares reductores en los ensayos de digestibilidad de la biomasa pretratada valores del orden de 19 g/L. Para los experimentos subsecuentes, la biomasa de *Panicum maximum* se trató a una temperatura de 130 °C durante 60 minutos, con una concentración de ácido diluido de 1.5 %p/v y una concentración de sólidos de 12 %p/p.

4.3. Hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos

La evaluación de la hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos se dividió en dos etapas. La primera consistió en determinar la dosis mínima del complejo de celulasas (NS22086) y β -glucosidasas (NS22118) en una hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada empleando las condiciones determinadas en la sección 4.2. Esta dosis de enzima fue definida en función a un gramo de biomasa pretratada. Previo al ensayo de dosis mínima se caracterizó la actividad enzimática de las enzimas, la cual coincidió con lo reportado en la ficha técnica [Zhang *et al*, 2009]. En la segunda etapa, se realizaron los ensayos de una hidrólisis enzimática tipo lote alimentado, suministrando enzima y pasto pretratado con el fin de obtener una alta concentración de azúcares reductores. En estos ensayos se evaluó la concentración de azúcares reductores, rendimiento y la eficiencia.

4.3.1. Dosis de enzimas

La hidrólisis enzimática corresponde a una de las etapas más costosas en la producción de etanol de segunda generación. Este costo está ligado a la cantidad de enzimas empleadas para la degradación de celulosa a glucosa. Por lo tanto, antes de realizar los ensayos de hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos se determinó la dosis mínima de enzimas (complejo de celulasas y β -glucosidasas) que garantizarán el mayor rendimiento posible. Para esto, se evaluaron diferentes dosis de enzimas mediante un diseño experimental central compuesto de cara centrada con puntos estrella.

Para determinar cual fue la mejor dosis de enzima, se determinó el rendimiento de conversión de celulosa a glucosa ($Y_{H_{Cel}}$) en cada uno de los ensayos de hidrólisis enzimática. De esta manera se tendría certeza de cual dosis es la adecuada para degradar más celulosa presente en la biomasa pretratada de *Panicum maximum* bajo las condiciones de pretratamiento seleccionadas en las secciones anteriores. El cálculo del rendimiento de conversión se realizó mediante la ecuación:

$$Y_{H_{Cel}} = \frac{g \text{ de celulosa pretratada hidrolizada}}{g \text{ de celulosa en la biomasa pretratada}} \quad (4.13)$$

A continuación se encuentran los resultados de los ensayos realizados:

Tabla 4-10: Concentración de azúcares reductores a las 24 y 48 horas (g/L) junto con el rendimiento de celulosa de los ensayos de dosificación de enzimas durante la hidrólisis enzimática con una concentración de 5 %p/p de *P. maximum* pretratado.

Exp.*	AR – 24 h (g/L)	AR – 48 h (g/L)	Y_{Cel}
1	20.1 ± 1.0	22.0 ± 1.1	0.80
2	17.9 ± 0.9	20.0 ± 1.0	0.73
3	16.1 ± 0.8	18.8 ± 0.9	0.69
4	7.2 ± 0.4	8.0 ± 0.3	0.29
5	15.4 ± 0.8	16.6 ± 0.6	0.61
6	15.7 ± 0.7	16.7 ± 0.8	0.61
7	6.8 ± 0.2	7.2 ± 0.4	0.26
8	20.3 ± 1.2	21.7 ± 0.9	0.79
9	15.2 ± 0.6	16.4 ± 0.9	0.60
10	5.4 ± 0.1	6.0 ± 0.5	0.22
11	15.6 ± 0.8	17.9 ± 1.0	0.65

*La dosis de enzima para cada experimento se puede observar en la Tabla 3-3.

Para el rendimiento de celulosa se desarrolló el siguiente modelo cuadrático a partir de los datos obtenidos:

$$Y_{Cel} = 0.20 - 0.0162 \cdot CC + 0.0834 \cdot B - 0.0001 \cdot CC^2 - 0.0322 \cdot B^2 \quad (4.14)$$

Donde, CC es la concentración del complejo de celulasas (BHU/g) y B es la concentración de β -glucosidasas (CBU/g). No existió una interacción estadística entre las variables evaluadas.

Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) se observan en la **Tabla 4-11**. El valor F del modelo fue de 72.21, lo que implica que es significativo y solo existe 0.01 % de probabilidad de alteración por ruido. La falta de ajuste del modelo fue no significativa, con valor F de 0.34 y un valor P de 0.8047. Para el modelo del rendimiento de celulosa, el valor de precisión adecuada fue de 21.859. El valor del coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.9863 a 95% de confianza, garantizando el ajuste del modelo. El modelo cuadrático obtenido puede explicar el 98.63% de la variabilidad de la respuesta y el 1.37% de la variación total no se le puede atribuir a las variables estudiadas. El coeficiente de determinación previsto, R^2 , 0.9727, del análisis de varianza se encontró en concordancia coeficiente de terminación ajustado R^2 , 0.9371.

Tabla 4-11: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de concentración de azúcares reductores.

	Suma de cuadrados	GL ^b	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P ^a
Modelo	0.44	5	0.089	72.21	0.0001
$R^2 = 0.9863$					
$R^2\text{-Adj} = 0.9727$					
$R^2\text{-Pred} = 0.9371$					
Precisión Adec. = 21.859					
A: β -glucosidasas	3.26×10^{-3}	1	3.26×10^{-3}	2.66	0.1635
B: Complejo celulasas	0.40	1	0.40	326.61	< 0.0001
AB	0.000	1	0.000	0.000	1.000
A ²	1.61×10^{-3}	1	1.61×10^{-3}	1.32	0.3028
B ²	0.031	1	0.031	25.12	0.0041
Residual	6.13×10^{-3}	5	1.22×10^{-3}		
Falta de ajuste	2.06×10^{-3}	3	6.87×10^{-4}	0.34	0.8047
Error puro	4.06×10^{-3}	2	2.03×10^{-3}		
Correlación total	0.45	10			

En la **Figura 4-22**, se observa la poca variabilidad del rendimiento de celulosa respecto a los valores previstos y experimentales.

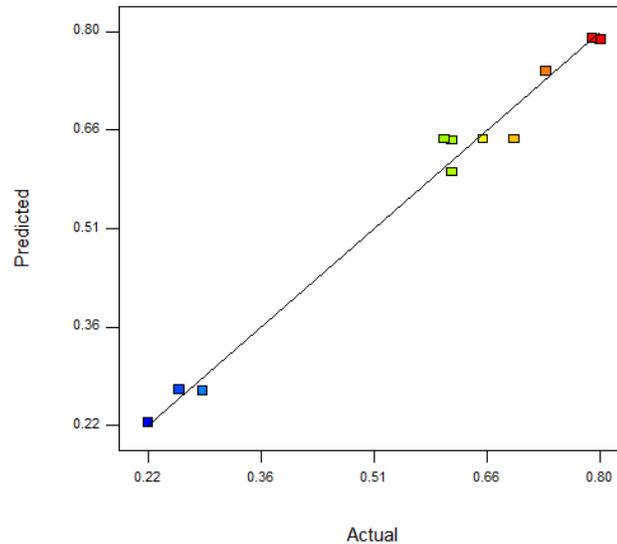


Figura 4-22: Valores previstos respecto los experimentales para el rendimiento de celulosa.

En la **Figura 4-23**, se observan dos curvas pronunciadas para los factores experimentales evaluados: complejo de celulasas (A) y β -glucosidasas (B). En una gráfica de perturbación, una curva pronunciada evidencia la sensibilidad del factor sobre la variable de respuesta.

En este caso, solo el factor experimental, complejo de celulasas tiene un efecto sobre la concentración de azúcares reductores luego de 48 horas de hidrólisis enzimática con una concentración inicial de 5 %p/p de biomasa de *Panicum maximum* pretratada. La línea de tendencia que representa la concentración del complejo de celulasas, es cóncava hacia abajo, mostrando un efecto positivo sobre la variable de respuesta, concentración de azúcares reductores. Por el contrario, la línea de tendencia que representa el factor experimental, β -glucosidasas, presenta un comportamiento lineal con pendiente cercano a cero, evidenciando un efecto muy leve sobre la variable de respuesta. Esto se podría explicar por la presencia de β -glucosidasa en el complejo de celulasas suministrado por Novozymes A/S (Dinamarca), que logran degradar parte de la celulosa presente en la biomasa pretratada, sin embargo, en una hidrólisis enzimática con altas concentraciones de sólidos, la dosis de β -glucosidasas presentes en este complejo podría ser muy baja, requiriéndose una dosis adicional de la enzima.

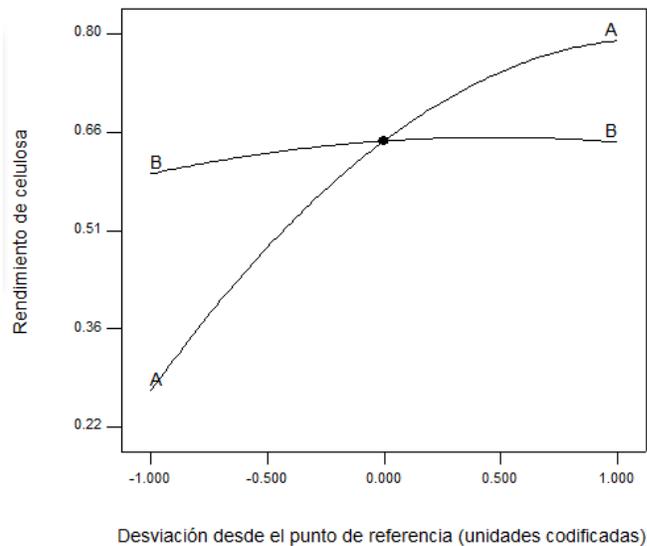


Figura 4-23: Perturbaciones de la concentración del complejo de celulasas (A) y concentración de β -glucosidasa (B) sobre la concentración de azúcares reductores.

A continuación se muestra la interacción entre la concentración del complejo de celulasas y la concentración de β -glucosidasas sobre la concentración de azúcares reductores totales. La curvatura de las líneas muestra que existe una interacción entre ambos factores experimentales que determina el comportamiento de la variable de respuesta. Ver **Figura 4-24**. Se observa que no existen diferencias significativas en la concentración de azúcares reductores al emplearse una dosis de β -glucosidasa con valores de 0 CBU/g o 1.77 CBU/g, manteniendo la dosis del complejo de celulasas constante, independientemente del nivel experimental evaluado (1.30 BHU/g o 61.44 BHU/g). Entre los experimentos 1 (61.44 BHU/g – 1.77 CBU/g) y 2 (61.44 BHU/g) el rendimiento de celulosa fue de 0.80 g celulosa/g biomasa pretratada seca y 0.73 g celulosa/g biomasa pretratada seca, respectivamente. Por lo tanto, a esa dosis de complejo de celulasas, la suplementación con β -glucosidasas en su límite superior (1.77 CBU/g) el rendimiento solo incrementó en 0.07 g celulosa/g biomasa pretrata seca. Por otro lado, entre los experimentos 4 (1.3 BHU/g – 1.77 CBU/g) y 6 (31.37 BHU/g – 1.77 CBU/g) se presentó un rendimiento de celulosa con un valor de 0.29 g celulosa/g biomasa pretratada seca y 0.61 g celulosa/g biomasa pretratada seca, respectivamente, un incremento en la dosis de complejo de celulasas aumentó el rendimiento de celulosa en la hidrólisis enzimática en un 100%.

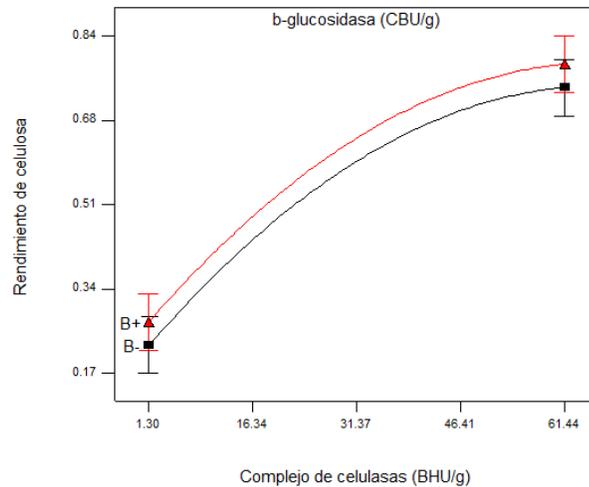
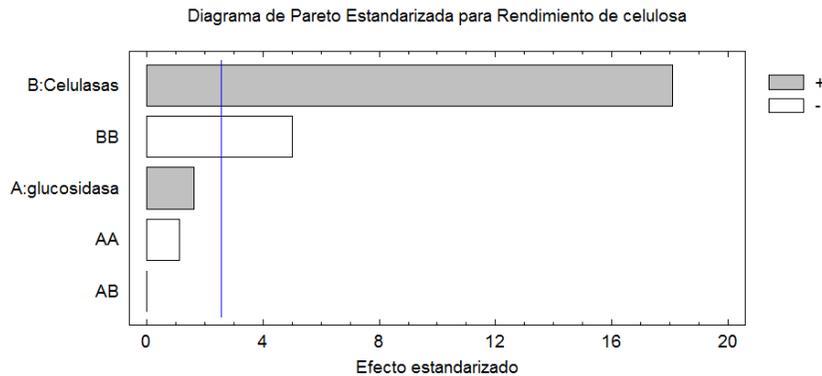
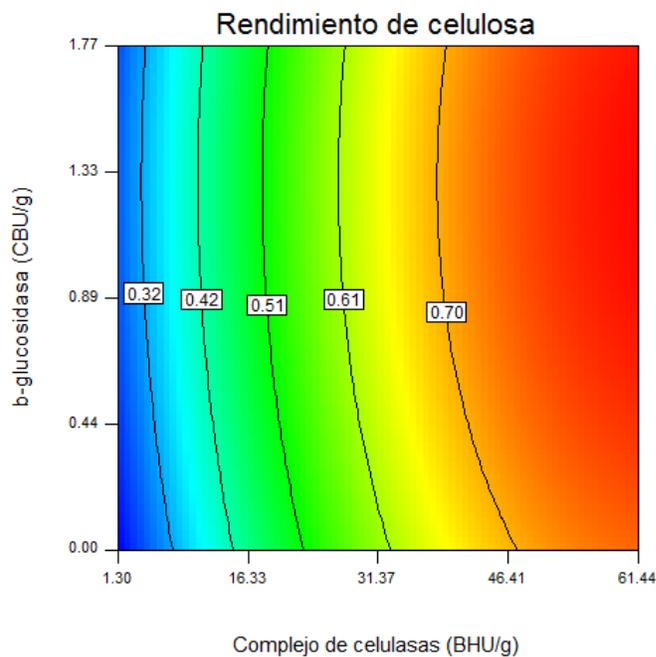


Figura 4-24: Interacción entre la concentración del complejo de celulasas y concentración de β -glucosidasa sobre la concentración de azúcares reductores (Para la concentración de β -glucosidasa: B+, 1.77 CBU/g; B-, 0 CBU/g).

Como se observa en la **Figura 4-25a**, la dosis de complejo de celulasas tiene un efecto significativo (valor P: <0.0001) sobre el rendimiento de celulosa, mientras que la dosis de β -glucosidasas (valor P: 0.1635) no tiene ningún efecto sobre esta variable. Ferreira *et al*, evaluaron cuales eran las variables que mayor efecto tenían en la conversión de celulosa a glucosa durante una hidrólisis enzimática de dos plantas arbustivas, *Cistus ladanifer* y *Cytisus striatus*, sometidas previamente a un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, 2.6 %p/p y una concentración de sólidos de 17 %p/p durante 75 minutos a 150°C. Las enzimas empleadas fueron un complejo de celulasas (NS50013) y β -glucosidasas (NS50010) suministradas por Novozymes. Del estudio se concluyó que la concentración de celulasas es la variable que mayor efecto tiene sobre la conversión de celulosa a glucosa en una hidrólisis enzimática con 72.27 %, mientras que la suplementación de β -glucosidasas solo tiene un efecto del 8.92 % sobre el desempeño de la hidrólisis [Ferreira *et al*, 2009]. Este resultado coincide con la tendencia observada en los ensayos realizados en el presente trabajo. El efecto no significativo de la β -glucosidasas también se evidencia en la **Figura 4-25b**, al no observarse cambios en el rendimiento de celulosa con el incremento en la dosis de β -glucosidasas a una dosis de complejo de celulasas constante.



(a)



(b)

Figura 4-25: (a) Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de azúcares reductores; (b) Contorno de superficie de respuesta para la concentración de azúcares reductores de acuerdo al modelo (Condiciones de proceso: 50°C; agitación magnética; 48 horas).

