

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Determinación de azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación por HPLC en un proceso de obtención de etanol lignocelulósico.

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Químicas, mención Química Analítica.

MARÍA GENOVEVA GRANDA ALBUJA

Quito, 2011

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, mención Química Analítica, de la candidata María Genoveva Granda Albuja ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha: 13 de diciembre de 2011

Dr. Javier Carvajal Barriga

Director de la Disertación

A ti mi pequeño Nico y a mi querida Bachi!!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por darme la vida y la sabiduría para poder culminar con éxitos mis estudios.

A mi padre Kléber Granda quien es mi inspiración para seguir adelante y mi apoyo en todo momento, a mi madre Genoveva por su inmenso amor y sus consejos, a mi abuelito y mi tía por su cariño y apoyo incondicional, a mi abuelita que se que desde el cielo me manda todas sus bendiciones y su amor, a mi hermana Silvana por ser mi mejor amiga, eres muy importante en mi vida, a mi cuñado Christian por toda su ayuda.

A Fernando, quien me da su amor sincero día a día y no me ha dejado caer ante ninguna adversidad que se me ha presentado en el camino. Lo logre hermoso!

Al Doctor Javier Carvajal quien fui mi guía para realizar y culminar con éxitos esta disertación.

Al Doctor Ramiro Gallegos y a la Licenciada Carlota Córdova quienes me ayudaron con sus consejos y sabiduría a culminar con este trabajo de disertación.

Al Centro Neotropical para la investigación de Biomasa y a todos mis compañeros en especial a Michael, Sebastián, Patricia, Edgar, Doyle, Fernanda, Bernardo, Karina y Carolina por todo su apoyo.

Al Ing. Alexis Arias por su colaboración durante la elaboración de esta disertación.

Al Licenciado Ramiro Merino por su apoyo a lo largo de la carrera.

A mis amigos César, José Luis, Freddy, Vanessa y Paúl por su amistad sincera. De corazón los quiero a todos.

TABLA DE CONTENIDOS

PRELIMINARES

LISTA DE TABLAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE ANEXOS.....	XVII
RESUMEN.....	XIX
ABSTRACT.....	XXI
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1.PARTE TEÓRICA.....	3
1.1.BIOMASA.....	3
1.1.1 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	4
1.1.2 CELULOSA.....	5
1.1.3 HEMICELULOSA.....	6
1.1.4 LIGNINA.....	7

1.1.5	PECTINA.....	8
1.2.	ETANOL COMBUSTIBLE DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	9
1.2.1	PRODUCCIÓN DE ETANOL COMBUSTIBLE DE SEGUNDA GENERACIÓN A PARTIR DE DESECHOS LIGNOCELULÓSICOS...10	
1.2.1.1	TRATAMIENTO MECÁNICO.....	12
1.2.1.2	PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO.....	12
1.2.1.3	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	17
1.2.1.4	FERMENTACIÓN.....	18
1.2.1.5	SACARIFICACIÓN SIMULTÁNEA Y FERMENTACIÓN CONTÍNUA.....	20
1.3	DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL BIOETANOL MEDIANTE ANÁLISIS QUÍMICOS.....	21
1.3.1	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE REFRACTOMETRÍA.....	21
1.3.2	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA.....	22
1.3.2.1	REACCIÓN DEL ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO.....	24
1.3.3	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).....	26

1.3.3.1 INSTRUMENTACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA.....	27
1.4 ALCANCE DEL TRABAJO.....	32
1.5 OBJETIVOS.....	32
1.5.1 OBJETIVO GENERAL.....	32
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32

CAPÍTULO II

2.MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	33
2.2. MATERIALES.....	34
2.2.1 MATERIA PRIMA.....	34
2.3 MÉTODOS.....	34
2.3.1 TRATAMIENTO MECÁNICO.....	34
2.3.2 PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO.....	35
2.3.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	36

2.3.4 FERMENTACIÓN.....	39
2.3.5 SACARIFICACIÓN SIMULTÁNEA Y FERMENTACIÓN EN BATCH...41	
2.3.6 SACARIFICACIÓN SIMULTÁNEA Y FERMENTACIÓN CONTINUA...43	
2.3.7 MÉTODOS QUÍMICOS PARA ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS.....45	
2.3.7.1 ANÁLISIS DE AZÚCARES TOTALES POR REFRACTOMETRÍA.....	45
2.3.7.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR ESPECTROFOTOMETRÍA (MÉTODO DEL ÁCIDO 3,5 DINITROSALICÍLICO.....	46
2.3.7.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA.....	49

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.1. RESULTADOS.....	53
3.1.1. BAGAZO DE CAÑA.....	43
3.1.1.1. PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO.....	53
3.1.1.2. INHIBIDORES DE FERMENTACIÓN.....	54
3.1.1.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	55

3.1.1.4	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON ENZIMAS DEL KIT CELLIC®.....	56
3.1.1.5	FERMENTACIÓN.....	58
3.1.1.6	SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTANEA EN BATCH.....	58
3.1.1.7	SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTANEA EN CONTINUO.....	59
3.1.1.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	60
3.2	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	61
3.2.1	CURVA DE CALIBRACIÓN OBTENIDAS PARA LOS MÉTODOS CON LOS QUE SE REALIZÓ EL ANÁLISIS QUÍMICO.....	61
3.2.1.1	REFRACTOMETRÍA.....	61
3.2.1.2	ESPECTROFOTOMETRÍA.....	62
3.2.1.2	HPLC.....	64
3.2.2	PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO.....	64
3.2.3	INHIBIDORES DE FERMENTACIÓN.....	65
3.2.4	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	66
3.2.5	FERMENTACIÓN.....	67

3.2.6 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA EN BATCH.....	69
3.2.7 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA EN CONTINUO.....	69
3.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	71

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	73
4.1. CONCLUSIONES.....	73
4.2. RECOMENDACIONES.....	75
BIBLIOGRAFÍA.....	76
ANEXOS.....	83

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla 1.1. Métodos químicos para el pretratamiento de desechos lignocelulósicos.....12

Tabla 1.2. Eficiencia de los pretratamientos realizados a los desechos lignocelulósicos....14

CAPÍTULO II

Tabla 2.1. Condiciones de operación del cromatografo líquido de alta eficiencia para azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación.....51

CAPÍTULO III

Tabla 3.1. Determinación de azúcares mediante refractometría del pretratamiento físico-químico del bagazo de caña.....53

Tabla 3.2. Determinación de azúcares mediante espectrofotometría del pretratamiento físico-químico del bagazo de caña.....54

Tabla 3.3. Determinación de azúcares mediante cromatografía líquida de alta eficiencia del pretratamiento físico-químico del bagazo de caña.....	54
Tabla 3.4. Determinación de inhibidores de fermentación en el pretratamiento físico-químico del bagazo de caña por HPLC.....	55
Tabla 3.5. Determinación de azúcares mediante refractometría de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña.....	55
Tabla 3.6. Determinación de azúcares mediante espectrofotometría de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña.....	56
Tabla 3.7. Determinación de azúcares mediante cromatografía líquida de alta eficiencia de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña.....	56
Tabla 3.8. Determinación de azúcares mediante refractometría de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña con el kit de enzimas Cellic®	57
Tabla 3.9. Determinación de azúcares mediante espectrofotometría de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña con el kit de enzimas Cellic®.....	57
Tabla 3.10. Determinación de azúcares mediante cromatografía líquida de alta eficiencia de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña con el kit de enzimas Cellic®....	57
Tabla 3.11. Determinación de productos de fermentación obtenidos en el bagazo de caña mediante HPLC.....	58
Tabla 3.12. Determinación de productos de fermentación en el proceso de SSF en batch del bagazo de caña mediante HPLC	59

Tabla 3.13. Determinación de azúcares y productos de fermentación en el proceso de SSF en continuo del bagazo de caña mediante HPLC	59
Tabla 3.14. Análisis estadístico del pretratamiento físico-químico y de la hidrólisis enzimática de los datos obtenidos del bagazo de caña por HPLC.....	60
Tabla 3.15. Valores de concentración y grados brix con los que se realizó la curva de calibración para el análisis por refractometría.....	61
Tabla 3.16. Valores de concentración y grados brix con los que se realizó la curva de calibración para el análisis por espectrofotometría.....	63

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.1. Estructura de la celulosa.....	5
Figura 1.2. Estructura de la hemicelulosa.....	6
Figura 1.3. Estructura de la lignina.....	7
Figura 1.4. Estructura de homogalacturano, el principal polisacárido de la pectina.....	9
Figura 1.5. Producción de etanol de segunda generación.....	11
Figura 1.6. Descomposición de glucosa y xilosa en furfural y 5-HMF.....	16
Figura 1.7. Reacciones de la celulosa al ser sometida a conversión hidrotérmica.....	16
Figura 1.8. Presentación esquemática de la hidrólisis de la celulosa a glucosa por enzimas Celulasas.....	17
Figura 1.8. Ley de Snell.....	22
Figura 1.9. Espectro electromagnético.....	23
Figura 1.10. Componentes del cromatografo.....	29
Figura 1.11. Esquema del detector de índice de refracción para HPLC.....	31

CAPÍTULO II

Figura 2.1. Diagrama general del proceso aplicado en esta investigación a. materias primas, b. transformación de la biomasa, c. productos, d. análisis químicos y estadísticos.....	33
---	----

CAPÍTULO III

Figura 3.1. Curva de calibración utilizada para la cuantificación de grados brix.....	62
Figura 3.2. Curva de calibración utilizada para la cuantificación de azúcares reductores...	63
Figura 3.3. Comparación de los tratamientos enzimáticos del bagazo de caña por medio de la utilización de las enzimas del Biomass kit.....	67
Figura 3.4. Comparación de los tratamientos enzimáticas del bagazo de caña con diferentes kit de enzimas.....	67
Figura 3.5. Obtención de etanol a partir de glucosa a las 24 horas del proceso de fermentación.....	68
Figura 3.6. Cromatograma del bagazo de caña en el que se observan los productos de fermentación	69
Figura 3.7. Concentración de etanol lignocelulósicos obtenido a partir del proceso de SSFC con dos porcentajes de sólidos.....	71

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1

PERFIL DE FERMENTACIÓN DE LA ESPECIE CLQCA Int-005

ANEXO 2

CURVA DE CALIBRACIÓN DE GRADOS BRUX

ANEXO 3

CURVA DE CALIBRACIÓN DNS

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS DE DNS

ANEXO 5

CERTIFICADO DE COLUMNA UTILIZADA PARA EL ANÁLISIS POR HPLC

ANEXO 6

CURVAS DE CALIBRACIÓN POR HPLC Y CERTIFICACIÓN DEL ESTÁNDAR MIX

FUEL ETHANOL

ANEXO 7

CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y

FERMENTACIÓN

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue determinar la cantidad de azúcares fermentables y consecutivamente el etanol de segunda generación que se produce a partir de procesos físicos, químicos y biológicos, en desechos agrícolas que se producen mayoritariamente en el Ecuador, tal como: caña de azúcar (*Saccharum officinarum*.)

Se realizó un pretratamiento físico-químico al desecho de caña de azúcar (bagazo de caña), en un reactor de presión, con temperaturas de 160° y 170°C, tiempos de 10', 20' y 30' y presión correspondiente a 100 psi. Una vez que se realizó el pretratamiento, se procedió a realizar la hidrólisis enzimática con enzimas de Biomass Kit (Celulasas, β -Glucosidasas y Endoxilanasas), que permitieron la transformación de la celulosa amorfa en glucosa. Obteniendo el resultado con mayor concentración de azúcares, se realizó un nuevo experimento con enzimas de Cellic® Kit (C-Tec y H-Tec) y consecutivamente se realizó el proceso de fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. A más de esto, se realizó un experimento con un nuevo proceso de Sacarificación simultánea y fermentación continua en un reactor de capacidad 3L.

En cuanto a el pretratamiento, se encontró que el más adecuado resultó 160°C10' en el bagazo de caña. Los análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia demostraron que el bagazo de caña con enzimas del Kit Biomass produjeron una concentración de glucosa correspondiente a 101.93 g/L y con enzimas del Kit Cellic® 130.06 g/L. En la fermentación del mosto de bagazo de caña con la sacarificación y fermentación por

separado se obtuvo 52.09 g/L de etanol mientras que con el proceso de SSF (Sacarificación simultánea y fermentación continua) se obtuvo 62.23 g/L de etanol. En este estudio se sientan las bases para futuras investigaciones que conlleven a optimizar el rendimiento de azúcares para producción de etanol de segunda generación a precios competitivos en el Ecuador.

Palabras clave: etanol de segunda generación, cromatografía líquida de alta eficiencia, bagazo de caña, fermentación.

ABSTRACT

The main objective of this research was to determine the amount of fermentable sugars and consequently the amount of second generation ethanol, obtained from physical, chemical and biological processes, produced from Ecuadorian agricultural wastes, such as: sugar cane (*Saccharum officinarum*).

We performed a physical-chemical pretreatment to sugar cane waste (bagasse) in a pressure reactor, at temperatures of 160 ° and 170 ° C; time 10 ', 20' and 30 '; and pressure corresponding to 100 psi. Subsequently, enzymatic hydrolysis was performed with Biomass Kit enzymes (cellulase, β -glucosidase and endoxylanase), which allowed the transformation of amorphous cellulose to glucose. Once the result with a higher concentration of sugars was obtained, a new experiment was performed with enzymes Cellic ® Kit (C-Tec and H-Tec) and consecutively the fermentation process with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was performed. Besides this, we performed an experiment with a new process for simultaneous Saccharification and continuous fermentation in a 3L capacity reactor.

As for the high performance liquid chromatography, it was shown that the enzyme bagasse Biomass Kit produced a glucose concentration corresponding to 101.93 g / L and enzymes Cellic ® Kit 130.06 g / L. pretreatment, we found that the best was 160 ° C 10' in the sugar cane bagasse. In the fermentation analysis of the juice of sugar cane bagasse with saccharification and fermentation done separately we obtained 52.09 g / L of ethanol while the process of SSFC (Simultaneous Saccharification and continuous fermentation) we

obtained 62.23 g / L of ethanol. In this study we lay the foundation for future research that will lead to optimize the performance of sugars for second generation ethanol production at competitive prices in Ecuador.