Luego de 24 horas de hidrólisis enzimática, debido a la pérdida de efectividad de la suplementación de β -glucosidasas, el rendimiento de celulosa no aumentó. Este efecto se evidenció en todos los experimentos. Pallapolu *et al*, estudiaron el efecto de la concentración de celulasas y suplementación de β -glucosidasas en una hidrólisis enzimática con una concentración de sólidos 1 %p/v de *swithgrass* variedad Dacotah

pretratado con ácido sulfúrico diluido. En los ensayos se observó que durante la hidrólisis el efecto de la suplementación de β -glucosidasas sobre la conversión de celulosa a glucosa disminuyó luego de 24 horas, siempre y cuando, no se realizará una nueva suplementación [Pallapolu *et al*, 2011]. Este fenómeno también fue observado por Kumar y Wyman, los cuales estudiaron la adsorción de celulasas y β -glucosidasas durante una hidrólisis enzimática de alamo pretratado con ácido sulfúrico diluido. Estos autores atribuyeron el descenso en la conversión a la adsorción causada por parte de la lignina residual en la biomasa pretratada sobre las enzimas empleadas, que para su caso en particular con alamo fue de 170.9 mg de enzima/g de sustrato y 301.3 mg enzima/g sustrato, para el complejo de celulasas y β -glucosidasas, respectivamente [Kumar y Wyman, 2009].

Teniendo en cuenta lo anterior, el máximo rendimiento de celulosa de los ensayos de hidrólisis enzimática fue 0.80 g celulosa/g biomasa pretratada con una dosis del complejo de celulasas de 61.44 BHU/g biomasa pretratada seca y β -glucosidasas de 1.77 CBU/g biomasa pretratada seca.

4.3.2. Hidrólisis enzimática tipo lote alimentado

Con este ensayo se pretendió evaluar la posibilidad de emplear una alta concentración de sólidos de biomasa pretratada de *P. maximum* en una hidrólisis enzimática con el fin de obtener un hidrolizado con una elevada concentración de azúcares. Para alcanzar altas concentraciones de sólidos en la hidrólisis enzimática se puede emplear una estrategia por lotes donde la hidrólisis inicie con una concentración de sólidos elevada o una estrategia por lote alimentado dosificando biomasa o biomasa más enzimas en intervalos de tiempo fijos. En primera estancia, al emplear una estrategia por lotes, las altas concentraciones de sólidos desde el inicio de la hidrólisis enzimática, afectan negativamente la eficiencia de mezclado disminuyendo el rendimiento de conversión de celulosa a glucosa e incrementando los tiempos de operación [Rosgaard, 2007a]. En ensayos preliminares, se realizó una hidrólisis enzimática con una concentración inicial de biomasa pretratada de 20 %p/p. A las 48 horas de proceso, el rendimiento de conversión de celulosa a glucosa fue de 0.41 g celulosa/g biomasa pretratada, 38 % inferior a lo obtenido con un sistema de lote alimentado como se observará más adelante, demostrando la poca eficacia de emplear esta estrategia. Por lo tanto, se seleccionó la estrategia por lote alimentado. Esta estrategia se puede implementar de

dos formas: (1) dosificando biomasa pretratada o (2) dosificando biomasa pretratada más enzima. En ensayos previos, al dosificar biomasa pretratada únicamente, el rendimiento fue similar a una hidrólisis por lotes con una alta concentración inicial de sólidos, demostrando que se requiere una dosis de enzima adicional para degradar de forma más eficiente la celulosa presente en la biomasa pretratada disminuyendo la pérdida de efectividad en la hidrólisis por la acumulación de componentes no digestibles (hemicelulosa residual en la biomasa pretratada o lignina) o problemas asociados a la adsorción de enzimas. Para estos ensayos, en el tiempo cero, la concentración inicial de biomasa pretratada fue de 5 %p/p, realizando adición de biomasa pretratada según se describe en la **Figura 3-1**, junto con dosis de enzimas. La combinación de enzimas empleada y su dosis fue de 61.44 BHU/g biomasa pretratada para el complejo de celulasas (NS22086) y 1.77 CBU/g biomasa pretratada para β -glucosidasa (NS22118).

Los tiempos de dosificación de 6, 12 y 24 horas se seleccionaron en base a lo reportado por otros autores. Yang *et al*, evaluaron la estrategia de lote alimentado empleando biomasa pretratada de rastrojo de maíz (pretratado con explosión de vapor y peróxido de hidrógeno), realizando dosificaciones de biomasa y enzima a las 12, 24, 36 y 48 horas. La concentración inicial de sólidos fue de 6 %p/p y el tiempo total para la hidrólisis enzimática de 144 horas alcanzando una concentración de sólidos de 24 %p/p y un rendimiento de 0.6 g celulosa/g biomasa pretratada seca [Yang *et al*, 2010]. Por su parte, Lu *et al*, estudiaron la hidrólisis enzimática tipo lote alimentado, realizando dosificaciones de biomasa pretratada de rastrojo de maíz (pretratado con explosión de vapor) cada 2 y 3 horas hasta alcanzar concentraciones de 25 y 30 %p/p. El rendimiento de conversión de celulosa a glucosa fue de 0.73 g celulosa/g biomasa pretratada [Lu *et al*, 2010]. Rabelo, 2010, determinó como tiempos de dosificación de biomasa pretratada y enzimas (celulasas y β -glucosidasa), 6 y 12 horas, empleando bagazo de caña de azúcar (pretratado con hidróxido de calcio), hasta alcanzar una concentración final de sólidos de 20 %p/p. El rendimiento a las 72 horas de hidrólisis enzimática fue de 0.445 g celulosa/g biomasa pretratada. Al emplear bagazo pretratado con peróxido de hidrógeno, el rendimiento a las 72 horas bajo el mismo sistema de dosificación fue de 0.741 g celulosa/g biomasa pretratada. Cabe resaltar que para la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado con peróxido se alcanzó una concentración de sólidos de 10 %p/p [Rabelo, 2010].

Los resultados de los ensayos realizados, se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4-12: Azúcares reductores totales (ART) y rendimiento de celulosa (Y_{Cel}) de la hidrólisis enzimática a diferentes concentraciones de sólidos.

Exp.	Conc. Sólidos (%p/p) ^a	Biomasa (g) ^b	ART (g/L)	Y_{Cel}
1	5	2	17.91 ± 1.84	0.65
2	7	2.8	26.25 ± 1.49	0.69
3	9	3.6	36.21 ± 1.53	0.74
4	10	4	38.81 ± 2.01	0.71
5	12	4.8	42.37 ± 0.99	0.65
6	15	6	51.63 ± 3.40	0.63
7	20	8	66.79 ± 1.98	0.61

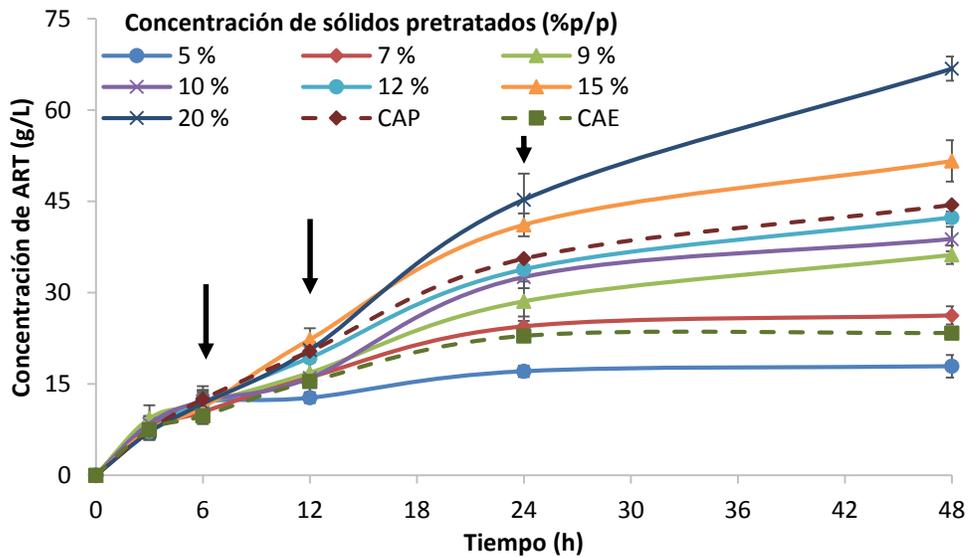
Condiciones de proceso: 50°C, agitación magnética, 61.44 BHU/g complejo de celulasas y 1.77 CBU/g β -glucosidasa; ^aPara un volumen de 40 mL; ^bBiomasa pretratada.

Cuando se realiza una hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos se pueden presentar problemas como: reducción en la transferencia de masa y calor, inhibición por productos derivados de la degradación de hemicelulosa y celulosa que quedan adsorbidos en la biomasa pretratada y son liberados por la degradación de la biomasa por parte de las enzimas, y adsorción de las enzimas por la biomasa pretratada. Todos estos problemas reducen el rendimiento de la hidrólisis. En el presente trabajo, los rendimientos obtenidos no presentaron valores mayores posiblemente por problemas de transferencia de masa asociados al sistema experimental manejado para los ensayos. Adicionalmente, luego de pretratar la biomasa con ácido diluido, queda una fracción de lignina presente en el material por la misma selectividad del ácido hacia la hemicelulosa. La acumulación de lignina pudo reducir la degradación de celulosa [Hassan, 2012] y adsorber parte de las enzimas colocadas durante la hidrólisis enzimática [Kumar y Wyman, 2009].

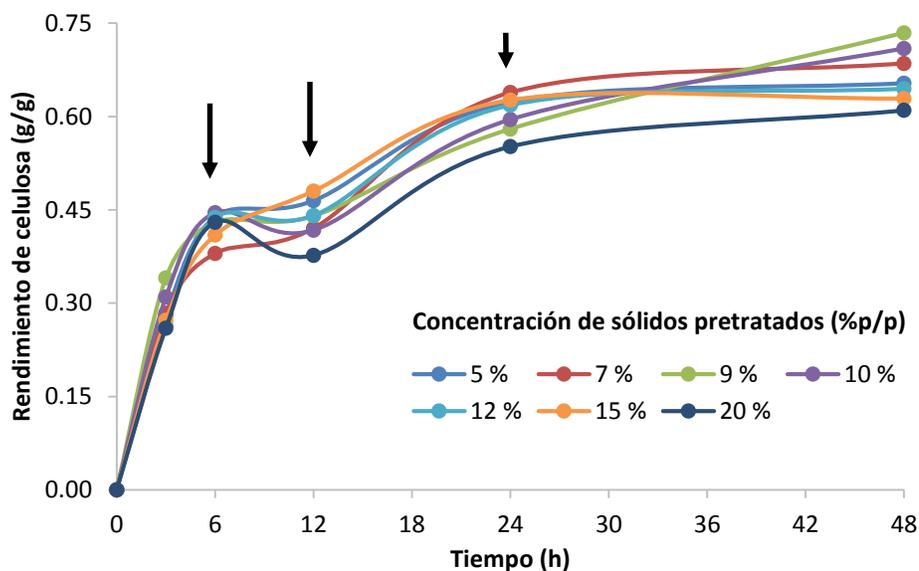
Como se observa en la **Tabla 4-12**, la concentración de azúcares reductores (AR) estuvo entre 18 g/L y 67 g/L, con un incremento en la concentración de biomasa pretratada de 5 %p/p a 20 %p/p. El rendimiento de celulosa, calculado con base en la concentración de azúcares reductores totales presentó un valor inferior de 0.61 g celulosa/g biomasa pretratada seca y superior de 0.74 g celulosa/g biomasa pretratada seca. Al haberse presentado rendimientos similares, se descartan problemas de inhibición durante la hidrólisis enzimática por suplementación de enzimas. Los diferentes ensayos de hidrólisis

enzimática con alta concentración de sólidos alcanzaron a las 48 horas un rendimiento similar a la hidrólisis con el límite inferior del ensayo (5 %p/p).

A continuación se observan los perfiles de concentración de ART y rendimiento de celulosa en la hidrólisis enzimática con diferentes concentraciones de sólidos mediante la estrategia de lote alimentado, donde CAP es un control donde solo se alimento biomasa pretratada y CAE es un control donde solo se alimento enzimas:



(a)



(b)

Figura 4-26: (a) Concentración de azúcares reductores totales (ART) respecto al tiempo, (b) Rendimiento de celulosa respecto al tiempo.

La **Figura 4-26a**, relaciona la concentración de ART respecto al tiempo como función de la concentración de biomasa pretratada sometida a hidrólisis enzimática. En todas las concentraciones de sólido evaluadas, la concentración de ART presentó un comportamiento similar, una alta tasa de liberación al inicio de la hidrólisis que luego disminuye con el transcurrir del tiempo. Este comportamiento se debe a la presencia en la biomasa pretratada de celulosa debilitada estructuralmente, lo que incrementa la porosidad de la biomasa facilitando la accesibilidad de las enzimas sobre la celulosa más disponible y fácilmente digestible. Por ejemplo, en el perfil de 5 %p/p y 7 %p/p, la mayor variación de la concentración de ART se presentó en las primeras 24 horas de hidrólisis. Sin embargo, concentraciones de sólidos más elevadas, 15 %p/p y 20%p/p, continuaron liberando azúcares reductores sin alcanzar un límite superior en las 48 horas de hidrólisis enzimática. Cuando la hidrólisis enzimática se realizó con una concentración de sólidos de 9 %p/p, 10 %p/p y 12 %p/p, la concentración de ART a las 48 horas no presentó diferencias significativas.

Respecto a los controles, al alimentar únicamente biomasa pretratada hasta alcanzar una concentración de sólidos de 20 %p/p (CAP), la concentración de ART presentó una reducción del 33.48 % y el rendimiento de celulosa de 32.79 % con relación a la hidrólisis tipo lote alimentado donde se adicionó enzimas (complejo de celulasas y β -glucosidasas) junto con biomasa para alcanzar la misma concentración de sólidos, lo cual reafirma la validez de realizar dosificaciones (biomasa pretratada y enzimas) en diferentes tiempos de la hidrólisis enzimática para alcanzar concentraciones significativas de azúcares y asegurar la rentabilidad del proceso. Al adicionar únicamente enzimas según la proporción establecida para una hidrólisis enzimática con 20 %p/p de biomasa pretratada y emplear una concentración de sólidos constante de 5 %p/p (CAE), se logró incrementar la concentración de azúcares en un 30.60 % respecto a la hidrólisis enzimática con 5 %p/p de sólidos, con lo cual se evidenció de nuevo como la adición de enzimas puede mejorar la degradación de celulosa, incrementando parámetros de desempeño como concentración de ART y rendimiento.

A pesar que las concentraciones finales de azúcares reductores a diferentes concentraciones de sólidos fueron diferentes, como se observa en la **Figura 4-26b**, el comportamiento del rendimiento de celulosa fue similar en todos los ensayos. Con un valor promedio de 0.67 ± 0.04 g de celulosa/g de biomasa pretratada, la estrategia de

lote alimentado demostró que la biomasa tratada con el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido tenía unas buenas condiciones para ser empleada en una hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos. Adicionalmente, la estrategia de lote alimentado aumentó el rendimiento de celulosa en comparación a los ensayos preliminares con una concentración inicial de sólidos de 20 %p/p, donde el rendimiento fue de 0.41 g celulosa/g biomasa pretratada. Sin embargo, no se descarta que al incrementar el tiempo de hidrólisis se pueda lograr un incremento en los rendimientos de cada uno de los ensayos.

Al observar la **Figura 4-27**, donde se relaciona en conjunto el comportamiento de la concentración y el rendimiento de azúcares reductores, se evidencia como la concentración de AR tuvo un incremento proporcional a la concentración de sólidos. Esta tendencia logró ajustarse a la ecuación de una línea recta de forma $y = mx + b$, donde m es la pendiente de la recta, con un valor de 3.3255, y b el intercepto de la recta, con un valor de 2.5725. El coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.9875.