Keywords: second-generation ethanol, high performance liquid chromatography, bagasse, fermentation.

INTRODUCCIÓN

Los recursos de energía fósil se consumen aceleradamente en el planeta provocando el cambio climático global y contaminación del medio ambiente. El consumo de energía ha aumentado durante el último siglo a medida que la población mundial ha crecido y los países han llegado a ser más industrializados [1]. El uso de los combustibles de origen fósil genera contaminación al medio ambiente debido a la alta producción de CO₂ que produce el efecto invernadero, y gases tóxicos que producen contaminación ambiental. Actualmente se buscan nuevas fuentes de energía no contaminantes, tales como el etanol combustible de segunda generación, biogás o biodiesel. La combustión de estos también producen CO₂, el cual es originado en el carbono fijado por los vegetales durante la fotosíntesis, por lo que esta combustión no afecta al equilibrio biogeoquímico del carbono.

En los últimos años ha crecido el interés en cuanto a la transformación de la biomasa a etanol [2], ya que es considerado como la alternativa de combustible líquido más limpia para sustituir los combustibles fósiles, que son el producto de la refinación del petróleo. El carbono de estos combustibles no se encuentra formando parte del equilibrio natural del CO₂ en la atmósfera, por lo que la acumulación de este gas en el medio ambiente produce el efecto invernadero.

El recurso más sustentable por sus características de abundancia y su relación con la economía y la sociedad es la biomasa residual, que en la actualidad, en muchos casos, constituye un problema ambiental sin resolver, puesto que la explotación de cultivos

extensivos como el de caña de azúcar, palma africana, banano y otros genera altas cantidades de residuos vegetales. Por otro lado, el uso de estos materiales para convertirlos en combustible de segunda generación, evita la competencia entre los alimentos y los combustibles, que ha generado controversias en los últimos años. Es, sin embargo indispensable, profundizar en los estudios de la biomasa para comprender sus alcances como un recurso sustentable para biocombustible como el etanol.

CAPÍTULO I

1. PARTE TEÓRICA

1.1 BIOMASA

La biomasa es la materia prima de origen orgánico que se usa para la transformación de materia en biocombustibles y estos para producir energía. “La energía primordialmente viene del sol, que gracias a la fotosíntesis es capturada y fijada en forma de compuestos energéticos y estructurales en las células fotosintéticas, que pasan luego a ser alimento disponible para otros seres humanos que aprovechan de esta energía almacenada” [3].

Como recurso energético, la biomasa puede clasificarse en:

- Biomasa natural, la cual es producida en la naturaleza directamente por seres fotosintéticos, algas, plantas y otros seres autótrofos.
- Biomasa residual, la cual es el subproducto generado en las actividades agrícolas, silvícolas y ganaderas. Al igual que la biomasa natural se produce sin intervención humana.
- Cultivos energéticos, los cuales tienen como único fin la producción de biomasa para luego ser transformada en biocombustible [4].

En Ecuador la biomasa residual seca ha sido estudiada con la finalidad de encontrar sus posibles usos en la fabricación de etanol lignocelulósico como una alternativa de reemplazo a la gasolina. Estos estudios demuestran que en función de la abundancia de residuos

lignocelulósicos, teóricamente se podría reemplazar el 51% de la gasolina proveniente del petróleo (datos proyecto RESETA), de lo cual se desprende que en Ecuador hay un alto potencial para el desarrollo de industrias que produzcan etanol de origen lignocelulósico y otros químicos de tipo renovable con tecnologías amigables con el medio ambiente.

1.1.1 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Las nuevas fuentes de investigación se basan en la obtención de materias primas que se destinen a la producción de biocombustibles de segunda generación, las cuales no perjudiquen al equilibrio del ecosistema y al abastecimiento de recursos para la población animal y humana, lo cual ha convergido en la utilización de desechos lignocelulósicos.

En el Ecuador existe varios tipos de biomasa lignocelulósica, la cual se puede aprovechar en la obtención de etanol combustible de segunda generación, tales como: caña de azúcar, desechos de banano, desechos de palma, desechos de cacao, entre otros.

La biomasa lignocelulósica está compuesta de celulosa, hemicelulosa, lignina [5] y como componente de la pared celular se encuentra la pectina. Estos polímeros (celulosa y hemicelulosa) se encuentran unidos a la lignina, por esta razón reciben el nombre de lignocelulósicos.

Los compuestos de la biomasa lignocelulósica son:

- CELULOSA

Es un compuesto orgánico abundante que “constituye más del 50% de todos los carbonos de una planta” [6]. La celulosa está compuesta por unidades de glucosa unidas por enlaces β 1-4, que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis química y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática [7] (Fig. 1.1).

De la hidrólisis total de la celulosa se obtiene glucosa ($C_6H_{12}O_6$) que es un azúcar fermentable de 6 carbonos.

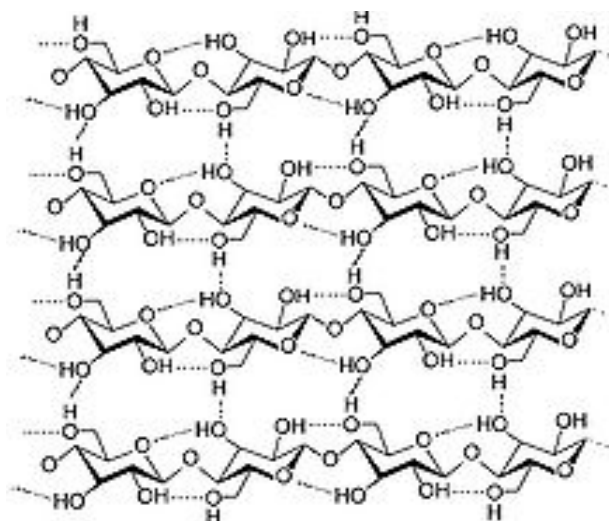


Figura 1.1 Estructura de la celulosa

Fuente: <<http://es.wikipedia.org/wiki/Celulosa#Estructura_de_la_celulosa>>

En los desechos lignocelulósicos el porcentaje de celulosa se encuentra en un rango del 29% al 45% [8].

- HEMICELULOSA

Es un carbohidrato de estructura compleja, la cual se encuentra constituido por cadenas largas de pentosas, hexosas y ácidos glucurónicos [9]; la unión de estos polisacáridos se da por medio de un enlace β 1-4 y ocasionalmente por enlaces β 1-3 (Fig. 1.2). “Constituye un componente fundamental de las paredes celulares de las plantas” [10].

De la hidrólisis de hemicelulosa se obtiene como resultado hexosas (glucosa, galactosa, manosa, ramnosa y fucosa) y pentosas (arabinosa y xilosa) [8].

La hemicelulosa tiene un peso molecular menor que la celulosa y ramas con cadenas cortas laterales que consisten de diferentes azúcares, los cuales son fáciles de hidrolizar. Este componente sirve como conexión entre la lignina y las fibras de celulosa [11].

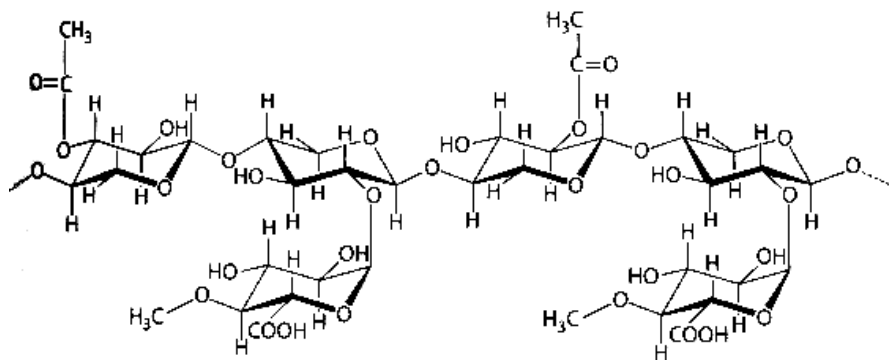


Figura 1.2 Estructura de la hemicelulosa

Fuente: Biomass to renewable energy processor. Cheng, J., (2010).

En los desechos lignocelulósicos el porcentaje de hemicelulosa se encuentra en un rango del 15% al 29% [8].

- LIGNINA

Polímero que se encuentra en las paredes celulares de los vegetales, “con estructuras transconectadas que presentan un peso molecular de 10 000 uma” [12].

En la estructura de la lignina, el acoplamiento aleatorio de ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, conilferílico y sinapílico), dan origen a una estructura tridimensional y un polímero amorfo [11]. (Fig. 1.3)

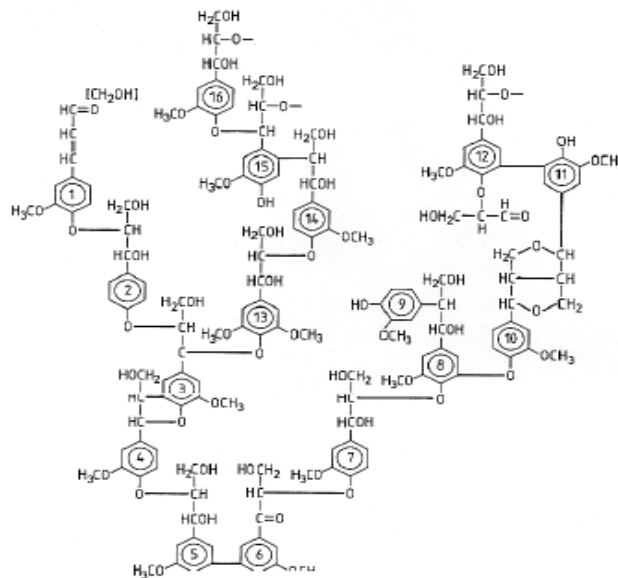


Figura 1.3 Estructura de la Lignina

Fuente: Bioethanol from lignocellulosic biomass. Aroca G., (2010).

El propósito de la lignina es dar a la planta soporte, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano [11].

En los desechos lignocelulósicos el porcentaje de lignina se encuentra en un rango del 15% al 24%. [8].

- PECTINA

“Palabra usada para describir colectivamente una familia de polisacáridos que se encuentran tanto en la pared celular y las capas intercelulares de los tejidos vegetales” [8]. El nombre se deriva del griego *Pektikos*, que significa coagulación. La cantidad de polisacáridos pécticos en la pared celular es menor al 5% para maderas blandas y maderas duras, 2 a 10% para pastos y hasta 35% para plantas con flores y frutas. Las funciones biológicas de la pectina incluyen el mantenimiento de células que estructura la pared celular de la adhesión celular y señalización, y el desarrollo de los frutos [8].

Las pectinas son una familia de polisacáridos heteropoliméricos y homopoliméricos. Estos polisacáridos están dominados por unidades de ácido galacturónico, que representan aproximadamente el 70% de todas las unidades monoméricas en la pectina.

“El polisacárido dominante en la familia de la pectina es el homogalacturano, el cual es alrededor del 65% de todas las pectinas. Homogalacturano es un homopolímero de aproximadamente 100 α -1,4 unidades de ácidos galacturónicos vinculados” [8]. (Fig. 1.4)

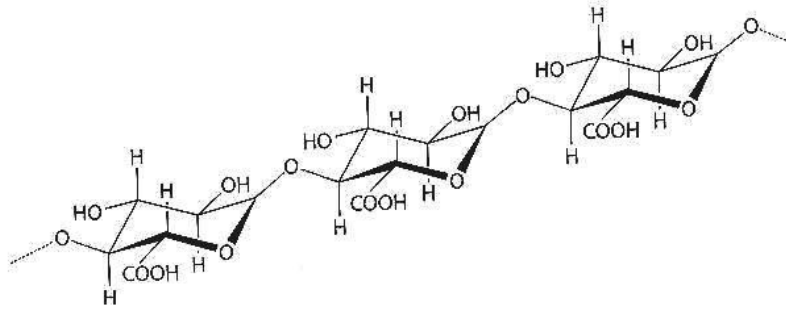


Figura 1.4 Estructura de homogalacturano, principal polisacárido de pectina.

Fuente: Biomass to Renewable Energy Processes. Cheng. J., (2010)

Actualmente, por su composición y características, los desechos lignocelulósicos (raquis de banano, raquis de palma, cáscara de cacao y bagazo de caña) son aprovechados para la obtención de etanol mediante tratamientos con ácidos y/o álcalis y enzimas.

1.2 ETANOL COMBUSTIBLE DE SEGUNDA GENERACIÓN

El etanol o alcohol etílico $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, es un compuesto líquido incoloro, inflamable, volátil y soluble en agua. La densidad del etanol corresponde a 0,7893 g/mL a 20°C.

El etanol combustible de segunda generación es un producto químico que se obtiene a partir de la fermentación de los azúcares liberados de los desechos lignocelulósicos [1] por medio de la utilización de enzimas y fermentados por microorganismos, como levaduras y

bacterias, que en su mayoría utilizan la glucosa como fuente de carbono y energía para sobrevivir produciendo alcohol y CO₂.

Este alcohol puede ser utilizado como oxigenante para la gasolina, ya que así eleva el contenido de O₂ y esto permite una mayor combustión de la misma, disminuyendo las emisiones de hidrocarburos no oxidados completamente al medio ambiente.

La investigación para la producción de etanol, utilizando biomasa lignocelulósica, surge a partir de análisis realizados sobre biocombustibles de primera generación (combustibles producidos a partir de productos consumibles por el ser humano y animales) como: caña de azúcar en Brasil e India, melazas de remolacha en Francia y almidón en Estados Unidos [13]; dichos análisis indican que este tipo de biocombustibles “contaminan igual o más que la gasolina, y son perjudiciales para la salud, además, su uso puede contribuir al alza de precios del maíz y a la crisis alimentaria global”[13].

1.2.1 PRODUCCIÓN DEL ETANOL COMBUSTIBLE DE SEGUNDA GENERACIÓN A PARTIR DE DESECHOS LIGNOCELULÓSICOS

La materia prima utilizada en la producción de etanol combustible de segunda generación, desechos lignocelulósicos, es procesada a través de diferentes tratamientos físico, químicos y biológicos para la transformación de glucosa a etanol. Figura 1.5.

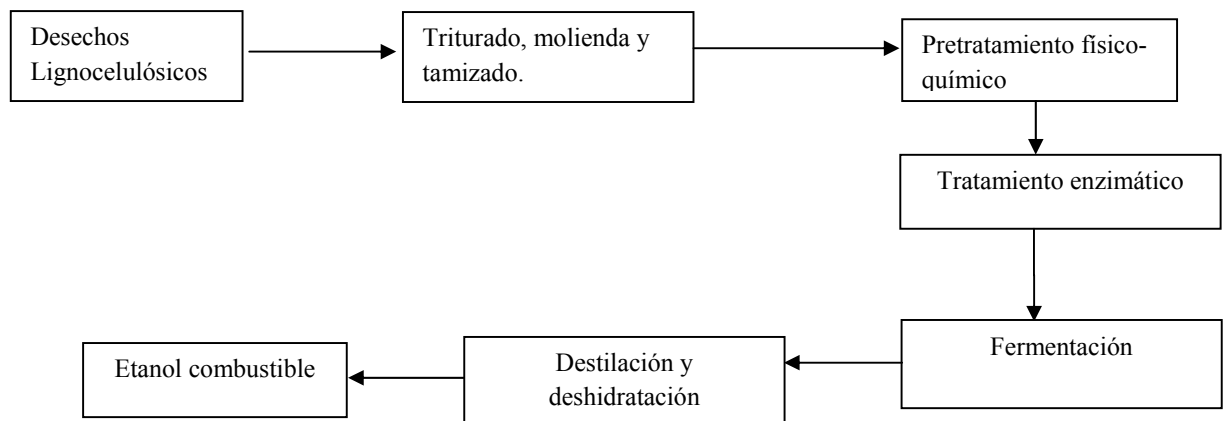


Figura 1.5 Producción de etanol de segunda generación

El propósito de los pretratamientos que se realizan sobre los desechos lignocelulósicos es remover la lignina, la hemicelulosa, y reducir la cristalinidad de la celulosa, incrementando así la porosidad de los materiales [1]; su importancia “radica en mejorar la formación de azúcares o la capacidad para formar azúcares por hidrólisis enzimática, evitar la degradación o pérdida de hidratos de carbono, evitar la formación de inhibidores para el subsecuente proceso de hidrólisis y fermentación y finalmente ser rentable” [1].

Los tipos de tratamiento que se llevan a cabo son:

1.2.1.1 TRATAMIENTO MECÁNICO

Los materiales de desecho pueden ser tratados con una combinación de corte, triturado y molienda con el fin de reducir la cristalinidad de la celulosa. El tamaño óptimo de los materiales varía de acuerdo al tratamiento realizado. “El tamaño de los materiales es usualmente 10-29 mm después del cortado y de 0.2-2 mm después del triturado y la molienda” [1]. El tamaño de partícula es importante ya que se produce mayor digestibilidad del desecho lignocelulósico por enzimas.

1.2.1.2 PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO

El pretratamiento es un paso necesario para cambiar las características estructurales de los compuestos lignocelulósicos y modificación de la celulosa cristalina para el posterior ataque enzimático [14]. En la tabla 1.1 se indica los métodos químicos para el pretratamiento de los desechos lignocelulósicos y en la tabla 1.2, se indica la eficiencia de los pretratamientos dependiendo la composición de los desechos.

Tabla 1.1 Métodos químicos para el pretratamiento de desechos lignocelulósicos

Fuente: Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. Modificado de Taherzahed, *et al.* (2007)

Método	Proceso	Mecanismo de cambio sobre la biomasa
	Explosión: Explosión de vapor,	- Deslignificación.

Pretratamiento físico-químicos y químicos	explosión de fibra de amonio AFEX, explosión de CO ₂ y explosión de SO ₂ .	- Disminuir la cristalinidad de la celulosa y sus grados de polimerización. - Hidrólisis parcial o completa de la hemicelulosa
	Hidrólisis con álcali y presión: Hidróxido de sodio, amoniaco y sulfato de amonio.	
	Hidrólisis con solvente en fase gaseosa y presión: Dióxido de cloro y dióxido de nitrógeno.	
	Hidrólisis ácida con presión: Ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, dióxido de azufre.	
	Hidrólisis con agentes oxidantes y presión: Peróxido de hidrógeno, oxidación húmeda, ozono.	
	Hidrólisis con disolventes de celulosa y presión: Cadoxen, CMCS.	
	Solventes extracción lignina: Etanol - agua extracción. Benceno - agua extracción.	

	Etilenglicol extracción.	
	Butanol agua extracción.	

Tabla 1.2 Eficiencia de los pretratamientos realizados a los desechos lignocelulósicos

Fuente: Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Modificado de Alvira, *et al.* (2009)

	Molienda	Explosión de vapor	Agua caliente líquida	Ácido	Álcali	Oxidación	AFEX	Explosión CO ₂
Aumento del área de superficie	A	A	A	A	A	A	A	A
Modificación de la celulosa cristalina	A	-	n.d	-	-	-	A	-
Solubilización de la hemicelulosa	-	A	A	A	B	-	M	A
Eliminación de la lignina	-	M	B	M	M	M	A	-
Generación de compuestos tóxicos	-	A	B	A	B	L	L	-
Alteración de la estructura de la lignina	-	A	M	A	A	A	A	-

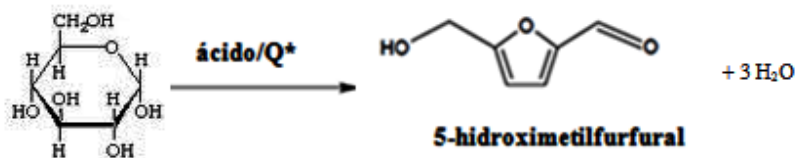
Efecto alto = A Efecto moderado = M Efecto bajo = B No determinado = n.d

En la tabla 1.1 se observan que existen varios métodos para efectuar el pretratamiento fisicoquímico, entre uno de estos la explosión de vapor es el más conocido para desechos lignocelulósicos [15]. Este método remueve la mayor parte de hemicelulosa del material

sólido y causa un efecto de mayor susceptibilidad en la celulosa para la digestión enzimática. (Tabla 1.2)

El pretratamiento de los desechos lignocelulósicos con ácido y reactor de presión es el método más comúnmente utilizado [15] para una mayor efectividad en la hidrólisis de la celulosa. La mayor desventaja de hidrólisis ácida es la neutralización del pH para la hidrólisis enzimática [15] y la producción de inhibidores de fermentación.

Los inhibidores de fermentación tales como el furfural, HMF, ácido levulínico, ácido acético, entre otros, tienen efectos sobre los microorganismos utilizados para fermentar, tales como: disminución de la productividad volumétrica del etanol y disminución de la producción de biomasa [16]. “El furfural y el 5-hidroximetilfurfural son productos de la descomposición de los azúcares liberados en el pretratamiento ácido, debido a las condiciones de acidez y de altas temperaturas a las cuales se opera la reacción de hidrólisis” [17] (Fig. 1.6). La producción de acetona y ácido acético se producen por medio de la descomposición del levoglucosano, el cual es producto de la pirolisis de la celulosa al ser sometida a conversión hidrotérmica. *Ver figura 1.7*



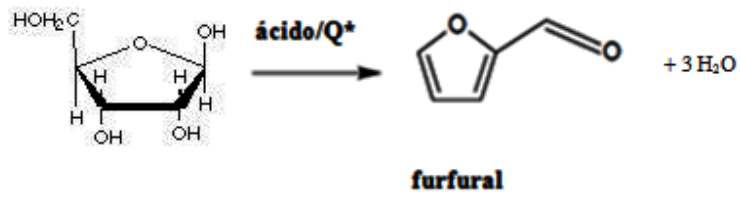


Figura 1.6 Descomposición de glucosa y xilosa en furfural y 5-HMF

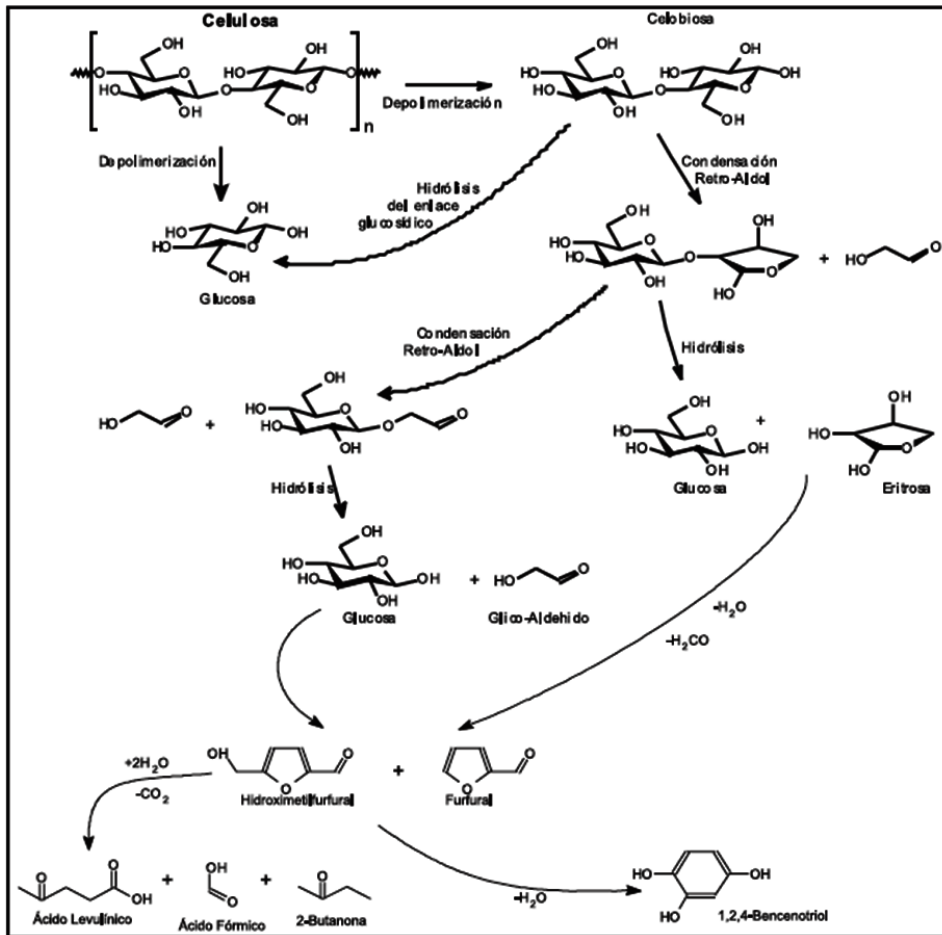


Figura 1.7 Reacciones de la celulosa al ser sometida a conversión hidrotérmica

Fuente: Conversión hidrotérmica subcrítica de residuos orgánicos y biomasa.

Mecanismos de reacción Amadeus., A., *et. Al*, (2007).

1.2.1.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa se efectúa por medio de enzimas celulasas que son altamente específicas. Los productos de la hidrólisis son por lo general azúcares reductores como la glucosa [1].

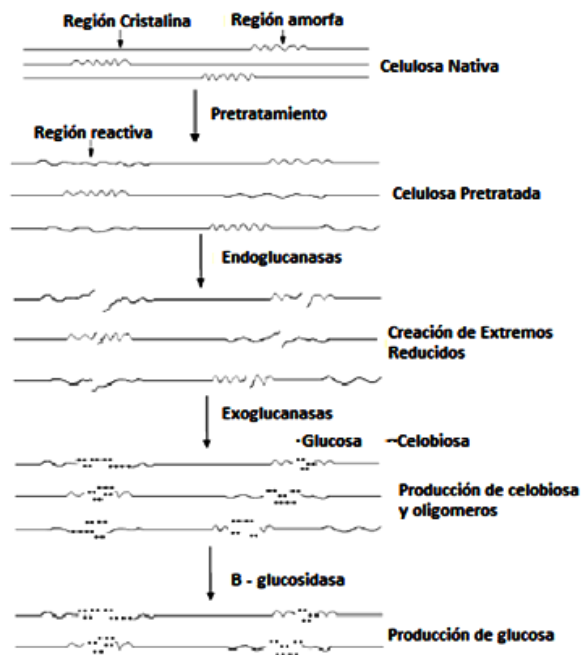


Figura 1.8 Presentación esquemática de la hidrólisis de la celulosa a glucosa por enzimas celulasas.

Fuente: Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. Modificado de Taherzahed, *et al.* (2007)

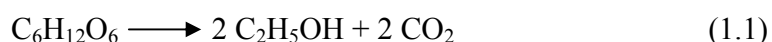
El tratamiento biológico con enzimas de los desechos lignocelulósicos se da lugar en condiciones leves (pH 4.5 a 5.0 y temperatura 45° - 50°C) [15]. Los tipos de enzimas que se utilizan en los mostos son: Celulasa, β -Glucosidasa y Endoxilanasas. Estas enzimas actúan

sobre la celulosa y hemicelulosa que han sido expuestas después del pretratamiento físico-químico, obteniendo azúcares simples que pueden ser fermentados utilizando levaduras.

Figura 1.8.

1.2.1.4 FERMENTACIÓN

“Es un proceso biológico anaerobio en el cual los azúcares son convertidos en alcohol por acción de microorganismos, usualmente levaduras. El producto obtenido es etanol (C_2H_5OH), el cual es separado de otros componentes por destilación” [14]. La reacción global que se produce para obtención de etanol es:



La fermentación de los azúcares utilizando levaduras, es el método más antiguo utilizado por el hombre y todavía de gran importancia para la preparación del alcohol etílico [18]. En la producción de etanol los azúcares varían dependiendo de las diferentes materias primas, tales como: (1) Azúcares simples provenientes de la caña de azúcar, azúcar de la remolacha, melaza, fruta, y otras fuentes de azúcares libres (2) almidón de granos, papa y cultivos de raíces; y, (3) Celulosa de madera, residuos de agricultura, residuos sólidos municipales, residuos de papel [14].