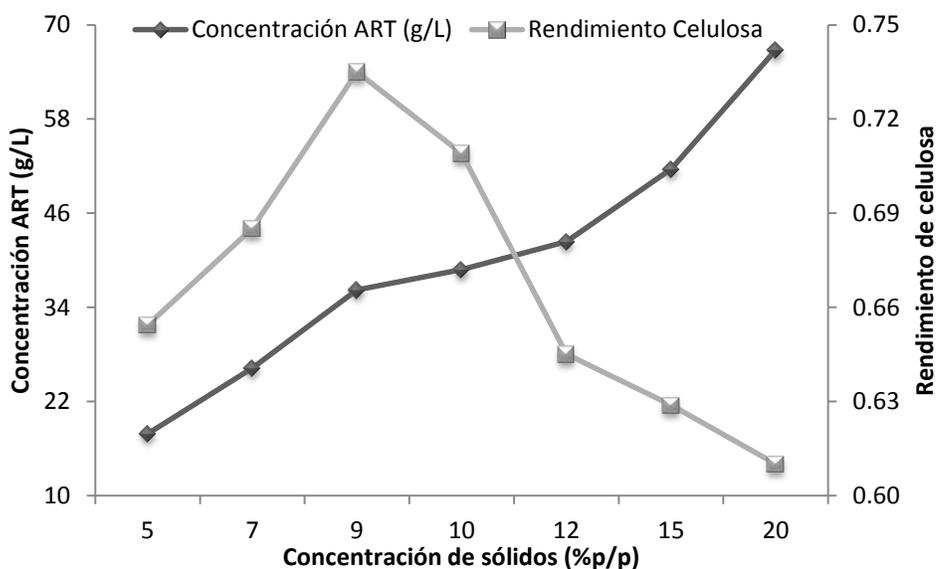


Figura 4-27: Valores finales de la concentración de ART y rendimiento de celulosa respecto a la concentración de sólidos (%p/p)

Al observar el comportamiento del rendimiento de celulosa, este obtuvo un incremento simultáneo con la concentración de ART hasta una concentración de sólidos de 9 %p/p. En las concentraciones superiores evaluadas, el rendimiento decreció hasta

0.61 g celulosa/g biomasa pretratada seca con 20 %p/p. Para entender este fenómeno, se debe tener en cuenta que al dosificar biomasa pretratada se requiere un tiempo de adaptación para garantizar un mezclado eficiente del sistema, que favorezca la degradación de celulosa. Adicionalmente, los ensayos de hidrólisis enzimática se realizaron con un tiempo final de 48 horas, los cortos tiempos entre cada dosificación de biomasa pretratada y enzima, de 6 y 12 horas, no permitieron la correcta degradación entre la biomasa remanente en el sistema y la nueva suministrada en cada dosis. Además, el pretratamiento seleccionado para este estudio fue de ácido sulfúrico diluido, el cual es selectivo a hemicelulosa, por lo que la biomasa pretratada queda con una fracción de lignina. Al dosificarse esa biomasa pretratada en la hidrólisis enzimática, se degrada la celulosa presente y a su vez, se acumula lignina en el sistema, la cual puede generar problemas de adsorción de enzimas que terminan por disminuir el rendimiento de la hidrólisis.

No obstante, al observar la **Figura 4-27**, se puede sugerir una condición que satisfaga parcialmente, concentración de AR y rendimiento de celulosa, que para los ensayos realizados, el intercepto entre ambas líneas de tendencia, 11 %p/p. La concentración de sólidos, CS (%p/p) y ART (g/L) se comparó con los resultados de otros autores. Ver **Tabla 4-13**. De todos los autores revisados, el presente trabajo reporta la mayor concentración de azúcares reductores en una hidrólisis enzimática de 48 horas. Teniendo en cuenta el tiempo de hidrólisis y la concentración de azúcares reductores obtenida, se reducen los costos del proceso, al disminuir el gasto energético para producir el hidrolizado en comparación de una hidrólisis enzimática con 5 %p/p concentración de sólidos. Esta reducción en costo, junto con los posibles usos que se le puede dar a las corrientes de proceso consideradas como residuales abre la posibilidad de implementar el concepto de biorrefinería.

Durante una hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos se debe alcanzar una elevada concentración de azúcares reductores totales para garantizar la rentabilidad económica de la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Por lo tanto, para la producción del hidrolizado a emplear en los ensayos de detoxificación y fermentación, se empleará una hidrólisis enzimática tipo lote alimentado con una duración de 48 horas, realizando adición de biomasa pretratada y enzimas hasta alcanzar una concentración de sólidos de 20 %p/p.

Tabla 4-13: Estudio comparativo de la hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos.

Sustrato / Pretratamiento	Enzimas	Condiciones Hidrólisis Enzimática	CS (%p/p)	AR (g/L)	Referencia
<i>Panicum maximum</i> / Ácido diluido	Complejo de celulasas (NS22086) y β -glucosidasa (NS22118). Novozymes.	61.44 BHU/g celulasas y 1.77 CBU/g β -glucosidasa; 50°C; <i>buffer</i> de citrato pH 4.8; agitación magnética; 48 h	15	51.6	Este trabajo
			20	66.8	
Paja de cebada / Explosión con vapor	Celluclast 1.5L y Novozyme 188. Novozyme.	7.5 FPU/g, 13 CBU/g; 50°C; <i>buffer</i> de citrato pH 4.8; 72 h.	15	78	Rosgaard <i>et al.</i> (2007b)
Rastrojo de maíz / Explosión con vapor	Acidic cellulose (122 FPU/g) Cellobioase (46 IU/g; 476 CMC IU/g). Global Green Tech.	20 FPU/g sustrato; 50°C; <i>buffer</i> de citrato pH 4.8; 96 h.	10	35	Lu <i>et al.</i> (2010)
			15	52	
			20	70	
			25	89	
Rastrojo de maíz / AFEX	CTec3 (172 mg/g enzima) y HTec3 (140 mg/g enzima). Novozymes.	10 mg/g glucosa; 50°C; <i>buffer</i> de citrato pH 4.8; 150 rpm; 72 h.	18	60	Bals <i>et al.</i> (2014).
			24	80	
			30	98	
			36	118	
Papel periódico / Blanqueado		16.02 g/L enzima; 50°C; <i>buffer</i> de citrato pH 4.8; 200 rpm; 72 h		52 – 58	
Papel usado de oficina / Blanqueado	Celluclast 1.5L+Novozyme 188 - Cellic Ctec 1. Novozymes.	19.89 g/L enzima; 50°C; <i>buffer</i> de citrato pH 4.8; 200 rpm; 72 h	15	85 – 94	Wang <i>et al.</i> (2012)
12.18 g/L enzima; 50°C; <i>buffer</i> de citrato pH 4.8; 200 rpm; 72 h				42 – 46	
17.85 g/L enzima; 50°C; <i>buffer</i> de citrato pH 4.8; 200 rpm; 72 h				63 – 70	
Revistas / Blanqueado					
Cartón / Blanqueado					

Tabla 4-13: Continuación

Sustrato / Pretratamiento	Enzimas	Condiciones Hidrólisis Enzimática	CS (%p/p)	AR (g/L)	Referencia
Rama de oliva / Agua caliente	Celluclast 1.5L+Novozy me 188.	15 FPU/g sustrato and 15 IU/g sustrato; 50°C; buffer de citrato pH 4.8; agitador rotatorio; 72 h.	20	52	Cara <i>et al.</i> (2007)
	Novozymes		30	61	
<i>Populus tremula</i> / Explosión de vapor	Cellic CTEC; Novozyme 188, Accellerase 1500. Novozyme y Genecor.	100 mg/g sustrato, 15 mg/g sustrato, 50 mg/g sustrato; 50°C; <i>buffer</i> de citrato pH 4.8; 48 h.	20	49.5	Risio <i>et al.</i> (2011)
	Cellic CTC; Novozyme 188, AF100L. Novozyme y Dyadic.		30	48.8	
Granos de destilería / Agua caliente	Cellulase (GC220); Novozyme 188, Multifect	15 FPU/g sustrato, 40 IU/g sustrato, 50 U/g sustrato, 2 U/g sustrato; 50°C; <i>buffer</i> de citrato pH 4.8; 200 rpm; 48 horas.	20	47.8	Kim <i>et al.</i> (2008)
	Pectinase FE, Depol 740.		30	56.6	

4.4. Fermentación de hidrolizados

El hidrolizado de *P. maximum* obtenido en las mejores condiciones de hidrólisis enzimática, concentración de sólidos de 20 %p/p, fue empleado para los ensayos de detoxificación y fermentación. En el hidrolizado no fue posible detectar la presencia de hidroximetilfulfural (HMF) y furfural, compuestos considerados como inhibidores de la fermentación [Pienkos y Zhang, 2009], sin embargo no se descarta la presencia de otros compuestos inhibitorios como ácido siríngico, ácido 4-hidroxibenzoico, vainillina, siríngaldehído y benzaldehído. Teniendo en cuenta las limitaciones del sistema empleado para la producción del hidrolizado con altas concentraciones de sólidos, antes de iniciar los ensayos de detoxificación, la concentración inicial de glucosa se ajustó a 48 ± 2 g/L,

con el fin de aprovechar la mayor cantidad de hidrolizado producido. Los tratamientos de detoxificación evaluados fueron: carbón activado, hidróxido de sodio y una combinación de ambos tratamientos. Después de cada tratamiento, se cuantificó la concentración de glucosa con el fin de evidenciar una posible pérdida del monosacárido.

Para la fermentación del hidrolizado detoxificado, se empleó como sistema biológico de referencia la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red® (Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, France). Durante la fermentación se cuantificó el consumo de glucosa, la producción de etanol y glicerol, este último, subproducto representativo de la fermentación alcohólica. Además se evaluó la concentración de biomasa al finalizar la fermentación. Con esto, se logró establecer el rendimiento y productividad de la producción de etanol, junto con el rendimiento de glicerol y biomasa.

Los resultados promedio de los tratamientos de detoxificación se encuentran en la **Figura 4-28**.

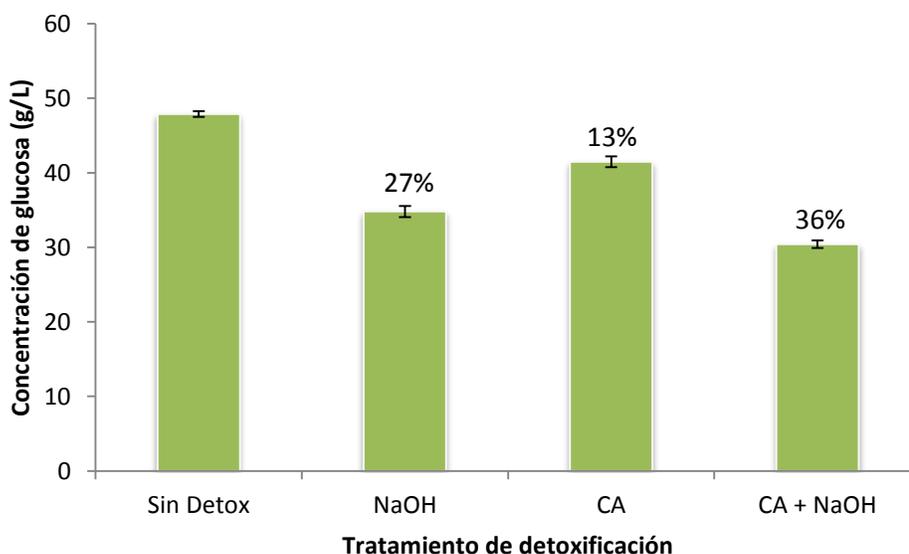


Figura 4-28: Concentración de glucosa en el hidrolizado luego de aplicar las diferentes estrategias de detoxificación.

El tratamiento de detoxificación que causó la mayor pérdida de glucosa fue la combinación de carbón activado e hidróxido de sodio con 36 %, y una concentración final

de glucosa de 30.5 g/L. La detoxificación con hidróxido de sodio redujo a 35 g/L (27 %) la concentración de glucosa, mientras que la detoxificación con carbón activado la redujo a 41.5 g/L (13 %). La pérdida de glucosa luego de un tratamiento de detoxificación aún no presenta resultados concluyentes en la literatura. Hogde *et al*, realizaron la detoxificación con bases como el hidróxido de sodio e hidróxido de calcio en un hidrolizado encontrando una pérdida de azúcares de 11%, mientras que para el tratamiento con carbón activado no hubo pérdida de ninguno de los azúcares. Respecto a los inhibidores, reportaron para un tratamiento con hidróxido de calcio una remoción del 48% al 72% de HMF, mientras que para el carbón activado en todos los ensayos la remoción de HMF fue superior al 85%. No hubo remoción para el ácido fórmico, levulínico y acético [Hodge *et al*, 2009b]. Por otro lado, Millati *et al*, estudiaron el efecto de pH, tiempo y temperatura del tratamiento de detoxificación básico en un hidrolizado de residuos forestales, logrando una remoción del 30% de hidroximetilfurfural (HMF) y furfural. Además resaltaron una pérdida del 70% de azúcares en sus ensayos con hidróxido de calcio a pH 12, límite superior seleccionado para sus tratamientos de detoxificación [Millati *et al*, 2002]. Otros autores también han reportado la remoción de inhibidores con estos tratamientos de detoxificación. Miyafuji *et al*, lograron remover el 100% de HMF y furfural con carbón activado [Miyafuji *et al*, 2003]. Rodrigues *et al*, también obtuvieron excelentes resultados con carbón activado, al remover entre un 90% y 98%, los compuestos fenólicos presentes en un hidrolizado de bagazo de caña [Rodrigues *et al*, 2001]. El tratamiento con hidróxido de sodio remueve componentes considerados inhibidores de la fermentación como furfural, HMF y ácido acético, junto con azúcares fermentables presentes en el hidrolizado. Larsson *et al*, evaluaron 15 tratamientos de detoxificación en un hidrolizado de astillas de abeto rojo (*Picea abies*) obtenido de un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido a 0.5 %p/p y 222°C durante 7 minutos. Entre los tratamientos de detoxificación se encontraban dos tratamientos básicos, hidróxido de sodio e hidróxido de calcio (*overliming*). Con ambos tratamientos, el hidrolizado se llevó a un pH 10 con un tiempo de residencia de 1 hora y posterior filtración. La remoción de azúcares reductores fue de 1% en ambos tratamientos respecto al hidrolizado sin tratamiento. El rendimiento de etanol no presentó diferencias significativas. La productividad a las 6 horas de fermentación fue mayor para el tratamiento con hidróxido de calcio con 1.21 g/L/h seguida del hidróxido de sodio con 0.46 g/L/h [Larsson *et al.*, 1999].

Al emplearse durante un tratamiento de detoxificación básico una combinación de valores elevados de temperatura y pH se puede remover una fracción de los azúcares reductores disminuyendo el rendimiento de celulosa del tratamiento y por ende, el rendimiento global del proceso. Horváth *et al.*, evaluaron el efecto de diferentes condiciones de *overliming* (temperatura y pH) sobre un hidrolizado ácido de astillas de abeto rojo (*Picea abies*) y su posterior desempeño en una fermentación. El tiempo de duración del tratamiento de *overliming* fue de 3 horas; el rango de pH seleccionado fue de 8 a 12 y el de temperatura de 5 a 80°C. De los ensayos realizados se logró concluir que una combinación de pH/temperatura igual o superior de 11/55°C, remueve del 64 a 97%, respecto a la concentración inicial de azúcares. Se debe resaltar que en este estudio solo se tuvo en cuenta la concentración de glucosa y manosa [Horváth *et al.*, 2005]. La selección errónea de las condiciones de pH, temperatura y tiempo, que en el trabajo fue 12, 60°C y 1 hora, pudo haber sido una de las causas por las cuales se presentó una pérdida del 27% de glucosa en el hidrolizado de *Panicum maximum*. La degradación de glucosa durante el tratamiento de detoxificación con hidróxido de sodio pudo haberse causado por fenómenos de enolización y formación de ácidos sacarínicos, mientras que en el tratamiento con carbón activado a fenómenos de adsorción.

Yang y Montgomery, evaluaron la degradación de glucosa en solución acuosa con hidróxido de calcio a una temperatura de 100°C durante 30 minutos obteniendo más de 50 compuestos diferentes de degradación de glucosa como: ácidos C₆ (2-C-metilpentanoico, hexametasacarínico y ácido isosacarínico) y ácidos < C₆ (glicólico, láctico, glicérico, 2-C-metilglicérico) [Yang y Montgomery, 1996]. Por su parte, Andary *et al.*, evaluaron un tratamiento de detoxificación con hidróxido de calcio a diferentes condiciones de pH (10 y 12), temperatura (25°C y 60°C) y tiempo (15, 30 y 60 minutos), similares a la condición evaluada en el presente trabajo, sobre un hidrolizado ácido de aceitunas (*Olea europea*) encontrando un incremento en la concentración de fenoles y una reducción en la concentración de glucosa en el hidrolizado detoxificado [Andary *et al.*, 2013]. Por otro lado, Gutsch y Sixta, evaluaron un tratamiento con detoxificación con diferentes concentraciones de carbón activado (8 g/L y 12 g/L) y tiempos de residencia o adsorción (20, 40 y 80 minutos) sobre un hidrolizado de *Eucalyptus globulus* removiendo el 40.7 % de azúcares totales presentes. [Gutsch y Sixta, 2011].

A pesar de lo descrito anteriormente, el efecto de cada tratamiento de detoxificación no deja de ser particular dependiendo de la biomasa para obtener el hidrolizado, por lo tanto es necesario estudiar las condiciones en cada sistema empleando como referencia con lo reportado en la literatura sin tomarlo como una verdad absoluta para el proceso. En este trabajo, no se evidenció presencia de HMF y furfural, en el hidrolizado sin detoxificar y detoxificado, lo cual podría sugerir que la operación de detoxificación para este hidrolizado podría omitirse tomando como referencia estos dos compuestos inhibidores. Sin embargo, como se describe a continuación, en los ensayos de fermentación de observaron claras diferencias en el rendimiento de etanol.