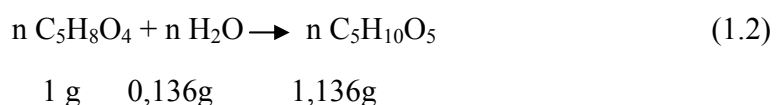
La hidrólisis de la celulosa produce glucosa, que es fácilmente fermentable por los microorganismos; “esta técnica ha sido utilizada durante siglos para la obtención de bebidas

alcohólicas” [19]. La hidrólisis de la hemicelulosa produce azúcares de cinco y seis carbonos. El fraccionamiento de la hemicelulosa produce una mezcla de azúcares incluyendo xilosa, arabinosa, galactosa y manosa, siendo xilosa y arabinosa pentosas, mientras que la galactosa y manosa son hexosas. Las cantidades dependen del material y del tratamiento realizado sobre el desecho lignocelulósico [19].

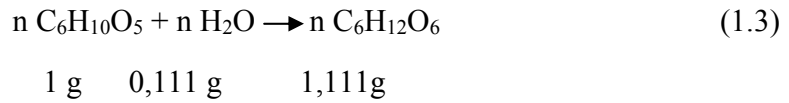
Las levaduras, “pueden fermentar azúcares de 6 carbonos, uno de los más comunes, la glucosa” [19]. En la teoría, “100 gramos de glucosa pueden producir 51,1 g de etanol y 48,8 g de dióxido de carbono” [18]. Sin embargo, en la práctica, los microorganismos utilizan parte de la glucosa para su metabolismo, por lo cual el rendimiento de etanol no ocurre al 100%.

Una de las principales cepas de levaduras que se utilizan para el proceso de fermentación es *Saccharomyces cerevisiae*, organismos unicelulares ampliamente utilizados en la industria de fermentación alcohólica y un organismo modelo en microbiología y biología molecular.

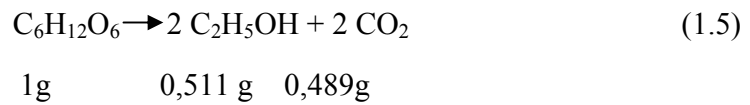
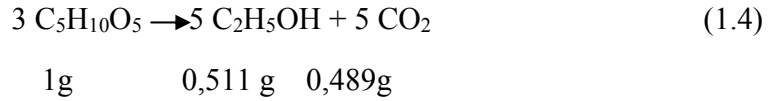
La cantidad que se obtiene de producto formado por unidad de sustrato consumido por el organismo es una forma útil para referirse a los rendimientos. En las ecuaciones se puede observar el proceso de hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, donde luego de la fermentación, da como resultado etanol.



De Pentosano a pentosa



De Hexosano a Hexosa



De Pentosa y hexosa a etanol, 0,511 gramos por gramo de hexosa o pentosa.

La importancia de la fermentación con desechos lignocelulósicos es fundamental ya que a pesar de que “el balance energético global de la producción de etanol sea negativo, los propios residuos agrícolas y de la fermentación sirven para calentar la mezcla en la torre de fraccionamiento” [20]. También se puede aprovechar el residuo que se obtiene de la fermentación como abono.

1.2.1.4 SACARIFICACIÓN SIMULTÁNEA Y FERMENTACIÓN CONTINUA SSFC

El proceso de sacarificación simultánea y fermentación continua tienen un amplio uso en la producción de etanol de segunda generación a partir de desechos lignocelulósicos [21]. Este proceso tiene varias ventajas, una de las principales es que “los rendimientos son mayores que los logrados por la técnica de sacarificación y fermentación separadas que era mayormente usada” [22]. La obtención de una mayor concentración se da debido a que la

glucosa se transforma rápidamente en bioetanol, evitando así el efecto inhibitorio sobre las enzimas hidrolíticas, por lo que el rendimiento de este azúcar aumenta y existe una mayor disponibilidad de sustrato para la fermentación alcohólica [21,22].

Esta investigación se enfoca principalmente en los análisis químicos realizados durante varias etapas del proceso de obtención de etanol lignocelulósico, examinando parámetros relacionados con el rendimiento, eficacia y calidad de los materiales y productos.

1.3 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL BIOETANOL MEDIANTE ANÁLISIS QUÍMICOS

1.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES MEDIANTE REFRACTOMETRÍA

El objetivo del análisis por refractometría es la determinación de la concentración de los azúcares en los mostos azucarados cuantitativamente, de manera que se pueda comparar con la concentración de azúcares obtenidos en otros análisis químicos, comprobando la eficiencia del método.

La refractometría es un método cuantitativo que consiste en calcular el índice de refracción de cualquier clase de líquido. “El índice de refracción de un medio homogéneo es una medida que determina la reducción de la velocidad de la luz al propagarse de un medio a otro” [23]. Esta medida se rige por medio de la ley de Snell. (Fig. 1.9)

$$\frac{\text{sen } \theta_1}{\text{sen } \theta_2} = \frac{n_2}{n_1} = \frac{v_1}{v_2} \quad (1.5)$$

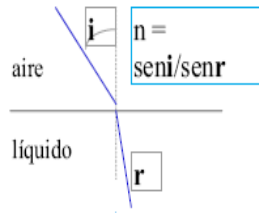


Figura 1.9 Ley de Snell

Fuente: Principios de análisis instrumental. Skoog., D. (2001)

La refractometría, además de medir el índice de refracción de líquidos, mide los grados Brix de muestras que contienen sólidos disueltos en forma de azúcares en su composición.

1.3.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrofotometría es una técnica analítica cuantitativa que se basa en la absorción de energía radiante por la muestra mediante un haz de luz de longitud de onda determinada [23]. Es importante tomar en cuenta al espectro electromagnético, el cual corresponde a la distribución energética del conjunto de las ondas electromagnéticas [23]. La región visible cubre diferentes longitudes de onda, entre 400 nm a 800 nm el rango que va desde la región ultravioleta hasta la región infrarroja. (Fig. 1.10)



Figura 1.10 Espectro Electromagnético

Fuente: Química general. Brown, (1998)

La espectrofotometría visible se encuentra en el rango de 400 a 800 nm. En este rango se miden compuestos coloreados. En la región visible se ve el color de una solución que corresponde a ondas de luz que transmiten, no que absorben. El color que absorbe es el complementario del color que transmite, por esta razón para realizar la medición de absorción es importante utilizar la longitud de onda en la cual absorbe la solución coloreada [24].

“La ley que expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución” [24] es la ley de Lambert – Beer la cual se expresa:

$$A = \log I/I_0 = \epsilon \cdot c \cdot l$$

“La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración” [24]. Cuando existen un mayor número de moléculas la intercepción de la luz con estas también se incrementa; también depende de la distancia recorrida de la luz por la muestra, ya que

cuando esta sea mayor, más moléculas se encontrarán. El coeficiente de extinción molar ϵ depende de cada cromóforo. [24]

“La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de c altos, ϵ varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc” [24].

En espectrofotometría, el nivel de absorbancia depende de la concentración de la muestra a analizar.

1.3.2.1 REACCIÓN DEL ÁCIDO 3,5 DINITROSALICÍLICO

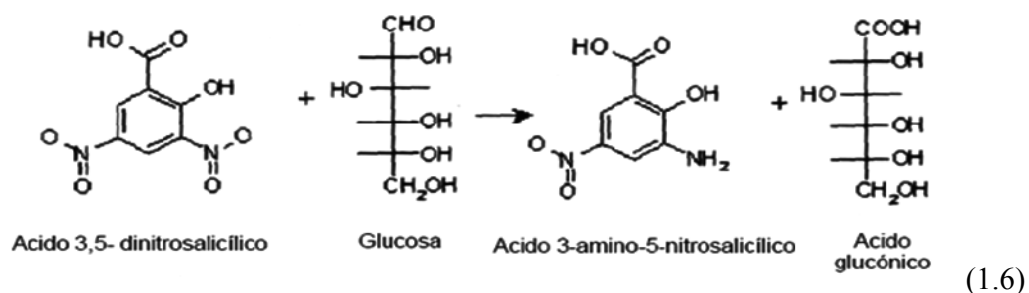
Los azúcares reductores de una muestra están compuestos por grupos carbonilos que pueden ser aldehídos o cetonas [25]. La determinación de este tipo de azúcares se realiza mediante una reacción colorimétrica utilizando el método DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) en medio alcalino.

El método del DNS permite identificar los grupos carbonilos en los azúcares por medio de la reducción y desplazamiento del grupo nitro de los extremos del DNS, dando como resultado la formación de un ácido [26].

El reactivo DNS está formado por tres componentes principales:

- Ácido dinitrosalicílico (ácido 2 hidroxí – 3,5 dinitrobenzoico), el cual actúa como oxidante en la reacción
- La Sal de Rochelle (tartrato sódico potásico) el cual impide la disolución de oxígeno en el reactivo
- Hidróxido sódico hace el medio alcalino que es apropiado para que se produzca la reacción redox.

La reacción del DNS consiste en que el ácido hidroxí – 3,5 dinitrobenzoico se reduzca en presencia del grupo reductor de la glucosa (carbonilo) formando el ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico, mientras que el grupo aldehído reductor se oxida, para formar un grupo carboxílico [26]. La intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de azúcares reductores que contengan las muestras.



Se mide la absorbancia en el rango del espectro visible y se cuantifica por medio de una curva de calibración realizada con diferentes niveles de concentración de glucosa. El producto de esta reacción se mide por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 540nm.

1.3.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

La cromatografía en general es un método de separación que se basa en la distribución de los componentes de la muestra a analizar en dos fases inmiscibles, una fase estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida de alta eficiencia, la fase móvil corresponde a un líquido, el cual fluye a través de la fase fija que está contenida en la columna.

La cromatografía líquida de alta eficiencia “HPLC” es una técnica cromatográfica que permite la separación de una mezcla de compuestos y sirve para identificar de una manera cuantitativa y cualitativa los componentes de una muestra [27,28].

En esta técnica la muestra es transportada por medio de la fase móvil en la columna, en la cual sus componentes se separan según la afinidad que tenga el analito frente a la fase estacionaria que está contenida en la columna.

La cromatografía líquida de alta eficiencia tiene varias ventajas en el análisis de muestras, tales como:

- Elevada resolución que permite la purificación de mezclas [29].
- Velocidad de análisis consiguiendo resultados en tiempos menores a 1 hora [29].
- Alta sensibilidad para detectar concentraciones menores de picomol [29].
- Capacidad de automatización [29].

1.3.3.1 INSTRUMENTACIÓN PARA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA HPLC

Los componentes del cromatografo son:

- **Recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los disolventes:** están equipados con envases de capacidad entre 200 a 1 000 ml en los cuales se encuentran los solventes para el análisis de las muestras, razón por la cual recibe el nombre de cromatografía líquida. “Los recipientes, a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos, en general oxígeno y nitrógeno, que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección” [23]. Previo a que el solvente entra en contacto con la muestra, éste debe ser desgasificado, para lo cual es filtrado al vacío a través de membranas que se encuentran en un módulo del equipo destinado a esta tarea. (Fig. 1.11)
- **Sistemas de bombeo:** Este sistema es uno de los más importantes dentro del HPLC puesto que es en donde se va a generar la presión y el flujo de la fase móvil. (Fig. 1.11). El equipo que se utilizó para la investigación está basado en un diseño en serie de dos pistones y dos canales que abarca todas las funciones esenciales que debe cumplir un sistema de flujo de disolventes. La medida y suministro de disolvente a la zona de alta presión se realiza mediante dos dispositivos que puedan generar una presión hasta 400 bares.

Cada canal está compuesto por un dispositivo que incluye una bomba, una cabeza de bomba, una válvula de entrada activa con un cartucho reemplazable y una válvula de salida. Ambos canales se conectan en una cámara de mezclado de bajo

volumen conectada mediante una bobina capilar a una unidad de amortiguación y a un mezclador. En la salida de la bomba, está instalada una válvula de purga que contiene una frita PTFE para cebar convenientemente el sistema de bombeo [30].

- **Sistemas de Inyección de muestra:** “Los sistemas de HPLC utilizan cada vez más inyectores automáticos para aumentar la productividad en los laboratorios y la coherencia y precisión de los resultados analíticos” [29]. El sistema de inyección de la muestra en el cromatografo líquido de alta eficiencia utilizado para esta investigación es automático. Las muestras se colocan en una placa de microdosificación (MTP) que controla el mecanismo de transporte, la aguja de muestreo, la unidad de medida y la válvula de inyección de alta velocidad. El control de todos estos dispositivos corre a cargo de un versátil diseño de la electrónica basado en un procesador de la familia 68 000, que además contiene memoria RAM con batería de reserva, ROM, un reloj de tiempo real y algunas opciones de comunicación. [31]

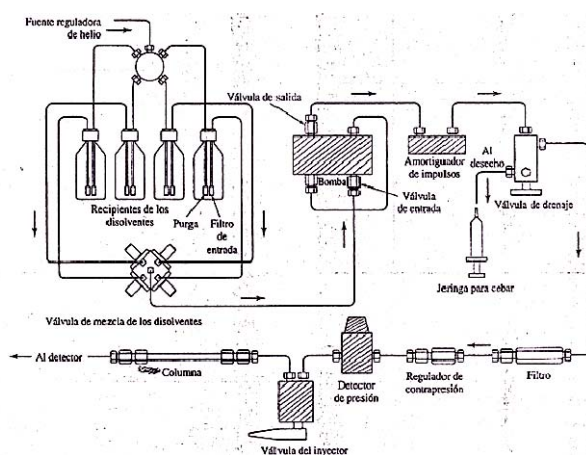


Figura 1.11. Componentes del cromatografo

Fuente: Principios de análisis instrumental. Skoog., D. (2001)

- **Columnas para análisis cromatográfico:** El sistema de cromatografía requiere de una columna, la cual “consiste en un tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme” [23] y que por dentro lleva un material de empaque que permita la separación de los analitos. El análisis de los componentes de los mostos azucarados y de los productos de fermentación se lo realiza utilizando columnas con resinas de intercambio iónico. Este tipo de columna tiene “la capacidad de separar diferentes clases de compuestos (azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes), en una sola separación” [32].