La fermentación de cada hidrolizado detoxificado se realizó sin ajustar la concentración inicial de glucosa con el objetivo de simular un proceso continuo de detoxificación y fermentación, de esta manera se logró eliminar parte de las perturbaciones en los ensayos. Adicionalmente se empleó un medio definido YNB para evitar efectos externos sobre la fermentación por la falta de suplementación en el hidrolizado detoxificado junto con un sistema de *airlocks* para garantizar la anaerobiosis del sistema. Las condiciones de fermentación fueron pH, 5 y temperatura de 30°C con agitación magnética durante 24 horas. Las condiciones de pH, temperatura y concentración inicial de glucosa, empleadas en este estudio fueron las adecuadas para una fermentación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica. Singh y Bishnoi, estudiaron el efecto de 15 factores de la fermentación alcohólica de un hidrolizado de paja de trigo pretratada con tratamiento básico acoplado con microondas, mediante dos diseños experimentales consecutivos: Plackett-Burman y Box-Behnken. Después de aplicar los diseños respectivos, solo tres factores presentaron un efecto significativo sobre la producción de etanol: temperatura, porcentaje de inóculo y concentración de azúcares reductores totales [Singh y Bishnoi, 2013].

La temperatura de fermentación debe manejarse en valores de 30 °C a 35 °C como máximo para evitar acelerar el efecto de inhibición de los azúcares reductores y la concentración de etanol sobre el metabolismo celular de la levadura. Altas temperaturas desnaturalizan los ribosomas de la célula causando problemas en la membrana celular [McMeekin *et al.*, 2002]. A pesar, que el pH no es una variable con efecto significativo sobre la producción de etanol, siempre se sugiere que se mantenga entre 4.1 y 6. Cambios en el pH pueden disminuir la producción de ATP en el metabolismo celular, afectando negativamente el rendimiento de etanol [Nigam, 2000]. La concentración inicial

de fuente de carbono, glucosa o cualquier otro sustrato, debe manejarse y en algunos casos ajustarse dependiendo del genero de levadura a manejar. Altas concentraciones de sustrato, pueden generar un estrés osmótico sobre la levadura obligándola a producir subproductos indeseados para aliviar la presión, disminuyendo el rendimiento de etanol [Bekers *et al.*, 2000].

En la **Figura 4-29** y **Figura 4-30**, se muestra el consumo de glucosa y producción de etanol y glicerol durante los ensayos de fermentación. Estos se realizaron por triplicado y en las gráficas se colocan los valores promedio de las concentraciones. Independientemente del tratamiento de detoxificación empleado sobre el hidrolizado, los tiempos de fermentación fueron inferiores a 24 horas. El valor coincide con lo reportado por Sharma *et al.*, (2004) y Tewari *et al.*, (1987) los cuales determinaron este tiempo como el óptimo para la producción de etanol de un hidrolizado ácido o enzimático de residuos agroindustriales y biomasa lignocelulósica empleando *Saccharomyces cerevisiae*.

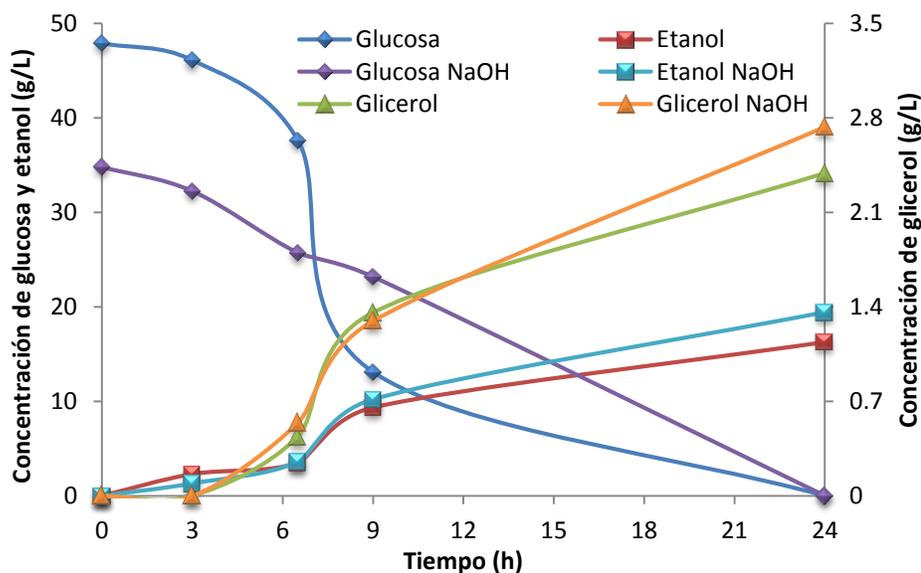


Figura 4-29: Consumo de glucosa, producción de etanol y glicerol durante la fermentación de cada hidrolizado detoxificado: hidrolizado sin detoxificar y detoxificado con hidróxido de sodio (NaOH).

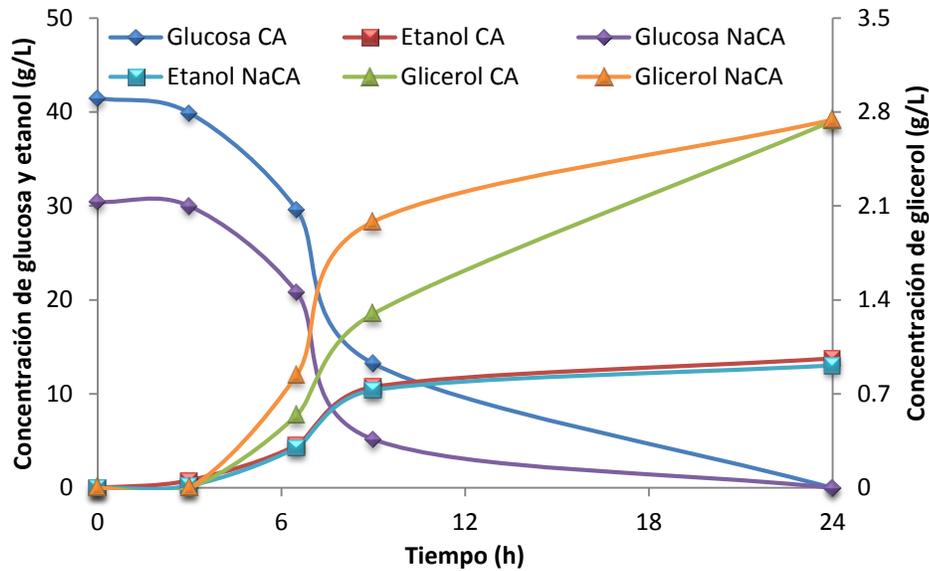


Figura 4-30: Consumo de glucosa, producción de etanol y glicerol durante la fermentación de cada hidrolizado detoxificado: detoxificación con carbón activado (CA) y detoxificación con CA + NaOH.

El hidrolizado detoxificado con la combinación de tratamientos, carbón activado e hidróxido de sodio, presenta la tasa más alta de consumo de glucosa con 83 % de sustrato consumido en 9 horas de fermentación. En el hidrolizado detoxificado con carbón activado y sin detoxificar el consumo fue de 68 % y 73 %, respectivamente. Una tasa de consumo de glucosa tan elevada en un tiempo tan corto de fermentación, reafirma lo mencionado anteriormente y reduce junto con costos de operación el riesgo de contaminación. El hidrolizado tratado con hidróxido de sodio, presenta la tasa de consumo más baja con 33 % de consumo de sustrato en 9 horas de fermentación.

En términos de rendimiento y productividad de etanol, la estrategia de detoxificación con hidróxido de sodio fue la más favorable para tratar el hidrolizado de *P. maximum* antes de la fermentación. Con esta estrategia y luego de una fermentación de 24 horas, se obtuvo 19.43 g/L de concentración de etanol con un rendimiento de 0.56 g etanol/g glucosa y una productividad de 0.81 g/L/h. El rendimiento de etanol para esta fermentación fue superior al teórico, 0.51 g etanol/g glucosa, este fenómeno se pudo haber presentado por la fermentación de xilosa presente en el hidrolizado detoxificado por parte de la *Saccharomyces cerevisiae*, al existir evidencia de una ruta para el empleo de esta pentosa como sustrato para la producción de alcoholes [Batt *et al*, 1985].

La concentración de glicerol en todos los experimentos fue cercana a 2.5 g/L. Para las otras estrategias de detoxificación, los resultados se pueden observar en la **Tabla 4-14**.

Tabla 4-14: Concentración final y rendimiento de biomasa (Y_X), glicerol (Y_{Gli}) y etanol (Y_P), y productividad de etanol (η) en una fermentación de hidrolizado de *P. maximum*.

Detoxificación	Biomasa (g/L)	Y_X (g _x /g _s)	Etanol (g/L)	Y_P (g _p /g _s)	η (g/L/h)	Glicerol (g/L)	Y_{Gli} (g _{Gli} /g _s)
Sin detoxificar	6.15	0.13	16.28	0.34	0.68	2.39	0.05
Hidróxido de sodio (NaOH)	7.88	0.23	19.43	0.56	0.81	2.73	0.08
Carbón activado (CA)	6.05	0.15	13.77	0.33	0.57	2.52	0.06
CA + NaOH	7.30	0.24	13.03	0.43	0.54	2.74	0.09

Una forma de entender por que la productividad de la fermentación fue tan alta, es debido al contenido de proteína del hidrolizado proveniente del *P. maximum*. Según Ilijn (1954), la especie de *Panicum maximum* empleada en este estudio podría presentar un contenido de proteína cruda total de 4.1% - 13.4%, donde la proteína cruda soluble correspondía a un 0.6% - 1.8%. En composición elemental el contenido de fósforo pudo variar entre 0.107% - 0.438%, calcio, 0.30% - 0.85%, magnesio, 0.16% - 0.35%, y potasio, 0.85% - 3.13%. Estos valores se encuentran en porcentaje de biomasa seca.

Parte de la proteína soluble pudo liberarse durante el pretratamiento con ácido diluido de la biomasa junto con algunos de los elementos mencionados, y otra parte de los mismos se pudo haber recuperado en el hidrolizado [Quevedo, 2011]. Al no tener certeza de la cantidad recuperada, se realizó la suplementación de YNB (suplemento rico en aminoácidos) en el hidrolizado. Sin embargo, no se le debe restar importancia a la presencia de estas sustancias en el hidrolizado, debido a que cada una de ellas tiene una función específica sobre el buen desempeño de la levadura. Los aminoácidos contribuyen a la formación y buena funcionalidad de las enzimas. El fosforo interviene en la formación de ácidos nucleicos, transducción de energía y estructura transmembranal. El calcio es un segundo mensajero de la señal de transducción. Magnesio interviene en la actividad enzimática y formación de organelas celulares. El potasio juega un rol importante en el balance iónico de la célula [Walker, 1998]. Cabe resaltar, que no se realizó suplementación de una fuente de nitrógeno orgánico como extracto de levadura, extracto de malta o peptona.

Lu *et al.*, encontraron que el lavado de la biomasa pretratada antes de dosificarla en una hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos es fundamental para evitar un descenso en el rendimiento de la fermentación. Al realizar ensayos de fermentación con hidrolizado enzimático de paja de trigo pretratada con explosión de vapor encontraron un descenso del 68% al 20% en rendimiento de etanol al emplear una biomasa pretratada lavada en comparación a una sin lavar [Lu *et al.*, 2010]. Gracias a la importancia del lavado, antes de la hidrólisis enzimática, toda biomasa pretratada con ácido sulfúrico diluido, recibió un lavado con agua destilada estéril, de manera que se lograran remover parte de los compuestos inhibidores de la fermentación como HMF y furfural (producto de la degradación de hemicelulosa durante el pretratamiento), antes que fuesen liberados durante la degradación de celulosa en la hidrólisis. Este argumento, justificaría por que no se pudo detectar estos inhibidores de fermentación en el hidrolizado de *P. maximum*.

De los ensayos de detoxificación y fermentación, se logró concluir que un tratamiento de detoxificación con hidróxido de sodio sobre el hidrolizado de *P. maximum* obtenido bajo condiciones de altas concentraciones de sólidos en el pretratamiento e hidrólisis enzimática permitió alcanzar una mayor concentración de etanol y productividad respecto a las otras opciones evaluadas.

4.5. Rendimiento Global para la producción de etanol a partir de *Panicum maximum*

En la producción de etanol lignocelulosico intervienen tres etapas fundamentales: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación. En algunos casos es necesario realizar un tratamiento de detoxificación del hidrolizado, al presentarse sustancias que podrían inhibir la fermentación. En la **Figura 4-31**, se encuentra el balance de materia para la producción de etanol empleando las mejores condiciones determinadas en este trabajo, pretratamiento e hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos junto al tratamiento de detoxificación seleccionado para el hidrolizado.

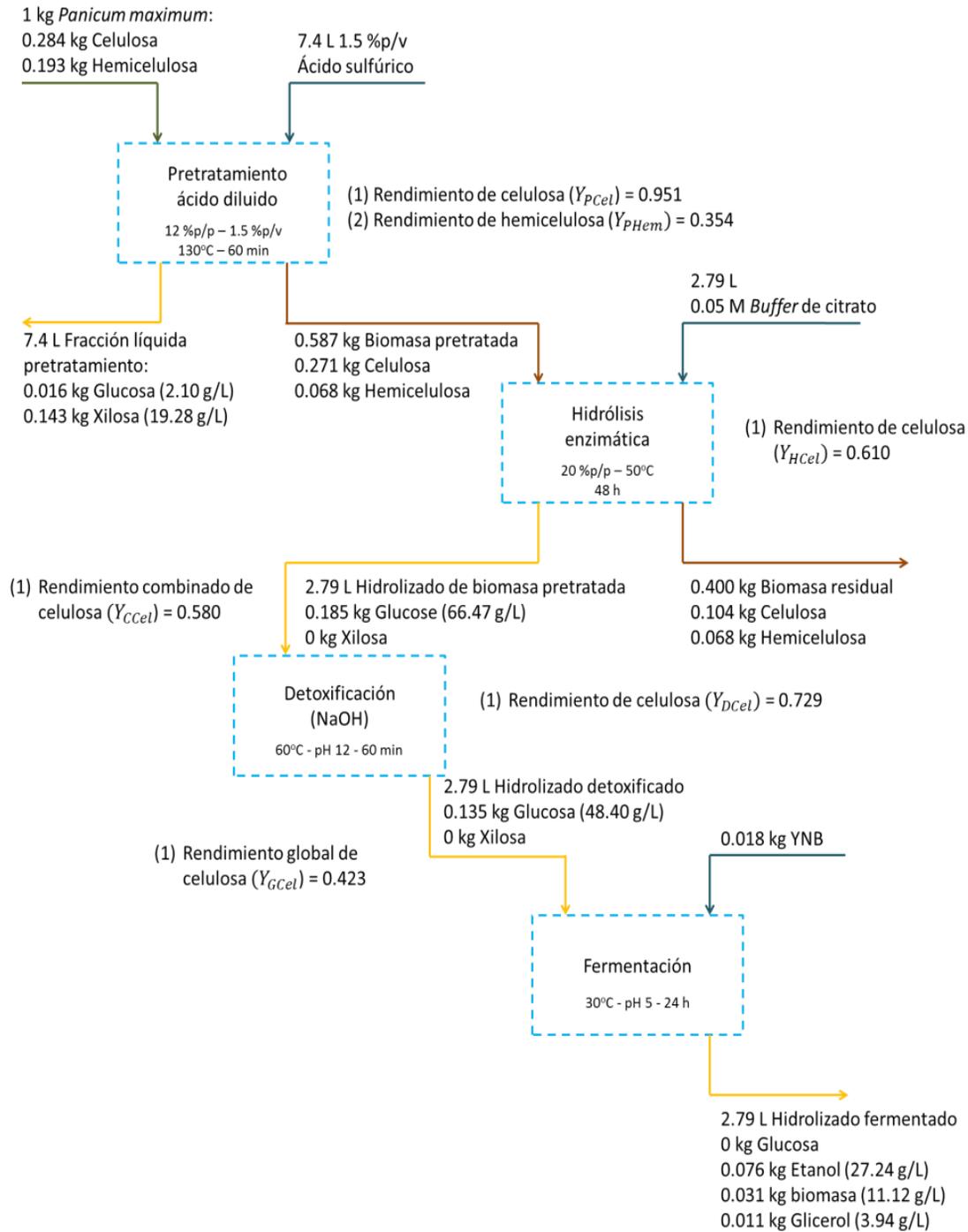


Figura 4-31: Balance de materia para la producción de etanol a partir de *Panicum maximum*.

Para el cálculo de los rendimientos de celulosa en el pretratamiento e hidrólisis enzimática, se empleó la **Ecuación (4.10)** y **Ecuación (4.13)**. El rendimiento combinado de celulosa en el pretratamiento junto con la hidrólisis enzimática se determinó mediante la **Ecuación (4.15)**.

$$Y_{CCel} = Y_{PCel} \times Y_{H Cel} \quad (4.15)$$

Con la **Ecuación (4.16)**, se calculó el rendimiento de celulosa en el tratamiento de detoxificación. Los gramos de glucosa deben transformarse a gramos de celulosa con la **Ecuación (4.1)** y **Ecuación (4.2)** antes de utilizar la fórmula para determinar el rendimiento:

$$Y_{DCel} = \frac{\text{g de celulosa en hidrolizado previa detoxificación}}{\text{g de celulosa en hidrolizado despues de la detoxificación}} \quad (4.16)$$

Para determinar el rendimiento global de celulosa se empleó la **Ecuación (4.17)**:

$$Y_{GCel} = Y_{PCel} \times Y_{H Cel} \times Y_{DCel} \quad (4.17)$$

En la **Tabla 4-16** se encuentra el rendimiento de celulosa en cada uno de los tratamientos de detoxificación de hidrolizado evaluados (Y_{DCel}) junto con el rendimiento global de celulosa (Y_{GCel}), rendimiento de etanol, y productividades (η).

Tabla 4-15: Rendimiento de celulosa por cada tratamiento de detoxificación

Detoxificación	Y_{PCel}	$Y_{H Cel}$	Y_{DCel}	Y_{GCel}	Rendimiento etanol*	η (g/L/h)
Sin detoxificar			1	0.580	63.05	0.94
Hidróxido de sodio (NaOH)	0.951	0.610	0.729	0.423	75.24	1.12
Carbón activado (CA)			0.866	0.502	53.31	0.80
CA + NaOH			0.635	0.368	50.46	0.75

*El rendimiento de etanol esta expresado en mg etanol/g biomasa

Al observar el rendimiento global de celulosa (Y_{GCel}), la mejor combinación de operaciones para la obtención de etanol fue: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación, sin detoxificación. La mayor reducción de rendimiento global se presentó con la combinación de tratamientos de detoxificación, con un 36.55 %, el rendimiento de etanol disminuyó en 19.97 % y la productividad en 20.21 %. Estos porcentajes fueron calculados respecto a la condición de mejor rendimiento global de celulosa. A pesar que el mejor rendimiento global se obtuvo en un proceso sin detoxificación, el rendimiento de etanol y productividad aumentaron en un 19.33 % y 19.15 %, respectivamente, cuando se aplicó un tratamiento de detoxificación con hidróxido de sodio sobre el hidrolizado.

Un rendimiento de etanol de 75.24 mg etanol/g biomasa, el mayor valor obtenido en los ensayos de fermentación, en comparación con lo reportado en otros trabajos realizados con gramíneas como fuente de azúcares para la producción de etanol, resulta ser muy competitivo. Mateus *et al.*, realizaron la sacarificación y fermentación simultánea (SFS) del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*) pretratado con ácido sulfúrico diluido empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* D₅A, obteniendo en un periodo de 72 horas, un rendimiento de 117 mg etanol/g biomasa [Mateus *et al.*, 2012]. Por su parte, Cardona *et al.*, realizaron SFS de pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) evaluando el efecto de diferentes pretratamientos, ácido diluido, explosión de vapor, hidróxido de sodio, peróxido y amonio. El mejor resultado se obtuvo con el tratamiento de hidróxido de sodio con un rendimiento de etanol de 67.75 mg etanol/g biomasa luego de 24 horas [Cardona *et al.*, 2014]. Faga *et al.*, evaluaron la producción de etanol a partir de *switchgrass* (*Panicum virgatum* var. Kanlow) pretratado por hidrotermólisis con un proceso de SFS. Las cepas empleadas fueron cinco accesiones de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*, D₅A. Cuatro de las cinco accesiones de *K. marxianus* alcanzaron una concentración de etanol de 15 g/L en 72 horas, luego de ese tiempo, la concentración siguió aumentando alcanzando un valor de 19.5 g/L. La *S. cerevisiae* alcanzó valores similares a las anteriores en el mismo tiempo, pero su incremento hasta el tiempo final del ensayo (168 horas) fue mayor, alcanzando una concentración final de etanol de 21.9 g/L [Faga *et al.*, 2010]. Al reescribir los valores de concentración en rendimiento, se obtuvo 24.71 mg etanol/ g biomasa pretratada y 27.75 mg etanol/ g biomasa pretratada, para *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, respectivamente.

Li *et al*, determinaron la influencia del factor combinado de severidad (CS) en un pretratamiento con agua caliente sobre la producción de etanol en una SFS de *Miscanthus lutarioriparius*. Para la evaluación se realizaron experimentos individuales empleando los sólidos suspendidos y precipitados durante el pretratamiento. Al usarse los sólidos suspendidos en la SFS, obtenidos con el límite superior de CS evaluado, 4.71, se obtuvo un rendimiento de 248.3 mg etanol/g de biomasa pretratada (162.5 mg etanol/g de biomasa). Para los sólidos precipitados, con el mismo CS de 4.71, se obtuvo un rendimiento de 236.1 mg etanol/g de biomasa pretratada (153.1 mg etanol/g biomasa) [Li *et al.*, 2013]. Estos valores se encuentran cercanos a los considerados como favorables para la factibilidad económica del proceso.

Se han encontrado otros autores que trabajan en la búsqueda de nuevas alternativas para incrementar el rendimiento de etanol. Una de las opciones se basa en la modificación genética del pasto. Fu *et al*, demostraron que el gen ácido cafeico 3-O-metiltransferasa (COMT por sus siglas en inglés) interviene en la formación de lignina en el *switchgrass*. Al generar plantas transgénicas manipulando el gen, se logró reducir el contenido de lignina, mejorando la calidad en términos de sacarificación y producción de etanol [Fu *et al.*, 2011]. Yee *et al*, sometieron tres accesiones del pasto (T1-2, T1-3, T1-12) a dos pretratamientos, ácido diluido y agua caliente, con una posterior SFS empleando tres bacterias termófilas gram positivas con capacidad celulolítica, *Clostridium thermocellum*, *Caldicellulosiruptor obsidiansis* y *Caldicellulosiruptor bescii*, junto con un control usando *S. cerevisiae* D₅A [Yee *et al.*, 2012]. Durante la SFS de pasto pretratado con ácido diluido y empleando la levadura, se obtuvieron rendimientos superiores a 150 y 250 mg etanol/g de celulosa, para la accesión T1-3 de pasto no transgénico y transgénico, respectivamente. Las bacterias, *C. bescii* y *C. obsidiansis*, presentaron valores superiores a 200 y 250 mg producto de fermentación/ g de celulosa, mientras que para *C. thermocellum* hubo inhibición durante la fermentación, la cual fue remediada con una extracción con agua caliente, mejorado el rendimiento de 200 hasta 300 mg producto de fermentación/g de celulosa.

Actualmente, la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, se encuentra enmarcada en el concepto de biorrefinería, que consiste en utilizar los diferentes residuos sólidos y líquidos, como materia prima para procesos subsecuentes como producción de otros biocombustibles, energía eléctrica y sustancias químicas análogas a las obtenidas

en la refinación del petróleo. Al aprovechar los residuos que se obtienen de las diferentes etapas de producción se logra incrementar la factibilidad económica del proceso. Rabelo *et al*, evaluaron la posibilidad de emplear la fracción líquida del pretratamiento y fracción sólida residual de la hidrólisis enzimática para la producción de biogás, fertilizante y energía [Rabelo *et al.*, 2011a]. De los pretratamientos empleados, peróxido de hidrógeno e hidróxido de calcio, se recuperó una fracción líquida con 30.7 %p/p y 32.1 %p/p de hemicelulosa, respectivamente. Para la celulosa, la recuperación en la fracción líquida fue de 3.8 %p/p para el pretratamiento con hidróxido de calcio y 2 %p/p para el pretratamiento con peróxido de hidrogeno. Por lo tanto, la concentración de azúcares en las fracciones líquidas empleadas para la obtención del inóculo y producción de biogás oscilaron entre 1.5 y 2.9 g/L para el hidróxido de calcio y, 7.6 a 21.8 g/L para peróxido de hidrógeno, dependiendo de la concentración de sólidos empleada. La producción de biogas osciló entre 24.5% a 52% respecto a la composición de todo el gas producido [Rabelo, 2010]. Al comparar la concentración de azúcares presentes en la fracción líquida del pretratamiento, en este trabajo se obtuvo una concentración total de 21.4 g/L, superior a la presente en la fracción líquida de los dos pretratamientos propuestos por Rabelo *et al*, además al determinar la relación másica de hemicelulosa respecto a celulosa, esta se encontró dentro del intervalo reportado, con un valor de 9.1 (concentración de xilosa, 19.28 g/L y concentración de glucosa, 2.10 g/L).

Las similitudes en composición de la fracción líquida residual del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido de *Panicum maximum* respecto a los mencionados anteriormente, abre la posibilidad de poder emplearse para la producción de biogás. Sin embargo, esta fracción residual también se puede emplear como fuente de sustrato para fermentación. Huang *et al*, estudiaron la producción de xilitol empleando como fuente de sustrato la fracción líquida de: un pretratamiento con ácido diluido de bagazo de caña, *silvergrass* (*Miscanthus floridulus*), pasto elefante y cascaras de piña, y un pretratamiento con explosión de vapor de rastrojo de arroz [Huang *et al.*, 2011]. El microorganismo empleado para la fermentación fue *Candida tropicalis*, JH030. En los ensayos se observó un rendimiento máximo de xilitol de 0.28 a 0.71 g xilitol/g sustrato con un consumo mínimo de xilosa de 96.8%. Teniendo en cuenta que: (1) el rendimiento promedio para los dos pastos evaluados fue 0.34 g xilitol/g sustrato y (2) la concentración de xilosa en la fracción líquida del pretratamiento con ácido diluido del *P. maximum* fue de 19.28 g/L al

utilizarse esta fracción como fuente de sustrato, se obtendría luego de la fermentación, una concentración promedio de 6.55 g/L de xilitol.

Otra de las opciones para aprovechar esta fracción líquida residual, consiste en incorporarla nuevamente al proceso en la etapa de fermentación. Para esto, se han realizado múltiples intentos de introducir genes heterólogos de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. De esta manera, la levadura es capaz de emplear la xilosa presente para la producción de etanol. Sin embargo, aún resulta un gran desafío eliminar la producción de xilitol como subproducto metabólico en condiciones anaerobias de fermentación. Los rendimientos de etanol y xilitol en estas cepas varían de 0.09 a 0.43 g etanol/g sustrato y 0.06 a 0.53 g xilitol/g sustrato. Simultáneamente al uso de xilosa en la fermentación por parte de *S. cerevisiae*, también se están desarrollando estrategias para introducir más genes que permitan al microorganismo emplear arabinosa, ácido galacturónico y ramnosa, como sustrato para la fermentación alcohólica. [Van Maris *et al.*, 2006].

Por otro lado, la fracción sólida residual de la hidrólisis enzimática se puede emplear para la producción de biogás en un proceso similar al mencionado anteriormente por la presencia de celulosa y hemicelulosa que no pudieron ser degradadas durante el pretratamiento y posterior hidrólisis. La fracción sólida posee un alto contenido de lignina que puede ser aprovechada para la producción de energía. Rabelo *et al.*, evaluaron la recuperación de lignina de la fracción líquida del pretratamiento junto con la fracción sólida de la hidrólisis enzimática, el contenido de humedad y entalpia. Estos residuos provinieron de la producción de etanol a partir de bagazo de caña de azúcar a través de dos pretratamientos, hidróxido de calcio y peróxido de hidrogeno [Rabelo, 2010]. Del pretratamiento con hidróxido de calcio, se logró recuperar 139 g lignina/kg bagazo con una humedad de 22.72%, una entalpia de 67.9 J/g y temperatura de 413.5°C, mientras que en el pretratamiento con peróxido de hidrogeno, se recuperaron 147 g lignina/kg bagazo con una humedad de 19.43%, entalpia de 52.5 J/g y temperatura de 400.6°C.

En la fracción sólida residual de la hidrólisis, la lignina es un componente mayoritario, más no el único. Por esto, algunos autores plantean como un desperdicio la quema de tan valioso material, al poderse aprovechar para obtener productos de mayor valor agregado. Hansen *et al.*, realizaron un análisis químico y estructural de los residuos

sólidos de un proceso industrial de obtención de etanol a partir de paja de trigo. Los residuos provenían del pretratamiento hidrotérmico y SFS [Hansen *et al.*, 2013]. Se encontró que la lignina tenía un 53% de carbono, 1.4% de nitrógeno, 2% glucosa, 1% xilosa y 1% manosa. Adicionalmente, el contenido de proteína cruda en la lignina, proveniente de las enzimas agregadas durante la hidrólisis junto con las células de levadura de la fermentación, representaba un tercio de la masa, por lo cual, esta podría ser empleada como alimento animal o recircularse al proceso. Del análisis elemental, se encontró 47900 µg/g de sílice en la lignina, la cual podría ser recuperada antes del proceso de combustión de lignina, en el caso que esta sea empleada para sistemas de cogeneración.

Parte del desarrollo de nuevos productos a partir de este residuo de la hidrólisis, como compuestos aromáticos o resinas epoxicas, va de la mano con la posibilidad de implementar a gran escala operaciones unitarias para la recuperación de lignina. Poursorkhabi *et al.*, estudiaron un sistema de extracción sólido-líquido con N,N-dimetilformamida (DMF) para la recuperación de la lignina presente en la fracción sólida residual de la hidrólisis enzimática de álamo pretratado con explosión de vapor [Poursorkhabi *et al.*, 2013]. Este residuo, también provino de un proceso industrial para la obtención de etanol. Con la extracción, se logró recuperar el 90% de lignina en la fracción líquida. Al realizar la determinación del peso molecular (GPC) y el análisis elemental de ambas fracciones, se encontró una fracción líquida con 63% de carbono y 1.9 de polidispersidad debido a la degradación sufrida en la estructura de la lignina durante el pretratamiento, mientras que en la fracción sólida residual de la extracción, la polidispersidad fue de 2.2 y el contenido de carbono, 48%, por la presencia de celulosa no hidrolizada, lignina con alto peso molecular y complejos lignina-carbohidratos provenientes de la biomasa. Cotana *et al.*, evaluaron una extracción sólido-líquido con diferentes tratamientos para recuperación de lignina en el residuo de una hidrolisis enzimática de caña común (*Arundo donax* L.) pretratada con explosión de vapor. Con el mejor tratamiento se logró recuperar el 73% de lignina con un 10% de degradación a 230°C [Cotana *et al.*, 2014].

El rendimiento global de celulosa de 0.423 g celulosa/g biomasa seca con un rendimiento de etanol de 75.24 mg etanol/g biomasa seca, para el mejor de los tratamientos de detoxificación, hidróxido de sodio, junto con un rendimiento global de celulosa de 0.580 g

celulosa/g biomasa seca con un rendimiento de etanol de 63.05 mg etanol/g biomasa seca, demuestran que las condiciones seleccionadas para las operaciones previas de pretratamiento e hidrólisis enzimática son adecuadas para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, además de demostrar el potencial de esta nueva biomasa, *P. maximum*, como posible cultivo energético.

Conclusiones

La biomasa lignocelulósica de pasto guinea (*Panicum maximum*) ecotipo CIAT 36000 con un tiempo de corte de 6 meses sembrado en Villavicencio (Colombia) presenta una composición (%p/p) de 28.4 % de celulosa, 19.3 % de hemicelulosa, 25.4 % de lignina y 8% de ceniza. Con una composición de 47.7 % de carbohidratos estructurales, el pasto *P. maximum* presenta un gran potencial para la producción de etanol, sin embargo se debe tener en cuenta el alto contenido de ceniza para la correcta selección del pretratamiento y sus condiciones de operación.

Cada una de las variables experimentales del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, presentaron un efecto sobre las variables de respuesta. La concentración de sólidos tuvo un efecto positivo para el rendimiento de celulosa, hemicelulosa y recuperación de sólidos pretratados, mientras que la concentración de ácido tuvo un efecto positivo sobre la conversión de celulosa a glucosa, evaluada en términos de digestibilidad de la biomasa pretratada.

Con un pretratamiento de ácido sulfúrico diluido a 1.5 %p/v y 12 %p/p de concentración de sólidos a 130 °C durante 60 minutos, se logró recuperar el 58% de sólidos con un rendimiento de celulosa y hemicelulosa de 0.951 y 0.354, respectivamente.

La dosis recomendada para una hidrólisis enzimática de *P. maximum* pretratado bajo las condiciones seleccionadas en este trabajo fue de 61.44 BHU/g para el complejo de celulasas (NS22086) y 1.77 CBU/g para β -glucosidasas (NS22118) con un rendimiento de conversión de celulosa a glucosa de 0.80 g celulosa/g biomasa pretratada seca, empleando una solución amortiguadora de citrato a pH 4.8, 48 horas y 50°C.

Con un sistema de lote alimentado (biomasa pretratada/enzimas) en una hidrólisis enzimática se logró alcanzar una concentración de biomasa pretratada de 20 %p/p con una concentración final de azúcares reductores de 66.79 g/L en un tiempo de 48 horas con una productividad de 1.40 g/L/h y un rendimiento de conversión de celulosa a glucosa de 0.61 g celulosa/g biomasa pretratada seca.