La cromatografía iónica es una técnica que permite la separación de los componentes de una muestra por medio del intercambio iónico que se produce en el interior de la columna con el material de empaque que se encuentra dentro de la misma.

La cromatografía de intercambio iónico “conserva los analitos basándose en las interacciones de Coulomb. La fase estacionaria muestra en la superficie grupos funcionales iónicos que interactúan con iones de carga opuesta del analito” [33].

- **Detectores:** En HPLC se pueden utilizar detectores dependiendo de la naturaleza de la muestra. “Los detectores de índice de refracción tienen la ventaja de que responden a casi todos los solutos. Es decir, son detectores universales que

dependen del caudal y son fiables; sin embargo, son muy sensibles a los cambios de temperatura constante en unas pocas milésimas de grado centígrado” [23].

El detector de índice de refracción es un refractómetro diferencial que mide la desviación de un haz de luz que se produce por la diferencia en el índice de refracción entre los líquidos contenidos en las celdas de muestra y la referencia de una sola celda de flujo [34].

“Un haz de luz procedente de la lámpara pasa por una celda de flujo que se separa diagonal en una celda de muestra y en otra de referencia. En la parte posterior de la celda de flujo, un espejo refleja la luz que atraviesa de nuevo la celda de flujo, un espejo refleja la luz que atraviesa de nuevo la celda de flujo a través de un vidrio neutro, afectando el paso del haz de luz, hasta llegar al receptor de luz. El receptor de luz tiene dos diodos cada uno de los cuales produce una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de luz que le llega” [34]. (Ver figura 1.12)

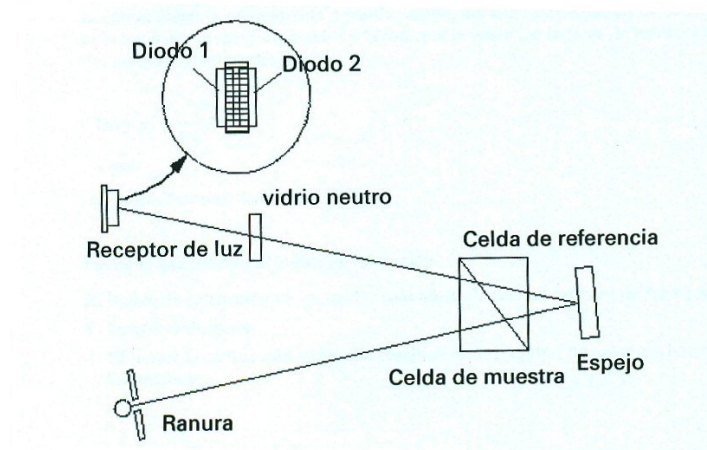


Figura 1.12. Esquema del detector de índice de refracción para HPLC.

Fuente: Detector de índice de refracción Agilent 1200 Series (2008)

1.4 ALCANCE DEL TRABAJO

Este trabajo de investigación permitirá determinar la cantidad de azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación que se producen en el bagazo de caña a partir de varios procesos que se realizan para obtener etanol de segunda generación.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar los azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación por HPLC en un proceso de obtención de etanol lignocelulósico.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar azúcares obtenidos en pretratamientos físico-químicos de productos lignocelulósicos.
- Analizar azúcares obtenidos en la hidrólisis enzimática de la fibra.
- Analizar los productos de fermentación e inhibidores de fermentación en hidrolizados en distintas etapas del proceso.
- Determinar los procesos óptimos que conduzcan a la degradación del material lignocelulósico.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ÁREA DE ESTUDIO

Esta investigación se enfoca en la determinación de azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación producidos en el proceso de obtención de etanol lignocelulósico que se detalla en la Figura (2.1).

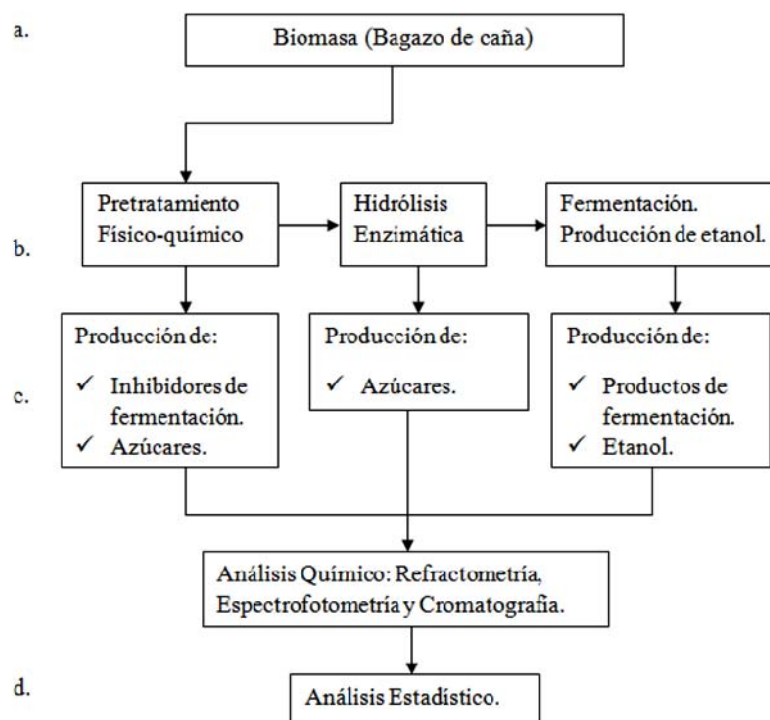


Figura 2.1 Diagrama general del proceso aplicado en esta investigación: a. materias primas; b. transformación de la biomasa; c. productos; d. análisis químicos y estadísticos

2.2 MATERIALES

2.2.1 MATERIA PRIMA

Se utilizó como materia prima el bagazo de caña en esta investigación, el cual se recolectó en la provincia de Los Ríos en el cantón Quevedo.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 TRATAMIENTO MECÁNICO

El tratamiento mecánico se realizó con el bagazo de caña con el fin de reducir el tamaño de partícula. Como referencia se tomó el POE (Procedimiento operativo estandarizado) CNIB-001, realizado en el Centro Neotropical para investigación de Biomasa.

2.3.1.1 MATERIALES

- Guillotina
- Recipiente de plástico
- Molino manual

2.3.1.2 EQUIPOS

- Estufa marca Spelab 562542 con control de temperatura $70 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Molino de bolas marca Retsch MM 400

2.3.1.3 PROCEDIMIENTO

Se cortó el desecho lignocelulósico en la guillotina y se molió en un molino manual. El producto fue colocado en un recipiente de plástico y llevado a la estufa marca Spelab a 70°C por 12 horas. El material lignocelulósico seco se molió en un molino de bolas marca Retsch a una frecuencia de 30 Hz durante 10 minutos.

La muestra obtenida de la molienda se pasó por un tamiz de tamaño inferior a 100µm durante cinco minutos.

2.3.2 PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO

El pretratamiento físico-químico se realizó en un reactor de presión marca Parr. Las condiciones en las que se realizó el pretratamiento fueron las apropiadas para la transformación de la celulosa cristalina en celulosa amorfa. Como referencia se tomó el POE (Procedimiento operativo estandarizado) CNIB-002, realizado en el Centro Neotropical para investigación de la Biomasa, el cual se basó en el procedimiento de LAP-007 elaborado por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL, por sus siglas en inglés).

2.3.2.1 MATERIALES

- Papel aluminio
- Tubos de 1,5 ml marca eppendorff
- Papel filtro

- Matraces erlenmeyer de 1 000 ml
- Vasos de precipitación

2.3.2.2 EQUIPOS

- Balanza analítica sensible a 0,1 mg
- Estufa marca Spelab 562542 con control de temperatura $70 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Reactor marca Parr modelo 4331
- Centrifuga marca Dynac 297C

2.3.2.3 REACTIVOS

- Ácido sulfúrico 1%
- Agua destilada

2.3.2.4 PROCEDIMIENTO

Se pesaron 10 gramos de biomasa molida y seca, la que se mezcló en 90 gramos de H_2SO_4 al 1%, es decir un sustrato en proporción 1:10. Se sometió a temperaturas de 160°C y 170°C y a una presión de 100 psi por 10', 20' y 30' en un reactor marca Parr 4331.

Posteriormente se centrifugó el contenido del reactor en una centrífuga marca Dynac 297C por 15 minutos a 6 000 rpm. El sobrenadante se recogió en tubos de 1,5 ml para los análisis químicos y el residuo obtenido se lavó con 1 000 ml de agua destilada en un matraz erlenmeyer de 1 000 ml y se filtró. El residuo lavado se llevó a la estufa marca Spelab a 70°C durante 12 horas.

2.3.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

2.3.3.1 OBJETIVO

Se realizó la hidrólisis enzimática con el fin de determinar cuál es el tratamiento que produce una mayor concentración de azúcares. Una vez obtenido este resultado, se experimentó con otro Kit de enzimas Cellic®, para comprobar si se puede degradar mayor cantidad de celulosa amorfa para transformarla en glucosa.

La hidrólisis enzimática se realizó mediante el método del POE (Procedimiento operativo estandarizado) CNIB-003, realizado en el Centro Neotropical para investigación de la Biomasa, el cual se basó en el procedimiento de LAP-009 elaborado por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL, por sus siglas en inglés).

2.3.3.1 MATERIALES

- Frascos de vidrio capacidad 100 ml
- Tubos de 1,5 ml marca eppendorff
- Espátula
- Pipetas de 5 ml
- Puntas para pipeta de 5 ml
- Vasos de precipitación
- Papel indicador pH

2.3.3.2 EQUIPOS

- Balanza analítica sensible a 0,1 mg

- Cámara de flujo laminar marca Labconco
- Incubadora con agitación marca Labnet 311DS
- Centrífuga marca Sigma

2.3.3.3 REACTIVOS

- Tampón citrato de sodio 0,5 M pH 4.8
- Enzimas Biomass Kit¹ (Celulasas, β -Glucosidasa, Endoxilanasas)
- Enzimas Cellic[®] Kit (C-Tec y H-Tec)

2.3.3.4 PROCEDIMIENTO

Se pesaron 5 gramos de biomasa en frascos de vidrio de 100 ml. Se añadieron 5 ml de tampón citrato de sodio de pH 4.8 concentración 0,5 M. Una mezcla de sólido correspondiente al 15% . Este proceso se efectuó en una cámara de flujo laminar marca Labconco. Se controló que el pH de las muestras se ubique dentro de un rango de 4,8 y 5,3 para la óptima actividad de las enzimas. Posteriormente se añadieron las enzimas de biomass kit¹ en una proporción de 0,5 g/L bajo mechero y en la cámara de flujo.

¹ Biomass Kit: Enzimas que atacan la cadena de azúcar de la celulosa para liberar azúcares monoméricos para la fermentación. NS50013 Cellulase complex, NS50010 β -Glucosidase y NS50030 Xylanase

Estas muestras fueron colocadas en una incubadora con agitación Labnet 311DS a 55°C durante 72 horas y 300 rpm. Una vez que transcurrieron las 72 horas se tomaron muestras en tubos de 1,5 ml y se colocaron en una centrifuga marca sigma durante 30 minutos en una centrífuga de precisión 11 444 rpm.

Una vez obtenido el tratamiento que produjo mayor concentración de glucosa, se utilizaron enzimas del kit Cellic® (C-Tec y H-Tec), las cuales se añadieron de acuerdo a la densidad de las enzimas y el porcentaje de sólidos (15%) utilizado para el experimento.

2.3.4 FERMENTACIÓN

La fermentación se realizó mediante el método del POE (Procedimiento operativo estandarizados) CNIB- 004, realizado en el Centro Neotropical para investigación de la Biomasa.

2.3.4.1 MATERIALES

- Tubos de plástico de 50 ml
- Espátula
- Mechero
- Papel toalla

2.3.4.2 EQUIPOS

- Balanza analítica sensible a 0,1 mg
- Centrifuga marca Sigma
- Cámara de flujo laminar marca Labconco
- Incubadora con agitación marca Labnet 311DS

2.3.4.3 REACTIVOS

- YPD² (Yeast extract, peptone, dextrose)
- YNB³ (Yeast Nitrogen Base)
- Agua destilada
- Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.4.4 PROCEDIMIENTO

Previo a la fermentación se realizó una aclimatación de las levaduras *S. cerevisiae*, es decir que las levaduras fueron expuestas a concentraciones crecientes de mosto a lo largo de 48 horas: Día 1: 50% mosto + 50% YPD en caldo y Día 2: 100% mosto

² YNB (Yeast Nitrogen Base) es una fuente de nitrógeno que sirve de alimento para las levaduras durante el proceso de fermentación. Contiene sales, vitaminas, oligoelementos y aminoácidos.

³ YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) es una fuente orgánica para el crecimiento adecuado de levaduras.

Se añadió YNB (Yeast Nitrogen Base) en una proporción de 3% al sobrenadante obtenido en la hidrólisis enzimática, además se colocó la solución en tubos de 50ml dentro de la cámara de flujo laminar y con el mechero encendido. Posteriormente en una incubadora con agitación marca labnet 311DS a 35°C y 300 rpm se colocaron las muestras hasta que la fuente de nitrógeno se homogenice perfectamente.

Se tomaron muestras correspondientes al control del proceso de fermentación o tiempo cero de fermentación. Luego se colocó la levadura y se tomaron muestras cada 24 horas para los análisis químicos. .