A pesar de no haberse detectado inhibidores de fermentación (HMF y furfural) en el hidrolizado de *P. maximum* y reducir en 27% la concentración inicial de glucosa, el hidrolizado detoxificado con hidróxido de sodio fue el de mayor concentración de etanol y productividad, con 19.43 g/L y 0.81 g/L/h, en 24 horas de fermentación. Adicionalmente, el rendimiento global de celulosa fue de 0.423 g celulosa/g biomasa seca, con un rendimiento de etanol de 75.24 mg etanol/g biomasa. Sin embargo, cuando no se realizó ninguno de los tratamientos de detoxificación el rendimiento global de celulosa fue el más elevado con 0.580 g celulosa/g biomasa seca, lo cual abre una alternativa al no uso de estos tratamientos para el proceso propuesto en este trabajo.

Recomendaciones

Caracterizar el *P. maximum* en diferentes épocas del año y determinar la influencia de factores bióticos y abióticos sobre la ceniza, lignina y carbohidratos totales, de esta manera se lograría seleccionar el mejor tiempo de corte del pasto, donde el contenido de celulosa sea el más elevado.

Evaluar la fracción líquida residual del pretratamiento ácido diluido para producción de xilitol o biogás al presentar una concentración de xilosa de 19.28 g/L y glucosa de 2.1 g/L, siendo factible su uso como fuente de sustrato para una la producción de otros bioproductos adicionales al etanol, incrementando la viabilidad técnico-económica del proceso.

Se debe identificar el efecto respecto a la concentración de sólidos, de otras variables del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido como tiempo de residencia y temperatura, sobre el rendimiento de celulosa y digestibilidad de la biomasa pretratada con el fin de buscar las condiciones más favorables del proceso para el *P. maximum*.

Determinar la presencia de inhibidores de fermentación en el agua de lavado de la biomasa pretratada.

En lo posible, emplear cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para caracterizar el contenido de azúcares (glucosa, xilosa y celobiosa principalmente) presentes en la hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos.

Realizar la hidrólisis enzimática tipo lote alimentado hasta alcanzar una alta concentración de sólidos en un sistema experimental más completo como un biorreactor para evaluar el efecto de la agitación y el tipo de impulsor sobre la concentración de

azúcares reductores y rendimiento de celulosa, con el fin de establecer una estrategia de escalado.

Caracterizar otros subproductos de la fermentación alcohólica como ácidos orgánicos y alcoholes superiores para definir otras posibles estrategias de intensificación de proceso.

Bibliografía

Agbor, A., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D., 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. 29, 675 – 685.

Aguilar, D., 2011. Producción de etanol a partir de bagazo de caña panelera mediante un sistema híbrido de fermentación y pervaporación. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 101, 4851 – 4861.

Andary, J., Maalouly, J., Ouaini, R., Chebib, H., Beyrouthy, M., Rutledge, D., Ouaini, N., 2013. Phenolic compounds from diluted acid hydrolysates of olive stones: effect of overliming. *Advances in Crop Science and Technology*. 1, 103, doi: 10.4172/2329-8863.1000103.

ASTM International. 2010. Standard Test Method for Carbon Black-Pellet Size Distribution – D1511 – 10.

ASTM International. 2011. Standard Terminology Relating to Biotechnology – E1705 – 11.

Avci, A., Saha, B., Kennedy, G., Cotta, M., 2013. High temperature dilute phosphoric acid pretreatment of corn stover for furfural and ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 50, 478 – 484.

Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy, Conversion and Management*. 52, 858 – 875.

Ballesteros, I., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M., Oliva, J., Sáez, F., 2008. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*. 42, 84 – 91.

Bals, B., Gunawan, C., Moore, J., Teymouri, F., Dale, B., 2014. Enzymatic hydrolysis of pelletized AFEXTM-treated corn stover at high solid loadings. *Biotechnology and Bioengineering*. Doi: 10.1002/bit.25022.

Banerjee, G., Car, S., Liu, T., Williams, D., Meza, S., Walton, J., Hodge, D., 2012. Scale-up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanolic fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 109, 922 – 931.

Batt, C., Carvallo, S., Easson, D., Akedo, M., Sinskey, A., 1985. Direct evidence for xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 28, 549 – 553.

Bekers, M., Vigants, A., Laukevics, J., Toma, M., Rapoport, A., 2000. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*. 36, 147 – 150.

Bernal, J., 1994. Parte III: Principales especies forrajeras utilizadas en Colombia. Capítulo 16: Gramíneas de clima cálido. *Pastos y Forrajes Tropicales – Producción y Manejo*, 3ra Edición. 323.

Cara, C., Moya, M., Ballesteros, I., Negro, M., González, A., Ruiz, E., 2007. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochemistry*. 42, 1003 – 1009.

Cardona, E., Rios, L., Peña, J., 2012. Disponibilidad de variedades de pastos y forrajes como potenciales materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol en Colombia. *Información Tecnológica*. 23, 87 – 06.

Cardona, E., Rios, J., Peña, J., Rios, L., 2013. Pretratamiento alcalino de pasto elefante (*Pennisetum sp.*) y king grass (*Pennisetum hybridum*) cultivados en Colombia para la producción de bioetanol. *Información Tecnológica*. 24, 69 – 80.

Cardona, E., Rios, J., Peña, J., Rios, L., 2014. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. *Fuel*. 118, 41 – 47.

Castro, E., Díaz, M., Cara, C., Ruiz, E., Romero, I., Moya, M., 2011. Dilute acid pretreatment of rapeseed straw for fermentable sugar generation. *Bioresource Technology*. 102, 1270 – 1276.

Chaganti, S., Kim, D., Lalman, J., Shewa, W., 2012. Statistical optimization of factors affecting biohydrogen production from xylose fermentation using inhibited mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 11710 – 11718.

Chandel, A., Chandrasekhar, G., Borges, M., Silvério, S., 2012. The realm of cellulases in biorefinery development. *Critical Reviews in Biotechnology*. 32, 187 – 202.

Cheng, Y., Zheng, Y., Wei, C., Dooley, T., Jenkins, B., VanderGheynst, J., 2010. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162, 1768 – 1784.

Chundawat, S., Beckham, G., Himmel, M., Dale, B., 2011. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2, 121 – 145.

Cotana, F., Cavalaglio, G., Nicolini, A., Gelosia, M., Coccia, V., Petrozzi, A., Brinchi, L., 2014. Lignin as co-product of second generation bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Energy Procedia*. 45, 52 – 60.

Eslahi, N., Dadashian, F., Hemmati, N., 2013. Optimization of enzymatic hydrolysis of wool fibers of nanoparticles production using response surface methodology. *Advanced Powder Technology*. 24, 416 – 426.

Esteghlalian, A., Hashimoto, A., Fenske, J., Penner, M., 1997. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technology*. 59, 129 – 136.

Faga, B., Wilkins, M., Banat, I., 2010. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D₅A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. *Bioresource Technology*. 101, 2273 – 2279.

Ferreira, S., Duarte, A., Ribeiro, M., Queiroz, J., Domingues, F., 2009. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistu ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*. 45, 192 – 200.

Ferreira-Leitão, V., Fortes, L., Ferrara, M., Nepomuceno, A., Correa, H., Bon, E., 2010. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. *Waste Biomass Valor*. 1, 65 – 76.

Fu, C., Mielenz, J., Xiao, X., Ge, Y., Hamilton, C., Rodriguez, M., Chen, F., Foston, M., Ragauskas, A., Bouton, J., Dixon, R., Wang, Z., 2011. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *PNAS*. Doi: 10.1073/pnas.1100310108.

Garlock, R., Balan, V., Dale, B., Ramesh, V., Lee, Y., Kim, Y., Mosier, N., Ladisch, M., Holtzapple, M., Falls, M., Sierra-Ramirez, R., Shi, J., Ebrik, M., Redmond, T., Yang, B., Wyman, C., Donohoe, B., Vinzant, T., Elander, R., Hames, B., Thomas, S., Warner, R., 2011. Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugars. *Bioresource Technology*. 102, 11063 – 11071.

Ghose, T., 1987. Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*. 59, 257 – 268.

Gutsch, J., Sixta, H., 2011. The HITAC-process (High Temperature Adsorption on Activated Charcoal) – new possibilities in autohydrolysate treatment. *Lenzinger Berichte*. 89, 142 – 151.

Hage, R., Chrusciel, L., Desharnais, L., Brosse, N., 2010. Effect of autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* on lignina structure and organosolv delignification. *Bioresource Technology*. 101, 9321 – 9329.

Hansen, M., Jorgensen, H., Laursen, K., Schjoerring, J., Felby, C., 2013. Structural and chemical analysis of process residue from biochemical conversion of wheat straw (*Triticum aestivum* L.) to ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 56, 572 – 581.

Hassan, A. 2012. Conversion of lignocellulosic material into fermentable sugars. Tesis de Doctorado. Universidad Tecnica de Berlin, Berlin, Alemania.

Hendriks, A., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 100, 10 – 18.

Hodge, D., Karim, M., Schell, D., McMillan, J., 2009a. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 152, 88 – 107.

Hodge, D., Andersson, C., Berglund, K., Rova, U., 2009b. Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolysates to succinic acid. *Enzyme and Microbial Technology*. 44, 309 – 316.

Horváth, I., Sjode, A., Alriksson, B., Jonsson, L., Nilvebrant, N., 2005. Critical conditions for improved fermentability during overliming of acid hydrolysates from spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 121 – 124, 1031 – 1044.

Huang, C., Jiang, Y., Guo, G., Hwang, W., 2011. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysates detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. *Bioresource Technology*. 102, 3322 – 3329.

Huang, R., Su, R., Qi, W., He, Z., 2011. Bioconversion of lignocellulose into bioethanol: process intensification and mechanism research. *Bioenergy Research*. 4, 225 – 245.

Ijijin, W., 1954. Relación entre suelo y composición química de las plantas forrajeras. *Agronomía Tropical*. 4, 193 – 213.

Jensen, J., Morinelly, J., Gossen, K., Brodeur-Campbell, M., Shonnard, D., 2010. Effects of dilute acid pretreatment conditions on enzymatic hydrolysis monomer and oligomer sugar yields for aspen, balsam, and switchgrass. *Bioresource Technology*. 101, 2317 – 2325.

Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., Julson, J., 2008. Influence of high shear bioreactor parameters on carbohydrate release from different biomasses. American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2008. ASABE 084114. ASABE, St. Joseph, Michigan, Estados Unidos.

Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N., Ladish, M., Bals, B., Balan, V., Dale, B., 2008. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers' grains at high-solids loading. *Bioresource Technology*. 99, 5206 – 5215.

Kumar, R., Wyman, C., 2009. Access of cellulase to cellulosa and lignin for poplar solids produced by leading pretreatment technologies. *Biotechnology Progress*. 25, 807 – 819.

Larsen, J., Ostergaard, M., Thirup, L., Wen, H., Krogh, F., 2008. The IBUS process – Lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality. *Chemical Engineering & Technology*. 31, 765 – 772.

Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N., Jonsson, L., 1999. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 77-79, 91 – 103.

Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H., Auer, M., Vogel, K., Simmons, B., Singh, S., 2010. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*. 101, 4900 – 4906.

Li, H., Li, C., Sang, T., Xu, J., 2013. Pretreatment on *Miscanthus lutarioriparius* by liquid hot water for efficient ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*. 6, 76.

Lin, T., Huang, C., Guo, G., Hwang, W., Huang, S., 2012. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*. 116, 314 – 319.

Lu, Y., Wang, Y., Xu, G., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S., 2010. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160, 360 – 369.

Mateus, L., 2011. Evaluación de los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido y AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante "*Pennisetum Sp*". Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Mateus, L., Hernández, O., Velásquez, M., Díaz, J., 2012. Evaluación del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido del pasto maralfalfa (*Pennisetum glaucum x Pennisetum purpureum*) para la producción de etanol. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14, 146 – 156.

McMeekin, T., Olley, J., Ratkowsky, D., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*. 73, 395 – 407.

Millati, R., Niklasson, C., Taherzadeh, M., 2002. Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolysates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. 38, 515 – 522.

Miyafuji, H., Danner, H., Neureiter, M., Thomasser, C., Bvochora, J., Szolar, O., Braun, R., 2003. Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*. 32, 396 – 400.

Modenbach, A., Nokes, S., 2013. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. *Biomass & Bioenergy*. 56, 526 – 544.

Montgomery, D., 2004. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Limusa, S.A. de C.V., Mexico, D.F., Mexico.

Monsalve, J., Medina, V., Ruíz, A., 2006. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. *Dyna – Revista Facultad de Minas*. 73, 21 – 27.

Morales, D., Velasquez, M., 2013. Laccases production by *Pleurotus ostreatus* grown on grass *Panicum maximum*. 2013 AIChE Annual Meeting Conference Proceeding.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 96, 673 – 686.

Murnen, H., Balan, V., Chundawat, S., Bals, B., Sousa, L., Dale, B., 2007. Optimization of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus giganteus* to fermentable sugars. *Biotechnology Progress*. 23, 846 – 850.

Nigam, J., 2000. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *Journal of Biotechnology*. 80, 189 – 193.

Pallapolu, V., Lee, Y., Garlock, R., Balan, V., Dale, B., Kim, Y., Mosier, N., Ladisch, M., Falls, M., Holtzapple, M., Sierra-Ramirez, R., Shi, J., Ebrik, M., Redmond, T., Yang, B., Wyman, C., Donohoe, B., Vinzant, T., Elander, R., Hames, B., Thomas, S., Warner, R., 2011. Effects of enzyme loading and β -glucosidase supplementation on enzymatic hydrolysis of switchgrass processed by leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 102, 11115 – 11120.

Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 74, 17 – 24.

Peng, F., Peng, P., Xu, F., Sun, R., 2012. Fractional purification and bioconversion of hemicellulose. *Biotechnology Advances*. 30, 879 – 903.

Pienkos, P., Zhang, M., 2009. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*. 16, 743 – 762.

Piñeros-Castro, Y., Velásquez-Lozano, M., 2014. Biodegradation kinetics of oil palm empty fruit bunches by White rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 91, 24 – 28.

Pitman, R., 2006. Wood ash use in forestry – a review of the environmental impacts. *Forestry*. 79, 563 – 588.

Poursorkhabi, V., Misra, M., Mohanty, A., 2013. Extraction of lignin from a coproduct of the cellulosic ethanol industry and its termal characterization. *BioResources*. 8, 5083 – 5101.

Proexport – Promoción de turismo, inversión y exportaciones., 2012. Perfil sectorial – Biocombustibles. (Consultado en: <http://www.proexport.com.co/sites/default/files/Perfil%20Sectorial%20Biocombustibles.pdf> Visitado 10-06-2013)

Quevedo, B., 2011. Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Quevedo-Hidalgo, B., Monsalve-Marín, F., Narváez-Rincón, P.C., Pedroza-Rodríguez, A.M., Velásquez-Lozano, M.E., 2013. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* using lignocellulosic hydrolysates from *Chrysanthemum* waste degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29, 459 – 466.

Quintero, A., Cardona, C., Paz, I., 2010. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technology*. 101, 4754 – 4766.

Rabelo, S., 2010. Evaluation and optimization of pretreatments and enzymatic hydrolysis of the sugarcane bagasse for second generation ethanol production. Tesis de Doctorado. Universidad Estatal de Campinas, Campinas, Brasil.

Rabelo, S., Carrere, H., Maciel, R., Costa, A., 2011a. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 102, 7887 – 7895.

Rabelo, S., Amezquita, N., Andrade, R., Maciel, R., Costa, A., 2011b. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*. 35, 2600 – 2607.

Rangel, S., 2012. Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Ray, A., Hoover, A., Nagle, N., Chen, X., Gresham, G., 2013. Effect of pelleting on the recalcitrance and bioconversion of dilute-acid pretreated corn stover under low- and high solids conditions. *Biofuels*. 4, 217 – 284.

Risio, S., Hu, C., Saville, B., Liao, D., Fortie, J., 2011. Large-scale, high-solids enzymatic hydrolysis of steam-exploded poplar. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. 5, 609 – 620.

Rodrigues, R., Felipe, M., Almeida e Silva, J., Gómez, P., 2001. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 18, 299 – 311.

Rojas, C., 2011. Evaluación de pre-tratamientos biológicos y térmicos previos a la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma, para la producción de azúcares fermentables. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Rosgaard, L., 2007a. Enzymatic hydrolysis of pretreated barley and wheat straw. Tesis de Doctorado. Universidad Tecnológica de Dinamarca, Lyngby, Dinamarca.

Rosgaard, L., Andric, P., Dam, K., Pedersen, S., Meyer, A., 2007b. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 143, 27 – 40.

Sánchez, A., Gutiérrez, A., Muñoz, J., Rivera, C., 2010. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*. 5, 61 – 91.

Saqib, A., Whitney, P., 2011. Differential behavior of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*. 35, 4748 – 4750.

Schell, D., Walter, P., Johnson, D., 1992. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover at high solids concentrations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 34-35, 659 – 665.

Schell, D., Farmer, J., Newman, M., McMillan, J., 2003. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 105-108, 69 – 85.

Sharma, S., Karla, K., Kocher, G., 2004. Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunflower hulls for ethanol production and its scale-up. *Biomass & Bioenergy*. 27, 399 – 402.

Singh, A., Bishnoi, N., 2013. Ethanol production from pretreated wheat straw hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* via sequential statistical optimization. *Industrial Crops and Products*. 41, 221 – 226.

Singhania, R., Kumar, A., Sukumaran, R., Larroche, C., Pandey, A., 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 127, 500 – 507.

Sluiter, A.D., Hames, B.R., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, J.B., Templeton, D.W., 2008a. Determination of ash in biomass: laboratory analytical procedure (LAP). NREL/TP-510-42622. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.

Sluiter, A.D., Hames, B.R., Ruiz, R.O., Scarlata, C., Sluiter, J.B., Templeton, D.W., Crocker, D., 2008b. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: laboratory analytical procedure (LAP). NREL/TP-510-42618. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.

Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Wolfe, J., 2008c. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process: laboratory analytical procedure (LAP). NREL/TP-510-42621. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.

Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83, 1 – 11.

Sun, Y., Cheng, J., 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*. 96, 1599 – 1606.

Taherzadeh, M., Niklasson, C., Lidén, G., 1999. Conversion of dilute-acid hydrolysates of spruce and birch to ethanol by fed-batch fermentation. *Bioresource Technology*. 69, 59 – 66.

Takacs, E., Wojnarovits, L., Foldvary, C., Hargittai, P., Borsa, J., Sajo, I., 2000. Effect of combined gamma-irradiation and alkali treatment on cotton-cellulose. *Radiation Physics and Chemistry*. 57, 399 – 403.

Tejeda, L., Tejada, C., Villabona, A., Alvear, M., Castillo, C., Henao, D., Marimón, W., Madariaga, N., Tarón, A., 2010. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería*. 10, 120 – 125.

Tewari, H., Marwaha, S., Kennedy, J., Singh, L., 1987. Acid and enzymatic saccharification of agricultural mixed polymers for alcohol production. *British Polymer Journal*. 19, 425 – 428.

Triana, C., 2010. Producción de bioetanol a partir de residuos provenientes del cultivo de café. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.

Ugarte, C., 2012. Ecofisiología de plantas forrajeras. *Voces y Ecos*. 27, 37 – 42.

USDA – GAIN Report., 2013. Colombia Biofuels Annual Report. (Consultado en: http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Biofuels%20Annual_Bogota_Colombia_6-28-2013.pdf Visitado 20-04-2014).

Van Maris, A., Abbott, D., Bellissimi, E., Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M., Wisselink, H., Scheffers, W., Dijken, J., Pronk, J., 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 90, 391 – 418.

Walker, G., 1998. Chapter 3: Yeast nutrition. *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, New York, Estados Unidos.

Wang, B., Feng, H., 2010. Chapter 11: Detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Biofuels from Agricultural Wastes and Byproducts*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, Estados Unidos.

Wang, L., Templer, R., Murphy, R., 2012. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. *Applied Energy*. 99, 23 – 31.

Wei, T., 2013. Impact of pretreatment methods on enzymatic hydrolysis of softwood. Tesis de Maestría. Universidad de Toronto, Toronto, Canada.

Wood, I., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I., Waldron, K., 2012. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*. 44, 117 – 121.

Wyman, C., 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *TRENDS in Biotechnology*. 25, 153 – 157.

Wyman, C., Balan, V., Dale, B., Elander, R., Falls, M., Hames, B., Holtzapple, M., Ladisch, M., Lee, Y., Mosier, N., Pallapolu, V., Shi, J., Thomas, S., Warner, R., 2011. Comparative data on effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different switchgrass sources. *Bioresource Technology*. 102, 11052 – 11062.

Xiao, W., Yin, W., Xia, S., Ma, P., 2012. The study factors affecting the enzymatic hydrolysis of cellulose after ionic liquid pretreatment. *Carbohydrate Polymers*. 87, 2019 – 2023.

Yang, B., Montgomery, R., 1996. Alkaline degradation of glucose: effect of initial concentration of reactants. *Carbohydrate Research*. 280, 27 – 45.

Yang, M., Li, W., Liu, B., Li, Q., Xing, J., 2010. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process. *Bioresource Technology*. 101, 4884 – 4888.

Yang, B., Dai, Z., Ding, S., Wyman, C., 2011a. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*. 2, 421 – 450.

Yang, J., Zhang, X., Yong, Q., Yu, S., 2011b. Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. *Bioresource Technology*. 102, 4905 – 4908.

Yee, K., Rodriguez, M., Tschaplinski, T., Engle, N., Martin, M., Fu, C., Wang, Z., Hamilton-Brehm, S., Mielenz, J., 2012. Evaluation of the bioconversion of genetically modified switchgrass using simultaneous saccharification and fermentation and a consolidated bioprocessing approach. *Biotechnology for Biofuels*. 5, 81.

Zhang, Y., Hong, J., Ye, X., 2009. *Cellulase Assays*. *Biofuels: Methods and Protocols*. Editorial Springer Human Press, New York, New York, Estados Unidos.

Zhao, X., Dong, L., Chen, L., Liu, D., 2012. Batch and multi-step fed-batch enzymatic saccharification of Formiline-pretreated sugarcane bagasse at high solid loading for high sugar and ethanol titers. *Bioresource Technology*. 135, 350 – 356.

Zhu, Y., Lee, Y., Elander, R., 2005. Optimization of dilute-acid pretreatment of corn stover using a high-solids percolation reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 121-124, 1045 – 1054.

A. Anexo: Determinación del porcentaje de humedad

Para la determinación del porcentaje de humedad en la biomasa se utilizó como guía el reporte técnico NREL/TP-510-42621 publicado por el *National Renewable Energy Laboratory* – NREL.

La biomasa se colocó en un horno a 105°C hasta conseguir un peso constante. Para el cálculo de la humedad se empleó la **Ecuación (A.1)**:

$$\%Humedad = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \times 100 \quad (A.1)$$

Donde:

m_1 = Masa inicial de la muestra (g)

m_2 = Masa final de la muestra (g)

B. Anexo: Determinación de carbohidratos estructurales y lignina

Para la determinación del porcentaje de extractos en la biomasa se utilizó como guía el reporte técnico NREL/TP-510-42618 publicado por el *National Renewable Energy Laboratory* – NREL. Ver **Figura B-1**.

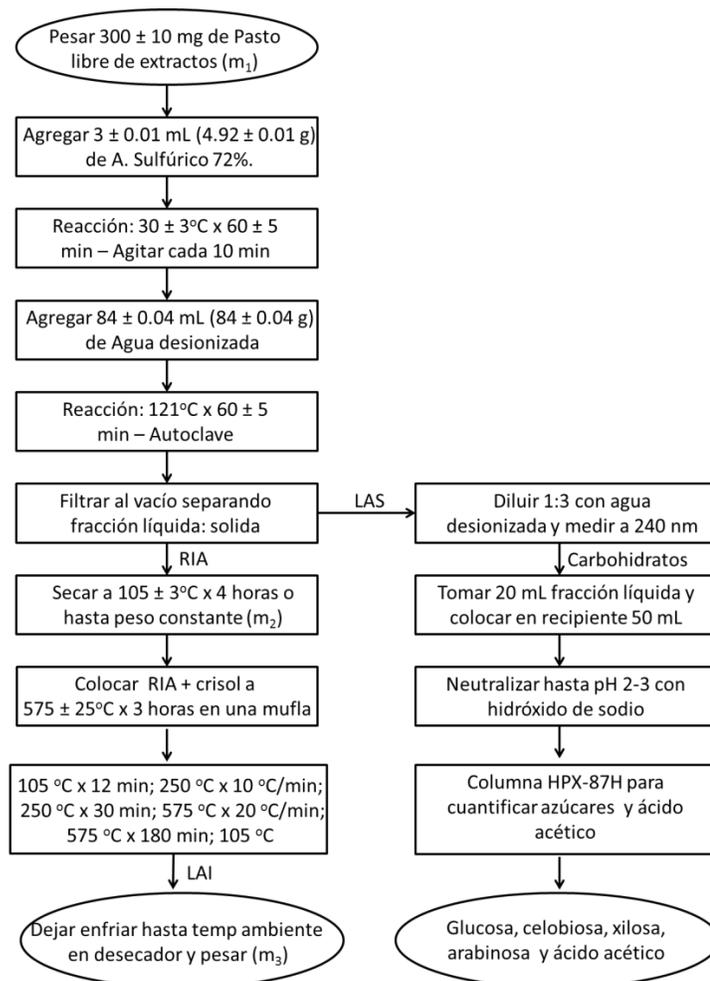


Figura B-1: Diagrama de flujo para la determinación de carbohidratos estructurales y lignina.

El cálculo de la lignina ácida soluble (LAS) se realizó empleando la **Ecuación (B.1)**:

$$\%LAS = \frac{UVabs \times Volumen\ de\ filtrado \times dilución}{\varepsilon \times m_1 \times haz\ de\ luz} \times 100 \quad (B.1)$$

Donde:

$UVabs$ = Absorbancia a 240 nm (UA)

$Volumen\ de\ filtrado$ = 0.087 L

$Dilución$ = 3

ε = 110 L/g cm

m_1 = Masa inicial de la muestra (g)

$haz\ de\ luz$ = 0.5 cm

El cálculo del residuo ácido insoluble (RAI) se realizó empleando la **Ecuación (B.2)**:

$$\%RAI = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \times 100 \quad (B.2)$$

Donde:

m_1 = Masa inicial de la muestra (g)

m_2 = Masa residual luego de la hidrólisis ácida (g)

El cálculo de la lignina ácida insoluble (LAI) se realizó empleando la **Ecuación (B.3)**:

$$\%LAI = \left(\frac{m_2 - m_3}{m_1} \right) \times 100 \quad (B.3)$$

Donde:

m_1 = Masa inicial de la muestra (g)

m_2 = Masa residual luego de la hidrólisis ácida (g)

m_3 = Masa residual luego de la mufla (g)

Para la cuantificación de carbohidratos (glucosa y xilosa) se empleó cromatografía líquida de alta eficiencia aplicando la técnica descrita en el **Anexo D**.

C. Anexo: Determinación del porcentaje de cenizas

Para la determinación del porcentaje de ceniza en la biomasa se utilizó como guía el reporte técnico NREL/TP-510-42622 publicado por el *National Renewable Energy Laboratory* – NREL. Ver **Figura C-1**.

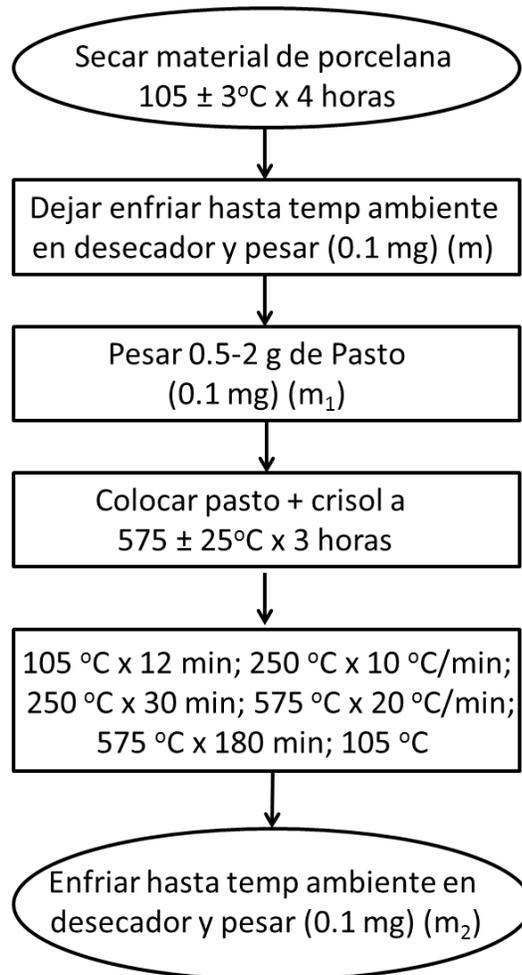


Figura C-1: Diagrama de flujo para la determinación del porcentaje de ceniza.

El cálculo del porcentaje de ceniza se realizó empleando la **Ecuación (C.1)**:

$$\%Ceniza = \left(\frac{m_2 - m}{m_1} \right) \times 100 \quad (C.1)$$

Donde:

m_1 = Masa inicial de la muestra (g)

m_2 = Masa ceniza más crisol (g)

m = Masa del crisol seco (g)

D. Anexo: Curvas de calibración para los métodos analíticos por HPLC

Para la cuantificación de azúcares (glucosa y xilosa) se empleó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) bajo las siguientes condiciones:

Columna: Sugar SC1011

Fase móvil: Agua desionizada

Flujo: 0.8 mL/min

Temperatura del horno: 80°C

Detector de índice de refracción (IR) a una temperatura de 40°C

Tiempo de corrida: 25 minutos

En primera medida, se prepararon dos soluciones patrón y una mezcla de azúcares para verificar la detección, separación y tiempos de retención. Cada patrón y mezcla se corrieron por triplicado en el HPLC, obteniéndose los siguientes valores:

Tabla D-1: Pruebas iniciales para detección de azúcares en HPLC.

Muestra	Azúcar	Concentración (g/L)	Tiempo de retención (min)	Coefficiente de variación (%CV)
1	Glucosa	1.034	9.230 ± 0.003	0.038
2	Xilosa	1.026	9.960 ± 0.002	0.020
3	Glucosa	0.517	9.230 ± 0.000	0.000
	Xilosa	0.513	9.937 ± 0.002	0.019

Con el análisis de las mezclas se corroboró el tiempo de retención para la glucosa en 9.230 min y para la xilosa en 9.960 min. Para realizar las curvas de calibración de preparó una solución *stock* por cada azúcar de 30 g/L para la glucosa y 9 g/L para la

xilosa. De estas soluciones se realizaron diluciones consecutivas hasta obtener el valor de 0.5 g/L para la glucosa y 0.1 g/L para la xilosa. Con los datos obtenidos, se realizó un ajuste de cada curva de calibración mediante el análisis de datos por regresión en Microsoft Excel ®. En ambos azúcares, la regresión lineal presentó un coeficiente de correlación cercano a la unidad, demostrado el buen ajuste de los datos y la capacidad de reflejar el valor de la concentración real.

Curva de Calibración de Glucosa. Para la curva de calibración de glucosa se manejaron concentraciones de 30, 20, 10, 5, 1 y 0.5 g/L.

Tabla D-2: Valores de área respecto la concentración de glucosa.

Curva Calibración Glucosa			
Tiempo de Retención (min)	Concentración (g/L)	Área (μRIU*min)	Altura (μRIU)
9.230	0.5	0.9167	2.33
9.231	0.5	0.9171	2.36
9.230	0.5	0.9176	2.38
9.230	1	1.7314	4.49
9.232	1	1.7304	4.46
9.231	1	1.7316	4.50
9.230	5	9.1507	23.74
9.232	5	9.1503	23.72
9.232	5	9.1501	23.71
9.217	10	18.4148	47.65
9.214	10	18.4150	47.69
9.218	10	18.4145	47.62
9.233	20	36.4536	94.35
9.236	20	36.4541	94.38
9.230	20	36.4540	94.37
9.238	30	54.1210	139.96
9.240	30	54.1215	139.99
9.303	30	54.1213	139.97

Por cada repetición se logró construir tres curvas de calibración de la forma $y=mx+b$:

$$y = 0.5531X - 0.0507 \quad r^2 = 0.9999$$

$$y = 0.5531X - 0.0505 \quad r^2 = 0.9999$$

$$y = 0.5531X - 0.0507 \quad r^2 = 0.9999$$

De las tres curvas, se obtiene una curva de calibración promedio:

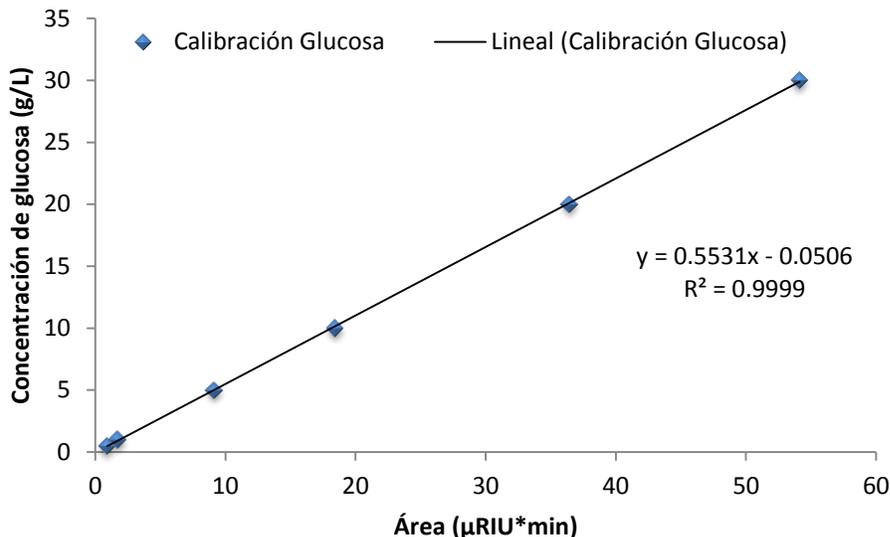


Figura D-1: Curva de calibración de glucosa.