En el proceso de fermentación se utilizó la levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* ya que de acuerdo al perfil de fermentación de este microorganismo CLQCA Int-005 (ver Anexo 1), fermenta a la glucosa con una alta eficiencia.

2.3.6 SACARIFICACIÓN SIMULTÁNEA Y FERMENTACIÓN EN BATCH

El método de SSF se realizó tomando como referencia el protocolo LAP-008 elaborado por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL por sus siglas en inglés).

2.3.6.1 MATERIALES

- Frascos de vidrio capacidad 100 ml
- Papel toalla
- Espátula

- Agitador de vidrio
- Lámpara de alcohol

2.3.6.2 EQUIPOS

- Balanza analítica sensible a 0,1 mg
- Cámara de flujo laminar marca Labconco
- Incubadora con agitación marca Labnet 311DS

2.3.6.3 REACTIVOS

- Extracto de levadura 1%
- Peptona 2%
- Enzimas kit Cellic® (C-Tec y H-Tec)
- *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.6.4 PROCEDIMIENTO

Se realizó el pretratamiento físico-químico siguiente el procedimiento del punto 2.3.2, bajo las condiciones de 160°C, 10' y presión de 100 psi. Se colocó la muestra obtenida del pretratamiento en un frasco de vidrio de capacidad 100 ml con enzimas, fuente de nitrógeno (extracto de levadura y peptona) y levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a 50°C de temperatura, pH de 4.8 para la estabilización y respuesta adecuada de las enzimas y se

colocó en una incubadora con agitación a 300 rpm durante 24 horas. Una vez obtenida la muestra, se analizó por HPLC.

2.3.7 SACARIFICACIÓN SIMULTÁNEA Y FERMENTACIÓN CONTINUA

El método de SSF se realizó tomando como referencia el protocolo LAP-008 elaborado por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL por sus siglas en inglés).

2.3.7.1 MATERIALES

- Frascos de vidrio capacidad 100 ml
- Papel toalla
- Espátula
- Agitador de vidrio
- Lámpara de alcohol

2.3.7.2 EQUIPOS

- Balanza analítica sensible a 0,1 mg
- Cámara de flujo laminar marca Labconco
- Incubadora con agitación marca Labnet 311DS
- Reactor marca Bioflo®/ Celligen® 310 de capacidad 3L

2.3.7.3 REACTIVOS

- Extracto de levadura 1%
- Peptona 2%
- Enzimas kit Cellic® (C-Tec y H-Tec)
- *Saccharomyces cerevisiae*
- Metabisulfito de sodio

2.3.7.4 PROCEDIMIENTO

Se realizó el pretratamiento físico-químico siguiente el procedimiento del punto 2.3.2, bajo las condiciones de 160°C, 10' y presión de 100 psi. Se colocó la muestra obtenida del pretratamiento en el reactor marca Bioflo®/Celligen® 310 de capacidad 3L con enzimas, fuente de nitrógeno (extracto de levadura y peptona) y levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a 30°C de temperatura, agitación de 300 rpm, pH de 4,8 para la estabilización y acción correcta de las enzimas hasta obtener 1.2 L del volumen total y la estabilidad del mosto. Una vez que se obtuvo esta cantidad, se siguió alimentando con mosto pretratado y sacando la muestra para el análisis cromatográfico. Todo este procedimiento se siguió durante 22 días.

Para evitar contaminación se colocó metabisulfito de sodio 0,4 g en el mosto hidrolizado y fermentado.

2.3.8 MÉTODOS QUÍMICOS PARA ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS

2.3.8.1 ANÁLISIS DE AZÚCARES TOTALES POR REFRACTOMETRÍA

El método de refractometría se realizó de acuerdo al protocolo elaborado en el Centro Neotropical para investigación de la Biomasa (CNIB-006) basado en la determinación de azúcares totales.

2.3.8.1.1 MATERIALES

- Papel toalla
- Pipeta de 1 ml
- Puntas para pipetas de 1 ml

2.3.8.1.2 EQUIPOS

- Refractómetro de Abbe marca Optic ivymen System
- Centrifuga marca Sigma

2.3.8.1.3 REACTIVOS

- Agua destilada

2.3.8.1.4 PROCEDIMIENTO

Se realizó una curva de calibración con una solución de glucosa (Anexo 2) en concentraciones de 4 g/L, 17 g/L, 30 g/L, 44 g/L, 57 g/L, 70 g/L, 83 g/L, 97 g/L, 110 g/L, 123 g/L, 136 g/L, 149 g/L, 163 g/L, 176 g/L, 189 g/L, 202 g/L, 215 g/L, 228 g/L, 242 g/L, 255 g/L, para la cuantificación de los datos obtenidos del análisis de las muestras.

Los mostos obtenidos en el pretratamiento físico-químico, hidrólisis enzimática y fermentación se centrifugaron durante 30 minutos. Para realizar la lectura de las muestras en el refractómetro de Abbe, se colocaron 100 μ L de agua destilada para encerrar al equipo en el compartimento de muestras, luego se limpió con una toalla de papel y se colocó la muestra a analizar.

2.3.9.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR ESPECTROFOTOMETRÍA (MÉTODO DEL ÁCIDO 3,5 DINITROSALICÍLICO)

El método de la reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico se siguió mediante el procedimiento descrito en el libro de Química Analítica, capítulo *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar* descrito por Gail Miller, página 426-428.

2.3.9.2.1 MATERIALES

- Frascos de vidrio capacidad 250 ml
- Celda de cuarzo

- Papel toalla
- Agua destilada
- Pipeta de 1 ml
- Tubos de 1,5 ml
- Gradilla para microtubos de 1,5 ml
- Reverbero
- Envase de plástico

2.3.9.2.2 EQUIPOS

- Espectrofotómetro marca Thermospectronic Helios β
- Centrifuga marca sigma

2.3.9.2.3 REACTIVOS

- Ácido 3,5 dinitrosalicílico⁴
- Tampón acetato de sodio 0,005N
- Agua destilada
- Hielo

⁴ La preparación de los reactivos se encuentra en el Anexo 4.

2.3.9.2.4 PROCEDIMIENTO

Se realizó una curva de calibración con una solución de glucosa (Anexo 3) en concentraciones de 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,9 mg/mL, 1 mg/mL, para la cuantificación de los datos obtenidos del análisis de las muestras.

Las muestras obtenidas del pretratamiento físico-químico, hidrólisis enzimática y fermentación se centrifugaron durante 30 minutos. Se realizó una dilución de la muestra de 1:5 (200 μ L de la muestra y 800 μ L del tampón acetato de sodio 0,005M) para muestras del pretratamiento físico químico y 1:10 (10 μ L de la muestra y 800 μ L del tampón acetato de sodio 0,005M) para mostos de la hidrólisis enzimática y fermentación. Después de la dilución de la muestra, se colocó en tubos de 1,5 ml 100 μ L de la muestra, 300 μ L de tampón acetato de sodio 0.005M, pH 6 y 600 μ L del reactivo DNS, de igual manera se trató el tubo control para la lectura de las muestras pero se puso 400 μ L de tampón acetato de sodio 0,005 M y 600 μ L del reactivo DNS. Los tubos con los reactivos se los llevó a ebullición durante 5 minutos, luego se colocó en baño de hielo durante 5 minutos para posteriormente realizar la lectura en el Espectrofotómetro marca Thermospectronic Helios β a una longitud de onda de 540 nm.

Para la cuantificación de las muestras se realizó la curva de calibración con estándar de glucosa al 1% y las diluciones de cada concentración. (Anexo 3).

2.3.9.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA “HPLC”

El método para el análisis de la composición química de las muestras obtenidas durante el proceso de obtención de etanol combustible de segunda generación y la calibración fueron desarrolladas por personal de la empresa representante de Agilent Technologies en Ecuador, Fielquimec, en base a aplicaciones de columnas de la marca Phenomenex para el análisis de azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación.

2.3.9.3.1 MATERIALES

- Viales de capacidad 1,5 ml
- Jeringas de 3 ml
- Filtro de tamaño 0,22 μm
- Pipetas
- Puntas para pipetas
- Tapas con septum para viales
- Columna Rezex Roa Organic Acid (Anexo 5)

2.3.9.3.2 REACTIVOS

- Ácido sulfúrico 0,005N
- Agua tipo I
- Estándar certificado de azúcares y productos de fermentación marca Supelco (Anexo 6)
- Estándar de inhibidores de fermentación

2.3.9.3.3 EQUIPOS

- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Marca Agilent Technologies modelo 1200

2.3.9.3.4 PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y MÉTODO DE INYECCIÓN

Las muestras obtenidas de los proceso de pretratamiento fisico-químico, hidrólisis enzimática y fermentación se centrifugaron durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró por una membrana de 0,22 μm y se realizó la dilución con la fase móvil H_2SO_4 0,005 N en los viales para HPLC.

La muestra se inyectó, de forma automática, con la ayuda de una aguja y llevada a la columna por medio de la fase móvil.

2.3.9.3.5 CONFIGURACIÓN CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIENCIA Y MODO DE OPERACIÓN

Para el análisis de azúcares y productos de fermentación obtenidos a partir de los tratamientos realizados al bagazo de caña, se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia marca Agilent Technologies series 1200, el cual está equipado con una columna de intercambio iónico marca phenomenex con iones H^+ 8% de dimensión 300 x 7.8 mm .

El detector es de índice de refracción y fase móvil H_2SO_4 0,005 N para azúcares y productos de fermentación y H_2SO_4 0,01 N para inhibidores de fermentación. Las

condiciones con las que operó el cromatografo líquido de alta eficiencia se muestran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Condiciones de operación del cromatografo líquido de alta eficiencia para azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación.

Muestra	Temperatura	Flujo	Fase móvil	Dimensiones de la columna	Detector	Tiempo de corrida	Volumen de muestra
Azúcares	79 °C	0,6 ml/min	H ₂ SO ₄ 0.005 N	300 x 7.8 mm Rezex ROA H ⁺	IR	25 min	10 µL
Productos de fermentación	79 °C	0,6 ml/min	H ₂ SO ₄ 0.005 N	300 x 7.8 mm Rezex ROA H ⁺	IR	25 min	10 µL
Inhibidores de fermentación	55 °C	0,6 ml/min	H ₂ SO ₄ 0.01 N	300 x 7.8 mm Rezex ROA H ⁺	IR	50 min	50 µL

2.3.9.3.6 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO

Para realizar el análisis cualitativo y cuantitativo se realizó una curva de calibración con el estándar mix fuel etanol marca Supelco con soluciones patrones de concentración conocida. El mix está compuesto de: glicerol 1g/L, d-glucosa 2,01 g/L, celobiosa 2,01 g/L, celotriosa 1,04 g/L, ácido láctico 0,31 g/L, ácido acético 0,10 g/L, dextrina 3,34 g/L y etanol 11,96 g/L. Se realizó diluciones de 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100 para obtener la curva de calibración. (Anexo 6)

Para los inhibidores de fermentación se realizó la curva de calibración con estándares de furfural y 5-hidroximetilfurfural con soluciones patrón de concentración conocida. Las

concentraciones fueron de: 0,2 mg/mL, 0,26 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,57 mg/mL y 2 mg/mL.

(Anexo 6)

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

3.1.1 BAGAZO DE CAÑA

3.1.1.1 PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO

La cuantificación de los resultados obtenidos por el método de refractometría (Tabla 3.1) se verificó en base a la curva de calibración realizada para este método. En la tabla 3.2 se observa los valores obtenidos por el método de espectrofotometría DNS que se verificó en base a la curva de calibración realizada. En la tabla 3.3 se observa los valores obtenidos por el método de cromatografía líquida de alta eficiencia que se verificó en base a la curva de calibración realizada.

Tabla 3.1 Determinación de azúcares mediante refractometría

Tratamientos	Grados Brix	Grados Brix H ₂ SO ₄	Grados Brix Corregidos	g/L de azúcar
160° 10'	5,0	1,6	3,4	25,54
160° 20'	5,1	1,6	3,5	27,15
160° 30'	4,9	1,6	3,3	24,74
170° 10'	5,3	1,6	3,7	29,56
170° 20'	5,2	1,6	3,6	27,96
170° 30'	5,3	1,6	3,7	29,56

Tabla 3.2 Determinación de azúcares mediante el método de espectrofotometría DNS

Tratamientos	Absorbancia DNS	Dilución (1:50)	g/L de azúcar
160° 10'	0,141	50	15,66
160° 20'	0,204	50	19,5
160° 30'	0,114	50	14,01
170° 10'	0,151	50	16,27
170° 20'	0,185	50	18,39
170° 30'	0,048	50	10,03

Tabla 3.3 Determinación de azúcares reductores mediante HPLC

Tratamientos	Glucosa g/L	Xilosa g/L	Azúcar Total g/L
160° 10'	7,66	24,7	32,36
160° 20'	7,34	15,99	23,33
160° 30'	7,1	10,88	17,98
170° 10'	8,77	13,55	22,32
170° 20'	8,44	6,24	14,68
170° 30'	9,72	4,02	13,73

3.1.1.2 ANÁLISIS DE INHIBIDORES DE FERMENTACIÓN

El análisis de inhibidores de fermentación se realizó en la fracción líquida del pretratamiento físico-químico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC. En la tabla 3.4 se observan los datos del análisis de los inhibidores los cuales se cuantificaron mediante la curva de calibración obtenida de los inhibidores de fermentación.

Tabla 3.4 Determinación de inhibidores de fermentación por HPLC

Tratamiento	HMF g/L	Furfural g/L	Ácido Acético g/L
160° 10'	0,00037	0,0015	4,90
160° 20'	0,00040	0,0029	4,64
160° 30'	0,00060	0,0041	4,58
170° 10'	0,00045	0,0031	3,97
170° 20'	0,00086	0,0051	3,25
170° 30'	0,00080	0,0066	3,47

3.1.1.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El rendimiento de las enzimas del Kit Biomass® se realizó por medio del método de refractometría, espectrofotometría y HPLC. En la tabla 3.5 se observan los valores obtenidos de los azúcares totales por refractometría, los cuales se cuantificaron en base a la curva de calibración obtenida. En la tabla 3.6 se observan los valores obtenidos de los azúcares reductores por DNS, los cuales se cuantificaron en base a la curva de calibración obtenida. En la tabla 3.7 se observan los valores obtenidos de los azúcares totales por HPLC, los cuales se cuantificaron en base a la curva de calibración obtenida.