A continuación se presenta el análisis por regresión realizado en Microsoft Excel ®:

Tabla D-3: Análisis estadístico para la regresión lineal de glucosa.

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple	0.99996024					
Coefficiente de determinación R ²	0.99992047					
R ² ajustado	0.9999155					
Error típico	0.10137589					
Observaciones	18					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	2067.46057	2067.46057	201172.156	3.1423E-34	
Residuos	16	0.16443314	0.01027707			
Total	17	2067.625				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	-0.0506296	0.0344552	-1.4694322	0.16110382	-0.1236714	0.02241219
Variable X 1	0.55306375	0.0012330	448.522192	3.1423E-34	0.55044974	0.55567776

Curva de Calibración de Xilosa. Para la curva de calibración de xilosa se manejaron concentraciones de 9, 7, 5, 3, 1, 0.5 y 0.1 g/L.

Tabla D-4: Valores de área respecto la concentración de xilosa.

Curva Calibración Xilosa			
Tiempo de Retención (min)	Concentración (g/L)	Área (μRIU*min)	Altura (μRIU)
9.937	0.1	0.2328	0.64
9.940	0.1	0.2332	0.67
9.935	0.1	0.2325	0.61
9.963	0.5	0.8525	2.40
9.962	0.5	0.8523	2.37
9.963	0.5	0.8516	2.33
9.960	1	1.8894	5.15
9.959	1	1.8901	5.18
9.961	1	1.8898	5.16
9.965	3	5.4857	14.99
9.964	3	5.4853	14.95
9.965	3	5.4849	14.93
9.965	5	9.1788	24.97
9.967	5	9.1795	25.00
9.964	5	9.1790	24.98
9.963	7	12.9174	35.15
9.964	7	12.9180	35.19
9.920	7	12.9178	35.16
9.965	9	16.4486	44.75
9.963	9	16.4491	44.79
9.966	9	16.4488	44.76

Por cada repetición se logró construir tres curvas de calibración de la forma $y=mx+b$:

$$y = 0.5458X - 0.0078 \quad r^2 = 0.9999$$

$$y = 0.5458X - 0.0079 \quad r^2 = 0.9999$$

$$y = 0.5458X - 0.0076 \quad r^2 = 0.9999$$

De las tres curvas, se obtiene una curva de calibración promedio:

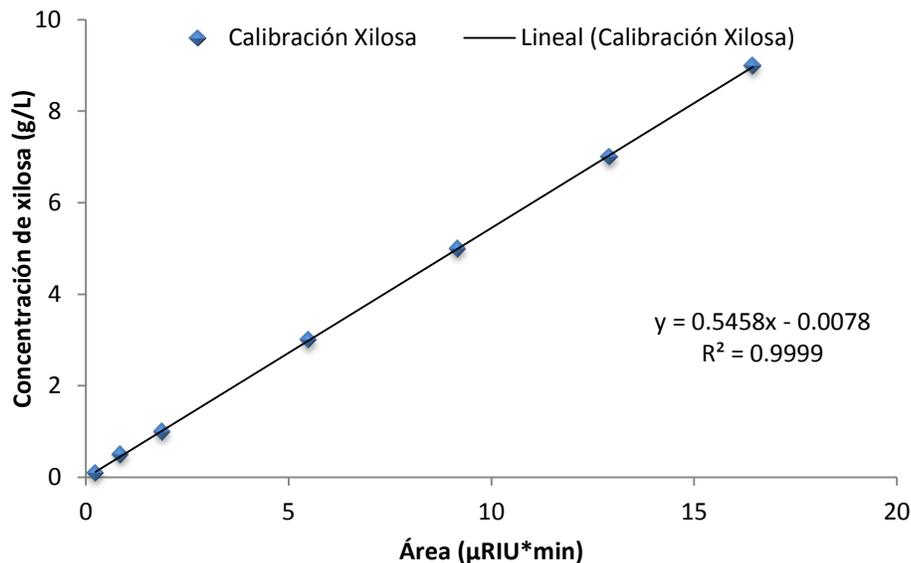


Figura D-2. Curva de calibración de xilosa.

A continuación se presenta el análisis por regresión realizado en Microsoft Excel ®:

Tabla D-5: Análisis estadístico para la regresión lineal de xilosa.

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple	0.99996037					
Coefficiente de determinación R ²	0.99992075					
R ² ajustado	0.99991658					
Error típico	0.02994002					
Observaciones	21					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	214.894397	214.894397	239729.194	1.9831E-40	
Residuos	19	0.01703169	0.0008964			
Total	20	214.911429				
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	-0.00778124	0.00993	-0.7831739	0.44317823	-0.0285	0.013014
Variable X 1	0.54577357	0.00111	489.62148	1.9831E-40	0.54344	0.548106

Para la cuantificación de etanol y glicerol se empleó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) bajo las siguientes condiciones:

Columna: Biorad Aminex HPX-87H

Fase móvil: 5 mM Ácido sulfúrico

Flujo: 0.6 mL/min

Temperatura del horno: 65°C

Detector de índice de refracción (IR) a una temperatura de 40°C

Tiempo de corrida: 25 minutos

Curva de Calibración de Etanol. Para la curva de calibración de etanol se manejaron concentraciones de 40, 30, 25, 20, 10 y 5 g/L. Cada concentración se preparó de forma independiente.

Tabla D-6: Valores de área respecto la concentración de etanol.

Curva Calibración Etanol				
Tiempo de Retención (min)	Concentración Teórica (g/L)	Concentración Real (g/L)	Área (μRIU*min)	Altura (μRIU)
21.990	5	6.11	12.1530	25.90
21.987	5	6.11	12.1535	25.92
21.945	5	6.11	12.1529	25.89
21.985	10	10.12	19.6293	40.70
21.991	10	10.12	19.6292	40.69
21.986	10	10.12	19.6296	40.73
21.990	20	19.88	39.4213	71.61
21.978	20	19.88	39.4210	71.58
21.983	20	19.88	39.4220	71.65
21.987	25	25.48	48.9958	87.28
21.991	25	25.48	48.9962	87.34
21.985	25	25.48	48.9954	87.25
21.968	30	30.26	60.0418	103.32
21.976	30	30.26	60.0415	103.26
21.963	30	30.26	60.0420	103.35
21.933	40	42.09	83.8267	137.51
21.924	40	42.09	83.8271	137.56
21.927	40	42.09	83.8265	137.48

Por cada repetición se logró construir tres curvas de calibración de la forma $y=mx+b$:

$$\begin{aligned} y &= 0.5019X + 0.2361 & r^2 &= 0.9994 \\ y &= 0.5018X + 0.2362 & r^2 &= 0.9994 \\ y &= 0.5019X + 0.2362 & r^2 &= 0.9994 \end{aligned}$$

De las tres curvas, se obtiene una curva de calibración promedio:

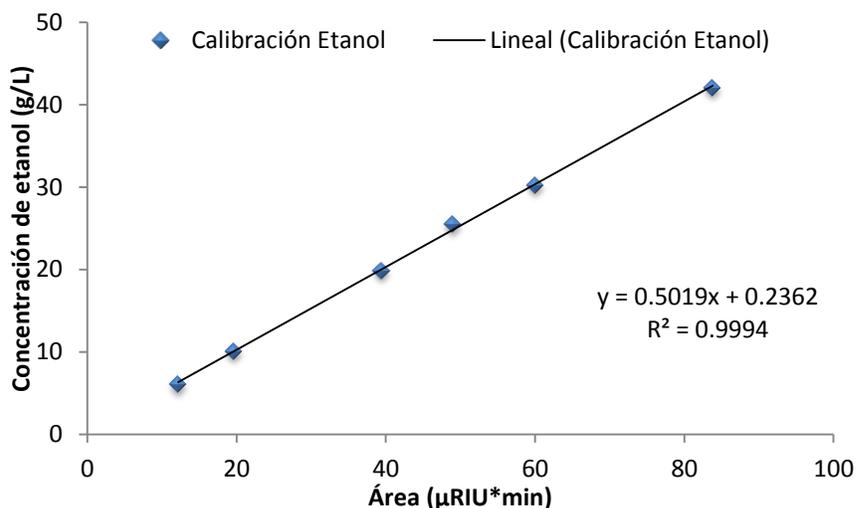


Figura D-3: Curva de calibración de etanol.

A continuación se presenta el análisis por regresión realizado en Microsoft Excel ®:

Tabla D-7: Análisis estadístico para la regresión lineal de etanol.

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple	0.99968313					
Coefficiente de determinación R ²	0.99936636					
R ² ajustado	0.99932676					
Error típico	0.32360631					
Observaciones	18					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	2642.64366	2642.64366	25235.0769	5.1044E-27	
Residuos	16	1.67553674	0.10472105			
Total	17	2644.3192				
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	0.23617925	0.1585867	1.48927499	0.15586157	-0.1000096	0.57236811
Variable X 1	0.501851	0.0031591	158.855522	5.1044E-27	0.49515387	0.50854814

Curva de Calibración de Glicerol. Para la curva de calibración de glicerol se manejaron concentraciones de 4, 3, 2, 1, 0.5 y 0.1 g/L.

Tabla D-8: Valores de área respecto la concentración de glicerol.

Curva Calibración Glicerol				
Tiempo de Retención (min)	Concentración Teórica (g/L)	Concentración Real (g/L)	Área (μ RIU*min)	Altura (μ RIU)
13.502	0.1	0.1	0.3666	1.30
13.503	0.1	0.1	0.3663	1.27
13.506	0.1	0.1	0.3670	1.35
13.488	0.5	0.5	2.0026	6.56
13.490	0.5	0.5	2.0033	6.60
13.487	0.5	0.5	2.0022	6.52
13.507	1	1.01	3.9855	13.06
13.510	1	1.01	3.9860	13.11
13.505	1	1.01	3.9851	13.02
13.510	2	2.01	8.0583	26.11
13.512	2	2.01	8.0587	26.16
13.510	2	2.01	8.0585	26.13
13.512	3	3.02	12.0921	39.18
13.513	3	3.02	12.0926	39.23
13.510	3	3.02	12.0922	39.19
13.488	4	4.03	16.0439	52.25
13.492	4	4.03	16.0441	52.26
13.490	4	4.03	16.0438	52.23

Por cada repetición se logró construir tres curvas de calibración de la forma $y=mx+b$:

$$y = 0.2503X + 0.0034 \quad r^2 = 0.9999$$

$$y = 0.2503X + 0.0033 \quad r^2 = 0.9999$$

$$y = 0.2503X + 0.0034 \quad r^2 = 0.9999$$

De las tres curvas, se obtiene una curva de calibración promedio:

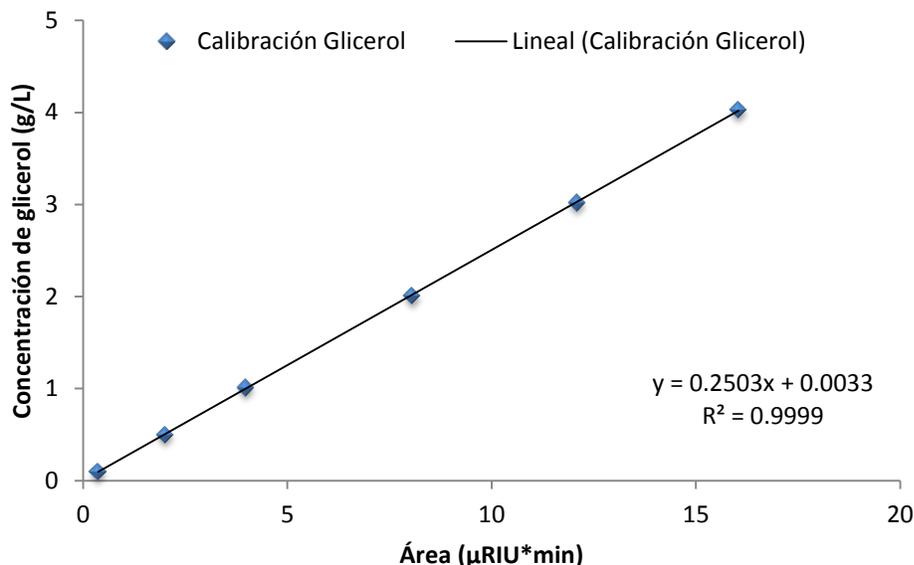


Figura D-4: Curva de calibración de glicerol.

A continuación se presenta el análisis por regresión realizado en Microsoft Excel®:

Tabla D-9: Análisis estadístico para la regresión lineal de glicerol.

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple	0.99998059					
Coefficiente de determinación R ²	0.99996119					
R ² ajustado	0.99995876					
Error típico	0.00923029					
Observaciones	18					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	35.1186868	35.1186868	412199.953	1.0117E-36	
Residuos	16	0.00136317	8.5198E-05			
Total	17	35.12005				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	0.00332935	0.0035180	0.94636131	0.3580386	-0.0041285	0.01078729
Variable X 1	0.25029669	0.0003898	642.028	1.0117E-36	0.24947023	0.25112314

E. Anexo: Curvas de calibración para azúcares reductores por método DNS

Para elaborar la curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores por el método colorimétrico DNS se prepararon las concentraciones 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 g/L, realizando las diluciones descritas en el texto y midiendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Genesys 10uv® (Thermo Scientific, Waltham, MA). La absorbancia de cada concentración se obtuvo por triplicado.

Tabla E-1: Valores de absorbancia de las diferentes concentraciones de glucosa.

Curva Calibración Azúcares Reductores	
Concentración de Glucosa (g/L)	Abs @ 540 nm (UA)
0.1	0.060
0.1	0.074
0.1	0.071
0.2	0.171
0.2	0.167
0.2	0.167
0.3	0.245
0.3	0.282
0.3	0.278
0.4	0.352
0.4	0.376
0.4	0.411
0.5	0.463
0.5	0.494
0.5	0.471
0.6	0.585
0.6	0.581
0.6	0.570

Por cada repetición se logró construir tres curvas de calibración de la forma $y=mx+b$:

$$\begin{array}{ll} y = 0.9657X + 0.0480 & r^2 = 0.9955 \\ y = 0.9683X + 0.0314 & r^2 = 0.9987 \\ y = 0.9813X + 0.0281 & r^2 = 0.9925 \end{array}$$

De las tres curvas, se obtiene una curva de calibración promedio:

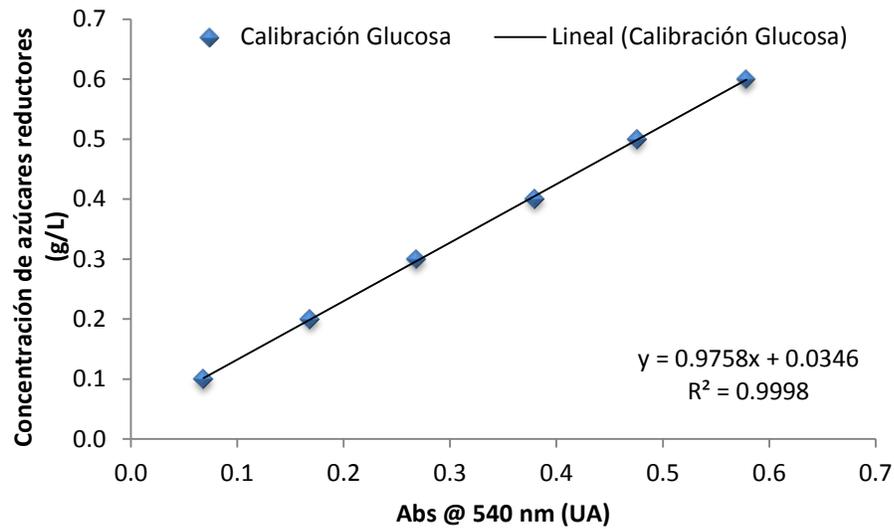


Figura E-1: Curva de calibración de azúcares reductores.

A continuación se presenta el análisis por regresión realizado en Microsoft Excel ®:

Tabla E-2: Análisis estadístico para la regresión lineal de azúcares reductores.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0.99685932
Coeficiente de determinación R ²	0.99372851
R ² ajustado	0.99333654
Error típico	0.01434515
Observaciones	18

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.52170747	0.52170747	2535.2264	4.7128E-19
Residuos	16	0.00329253	0.00020578		
Total	17	0.525			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	0.03650781	0.00708499	5.15283669	9.6282E-05	0.0214883	0.05152733
Variable X 1	0.96989676	0.0192627	50.3510318	4.7128E-19	0.92906166	1.01073185