Tabla 3.5 Determinación de azúcares mediante refractometría.

Tratamientos	Grados Brix	g/L de azúcar
160° 10'	18,6	208,50
160° 20'	20,8	235,84
160° 30'	19,3	217,74
170° 10'	20,7	234,63
170° 20'	20,8	235,44
170° 30'	21,0	237,45
Control	17,0	190,00

Tabla 3.6 Determinación de azúcares reductores mediante espectrofotometría

Tratamientos	Absorbancia DNS	Dilución (1:100)	g/L de azúcar
160° 10'	0,602	100	87,57
160° 20'	0,551	100	81,43
160° 30'	0,586	100	85,70
170°10'	0,549	100	81,11
170° 20'	0,493	100	74,31
170° 30'	0,424	100	65,93
Control	0,166	100	34,37

Tabla 3.7 Determinación de azúcares totales mediante HPLC (%15 sólidos)

Tratamientos	Glucosa g/L	Celotriosa g/L	Celobiosa g/L	Dextrina g/L	Xilosa g/L	Azúcar Total g/L
160° 10'	101,93	2,11	4,97	17,63	0,92	127,55
160° 20'	65,92	1,73	3,59	16,85	1,46	89,56
160° 30'	79,29	1,26	3,22	17,13	0,84	101,74
170°10'	67,03	1,86	3,94	16,25	1,30	90,37
170° 20'	61,16	1,90	3,57	16,50	1,20	84,33
170° 30'	65,78	1,67	3,17	16,68	1,07	88,38
Control	19,83	0,84	0,00	15,24	8,69	44,60

3.1.1.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON ENZIMAS DEL KIT CELLIC ®

Se realizó la hidrólisis enzimática del tratamiento que se obtuvo una alta concentración de glucosa, en el bagazo de caña (ver tabla 3.7), con dos tipos de enzimas del kit Cellic® (C-Tec y H-Tec). En la tabla 3.8 se observan los valores obtenidos de los azúcares totales por refractometría, los cuales se cuantificaron en base a la curva de calibración obtenida. En la tabla 3.9 se observan los valores obtenidos de los azúcares reductores por DNS, los cuales se cuantificaron en base a la curva de calibración obtenida. En la tabla 3.10 se observan los valores obtenidos de los azúcares totales por HPLC, los cuales se cuantificaron en base a la curva de calibración obtenida.

Tabla 3.8 Determinación de azúcares mediante refractometría

BAGAZO DE CAÑA		
Tratamientos	Grados Brix	g/L de azúcar
R1 160°10'	19,30	217,34
R2 160°10'	19,20	216,14
R3 160°10'	18,90	212,52
Promedio 160°10'	19,13	215,33

Tabla 3.9 Determinación de azúcares reductores mediante espectrofotometría

BAGAZO DE CAÑA			
Tratamientos	Absorbancia DNS	Dilución	g/L de azúcar
R1 160°10'	0,609	100	88,47
R2 160°10'	0,610	100	88,59
R3 160°10'	0,612	100	88,83
Promedio 160°10'	0,610	100	88,63

Tabla 3.10 Determinación de azúcares mediante HPLC

Tratamientos y Repeticiones	Glucosa g/L	Celotriosa g/L	Celobiosa g/L	Dextrina g/L	Xilosa g/L	Azúcar Total g/L
R1 160°10'	136,84	1,82	7,03	1,68	nd	147,37
R2 160°10'	127,35	1,37	6,66	1,65	nd	137,03
R3 160°10'	126,00	1,80	6,06	1,65	nd	135,51
Promedio 160°10'	130,06	1,66	6,58	1,66	nd	139,97

* nd= no detectado

3.1.1.5 FERMENTACIÓN

El rendimiento de fermentación se realizó por el método de HPLC. En la tabla 3.11 se observan los datos obtenidos de los productos de fermentación los cuales se cuantificaron por medio de la curva de calibración realizada.

Tabla 3.11 Determinación de productos de fermentación mediante HPLC

Tiempo de Fermentación	0 horas		24 horas	
	Glucosa g/L	Etanol g/L	Glucosa g/L	Etanol g/L
R1 160° 10'	136,84	0	nd	49,18
R2 160° 10'	127,35	0	nd	54,87
R3 160° 10'	126,00	0	nd	52,22
Promedio 160° 10'	130,06	0	nd	52,09

* nd= no detectado

3.1.1.6 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA EN BATCH

En la tabla 3.12 se observa los datos obtenidos del análisis por HPLC del proceso de sacarificación y fermentación simultánea en batch. El proceso fue monitoreado cada 24 horas.

Tabla 3.12 Determinación de productos de fermentación en la SSF en batch del bagazo de caña por HPLC

Tratamientos y Repeticiones	Glucosa g/L	Celotriosa g/L	Celobiosa g/L	Dextrina g/L	Xilosa g/L	Etanol g/L
R1 160°10'	0,00	0,87	1,41	3,61	0,00	48,20
R2 160°10'	0,00	1,02	1,78	4,39	0,53	58,80
R3 160°10'	0,00	0,95	1,55	3,89	0,00	52,47
Promedio 160°10'	0,00	0,95	1,58	3,96	0,18	53,16

3.1.1.7 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA EN CONTINUO

En la tabla 3.13 se observa el resultado de los azúcares y etanol obtenido en el proceso de sacarificación simultánea y fermentación continua del bagazo de caña que se experimentó. El proceso fue monitoreado durante 22 días, y se analizó diariamente el contenido de etanol obtenido.

Tabla 3.13 Determinación de azúcares y productos de fermentación en la SSF del bagazo de caña por HPLC

Días	D-Glucosa g/L	Glicerol g/L	Ac. Acético g/L	Etanol g/L	% Sólidos añadidos
0	46,74	0	nd	0	15%
1	1,02	0,26	nd	29,8	15%
2	nd	2,84	nd	30,81	15%
3	nd	3,08	nd	33,99	15%
4	nd	2,6	nd	29,48	15%
5	nd	2,77	nd	35,32	15%
6	nd	3	nd	36,6	15%
7	nd	2,84	nd	33,36	15%
8	nd	2,67	nd	35,5	15%
9	nd	3	nd	36,52	15%
10	nd	3,06	nd	39,85	15%
11	nd	3,56	nd	38,66	15%
12	nd	3,15	nd	41,18	15%

13	nd	3,13	nd	39,98	25%
14	nd	3,41	nd	42,52	25%
15	nd	3,76	nd	46,22	25%
16	nd	4,09	nd	48,52	25%
17	nd	3,88	nd	51,13	25%
18	nd	4,28	nd	54,64	25%
19	nd	4,19	nd	52,54	25%
20	nd	4,64	nd	58,04	25%
21	nd	4,82	nd	59,00	25%
22	nd	4,96	nd	62,23	25%

* nd= no detectado

3.1.1.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la tabla 3.14 se observan los resultados obtenidos del análisis estadístico de los datos obtenidos en el pretatamiento físico-químico y en la hidrólisis enzimática del análisis realizado por HPLC.

Tabla 3.14 Análisis estadístico del pretratamiento físico-químico y la hidrólisis enzimática de los datos obtenidos del bagazo de caña por HPLC

Desecho	Tratamiento	Análisis	Temperatura	Tiempo	Medias	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Caña	Físico-Químico	HPLC	160°	10 min	7,66	0,9878765	12,8965602
			160°	20 min	7,34	0,0984886	1,34180624
			160°	30 min	7,1	0,1096966	1,54502185
			170°	10 min	8,77	0,6206717	7,07721413
			170°	20 min	8,44	0,6062178	7,18267515
			170°	30 min	9,72	0,4534681	4,66530985
Caña	Enzimático	HPLC	160°	10 min	101,93	5,4445692	5,34147862
			160°	20 min	65,92	7,1689911	10,8752899
			160°	30 min	79,29	7,797444	9,83408251
			170°	10 min	67,03	1,4981322	2,23501741
			170°	20 min	61,16	0,952523	1,557428
			170°	30 min	65,78	2,2021429	3,34773928
			Control		19,83	1,9457903	9,81235667

3.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.2.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN OBTENIDAS PARA LOS MÉTODOS CON LOS QUE SE REALIZÓ EL ANÁLISIS QUÍMICO

3.2.1.1 REFRACTOMETRÍA

En la tabla 3.15 se muestra los valores de grados brix obtenidos para las diferentes concentraciones de estándar de glucosa con las que se elaboró la curva de calibración para la medición de azúcares disueltos en las muestras obtenidas.

Tabla 3.15 Valores de concentración y grados brix con los que se realizó la curva de calibración para el análisis por refractometría.

Concentración g/L de azúcar	°Brix
4	1,6
17	2,7
30	3,8
44	4,9
57	6
70	7,1
83	8,2
97	9,3
110	10,4
123	11,5
136	12,6
149	13,7
163	14,8
176	15,9
189	17
202	18,1
215	19,2
228	20,3
242	21,4
255	22,5

En la figura 3.1 se observa la curva de calibración con la que se realizó la cuantificación de la concentración de azúcares totales de las muestras del pretratamiento físico-químico y de la hidrólisis enzimática.

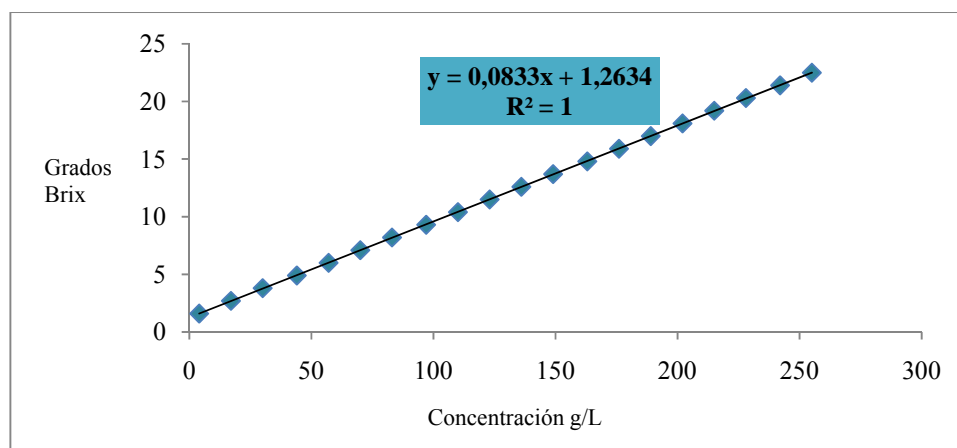


Figura 3.1 Curva de calibración utilizada para la cuantificación de grados brix

El coeficiente de correlación (R^2) para la curva de calibración de la figura 3.1 es superior a 0.98, lo cual indica que el error es menor al 2% y la curva se considera adecuada para la cuantificación de grados brix de las muestras.

3.2.1.2 ESPECTROFOTOMETRÍA

En la tabla 3.16 se muestra los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones de estándar de glucosa con las que se elaboró la curva de calibración para la medición de azúcares reductores en las muestras obtenidas.

Tabla 3.16 Valores de concentración y absorbancia con los que se realizó la curva de calibración para el análisis por espectrofotometría.

Concentración mg/ml	Absorbancia
0,2	0,052
0,3	0,131
0,4	0,212
0,5	0,292
0,6	0,371
0,7	0,452
0,8	0,541
0,9	0,620
1	0,710

En la figura 3.3 se observa la curva de calibración con la que se realizó la cuantificación de la concentración de azúcares reductores de las muestras del pretratamiento físico-químico y de la hidrólisis enzimática.

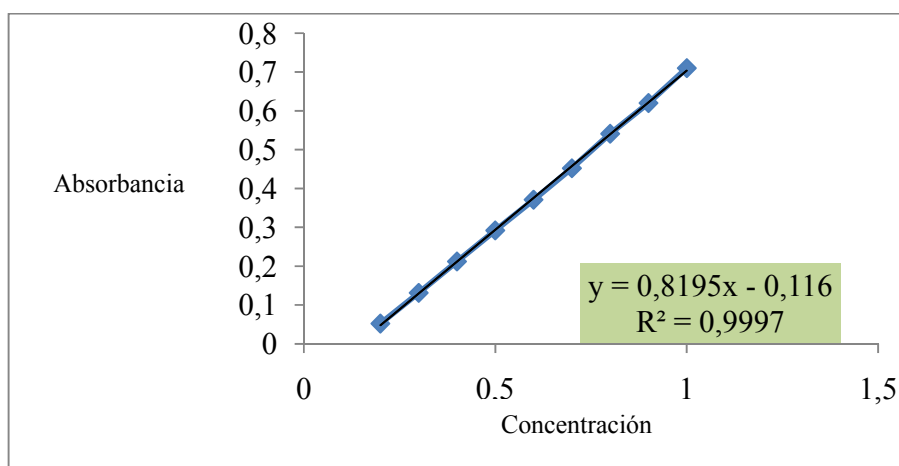


Figura 3.3 Curva de calibración utilizada para la cuantificación de azúcares reductores.

El coeficiente de correlación (R^2) para la curva de calibración de la figura 3.2 es superior a 0.98, lo cual indica que el error es menor al 2% y la curva se considera adecuada para la cuantificación de absorbancia de las muestras.

3.2.1.2 HPLC

En el anexo 6 se observan las curvas de calibración realizadas con el estándar mix fuel etanol de la marca supelco para el análisis de azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación.

Para todos los azúcares y productos de fermentación el coeficiente de correlación (R^2) para la curva de calibración es superior a 0.98, lo cual indica que el error es menor al 2% y la curva se considera adecuada para la cuantificación de las áreas obtenidas de las muestras.

3.2.2 PRETRATAMIENTO FÍSICO QUÍMICO

Los datos obtenidos por el método de refractometría de la cantidad de azúcares totales en el pretratamiento físico-químico, que se observan en la tabla 3.1, tienen una alta variación con respecto al método de DNS y HPLC (ver Tabla 3.2 y 3.3). Esta variación podría explicarse debido a la composición compleja de las muestras analizadas, ya que el índice de refracción de la muestra se altera por la presencia de ácidos, inhibidores de fermentación y otras sustancias disueltas en el mosto. Por esta razón, se puede decir que este método no es recomendable para la cuantificación de azúcares en el caso de muestras complejas como es el caso de las analizadas en este trabajo.

La hemicelulosa está unida a una matriz de lignina por enlaces tipo éter y éster que son susceptibles al ataque de ácidos [25], por lo que se hidroliza durante el pretratamiento físico-químico. Por el contrario, la celulosa, es más resistente al ataque ácido ya que está encapsulada por la lignina y la hemicelulosa y la hidrólisis de esta en el pretratamiento no es factible. Por este motivo, los análisis obtenidos en el pretratamiento físico-químico del bagazo de caña (ver tabla 3.3) muestran una alta predominancia de xilosa y no de glucosa.

3.2.3 INHIBIDORES DE FERMENTACIÓN

Después de los análisis realizados por HPLC de la fracción líquida del pretratamiento físico-químico del bagazo de caña, se observó una baja concentración de furfural y 5-hidroximetilfurfural; por otra parte se obtuvo una alta concentración de ácido acético, debido a que este compuesto se produce por la hidrólisis de los grupos acetilos de la hemicelulosa [17].

El furfural y el 5-hidroximetilfurfural son producidos por la reacción de xilosa y glucosa en medios fuertemente ácidos bajo presencia de calor, ya que en el pretratamiento físico-químico el producto predominante es xilosa, entonces se explica el hecho de que la concentración de furfural sea mayor con relación a la de 5-hidroximetilfurfural (proveniente de glucosa) en el pretratamiento como se indica en la tabla 3.4.

3.2.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

El contenido de celulosa en la estructura del bagazo de caña (~50% [35]), influye directamente con relación a la concentración de glucosa obtenida luego del tratamiento enzimático. Con relación a otros desechos lignocelulósicos, como el raquis de palma que la producción de glucosa corresponde al 42.03% (datos proyecto RESETA), el bagazo de caña tiene un mejor rendimiento de glucosa ya que a más de tener un alto porcentaje de celulosa en su estructura, la lignina se encuentra en un bajo porcentaje, lo que permite una mayor accesibilidad para que las enzimas celulasas degraden la celulosa amorfa.

El pretratamiento que produjo mayor eficiencia en la producción de azúcares en el bagazo de caña fue 160 °C, 10' como se observa en la figura 3.2 con las enzimas de Biomass Kit, la cual tuvo un pretratamiento previo con ácido, presión y altas temperaturas para la modificación de la celulosa cristalina en celulosa amorfa. Por esta razón se puede observar que el tratamiento control, sin ningún tipo de pretratamiento, produjo bajas cantidades de glucosa, lo que indica que es necesario siempre modificar la estructura de los desechos lignocelulósicos.

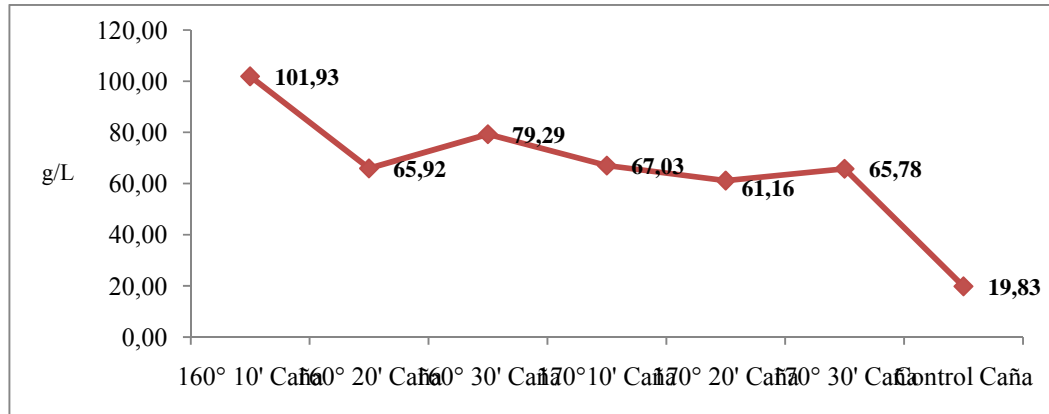


Figura 3.2 Comparación de los tratamientos enzimáticos de bagazo de caña por medio de la utilización de las enzimas Biomass Kit

Una vez obtenido el tratamiento que produjo una mayor concentración de glucosa, se experimentó con un nuevo Kit de enzimas, Cellic®, las cuales dieron una mayor concentración de glucosa en el tratamiento 160°10' (ver figura 3.3), debido a que tienen una mayor capacidad de degradar a la celulosa amorfa proveniente del pretratamiento físico-químico.

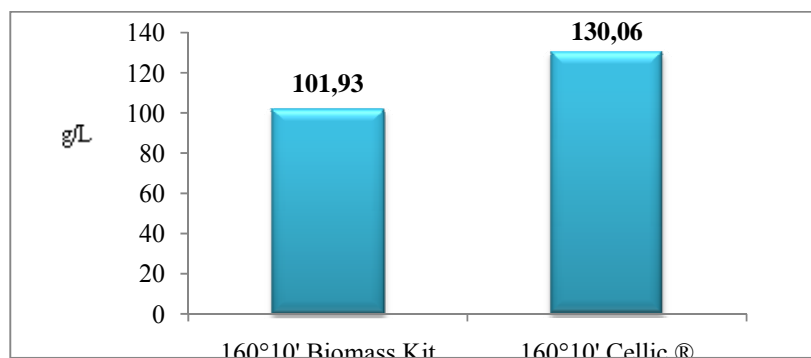


Figura 3.3 Comparación de los tratamientos enzimáticos con diferentes kits de enzimas

3.2.5 FERMENTACIÓN

Teóricamente 1 gramo de glucosa produce 0.511 gramos de etanol y 0.488 gramos de dióxido de carbono [14], pero no se obtiene este rendimiento ya que todos los microorganismos utilizan parte de la glucosa para su anabolismo por lo que el rendimiento de etanol es inferior al teórico, siendo que el rendimiento ideal rodea a $0.48 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$.

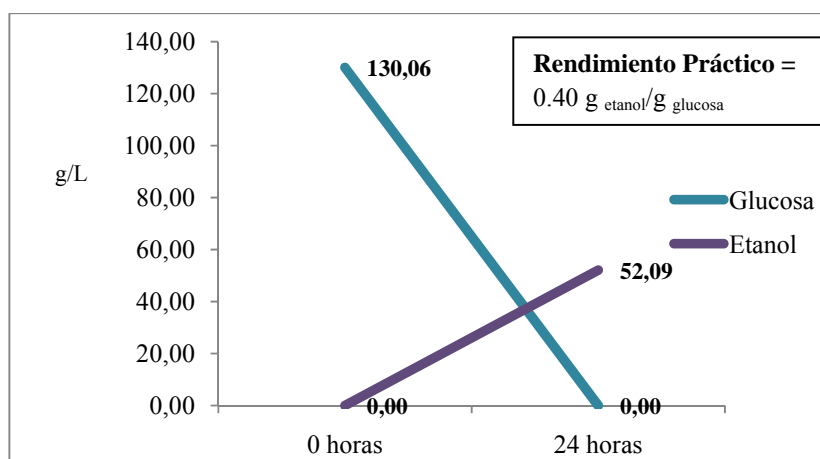


Figura 3.4 Obtención de etanol a partir de glucosa a las 24 horas del proceso de fermentación.

En la figura 3.4 se observa la concentración de etanol obtenido al cabo de 24 horas. El rendimiento que se produce es de $0.40 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$, lo cual indica que la mayor parte del carbono consumido por la levadura se convierte a etanol, sin embargo existen otros productos de fermentación (ver figura 3.5) que consume también carbono. Adicionalmente el metabolismo de otras macromoléculas toma parte del flujo de carbono.

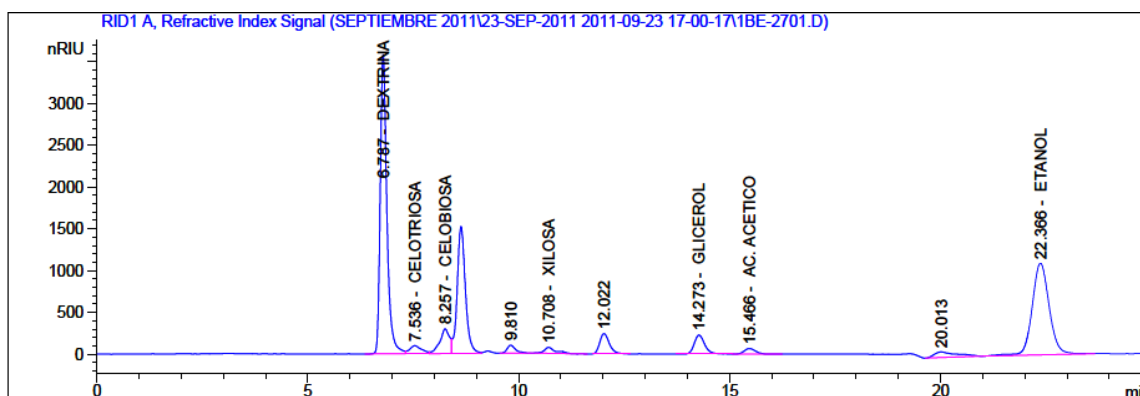


Figura 3.5 Cromatograma del bagazo de caña en el que se observan los productos de fermentación

3.2.6 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA EN BATCH

En la tabla 3.12 se observa que el proceso de SSF en batch produce una mayor concentración de etanol con relación a la fermentación por etapas. La concentración de etanol es mayor debido a que se realiza el proceso consecutivamente, lo que resulta más efectivo y así de esta manera se evita la contaminación.

3.2.7 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA EN CONTINUO (SSFC)

Con el proceso adaptado a partir del protocolo LAP-009 (NREL) el mismo que fue denominado Sacarificación y Fermentación Simultánea en Continuo o SSFC, se obtuvo un alto porcentaje de etanol (ver figura 3.6), con relación a los dos procesos mencionados anteriormente. Este tipo de procesos es optimizado y más eficiente debido al aumento de la productividad de las levaduras tomando en cuenta el pH óptimo y la temperatura [22].

Este tipo de procesos se puede utilizar con una mayor concentración de biomasa en peso seco, realizando primero una prehidrólisis a 50 °C con enzimas celulasas de la mezcla al 15% una vez licuados se añade 10% concentrando la cantidad de glucosa.

La SSFC permite un ahorro de enzimas debido a que el proceso contempla la adición diaria de un volumen del 10% del volumen total del fermentado continuo, donde ya se encuentran enzimas activas añadidas en alimentaciones anteriores.

La mayor concentración de etanol en la SSFC en relación a procesos mencionados anteriormente, se da por efecto de la mayor disponibilidad de celulosa añadida en la alimentación diaria al bioreactor.

El tiempo de fermentación en la SSFC es menor frente al co-proceso de sacarificación en batch y por etapas que se demora 72 horas, mientras que en continuo al retirarse el 10% se consigue una mayor eficiencia en la fermentación y una mayor cantidad de glucosa, para que posteriormente se pueda seguir fermentando.

En este proceso, con relación a los otros dos mencionados anteriormente se evita la contaminación bacteriana, ya que la elevada concentración de etanol no permite que crezcan microorganismos.

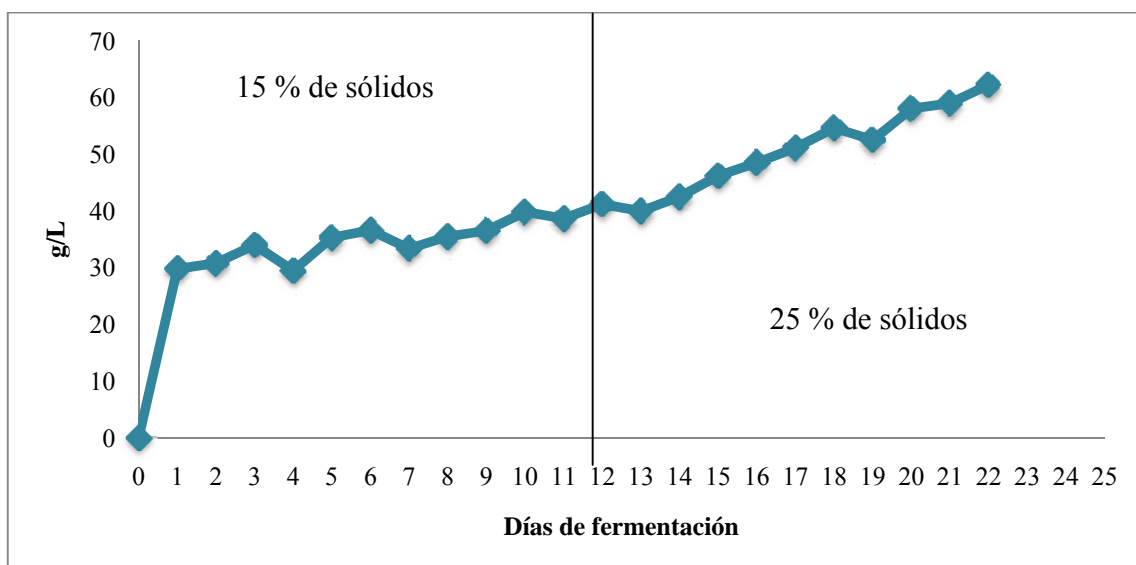


Figura 3.6 Concentración de etanol lignocelulósicos obtenido a partir del proceso de SSFC con dos porcentajes de sólidos

3.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos de los desechos lignocelulósicos demuestra que existe un alto coeficiente de variación entre los datos obtenidos de las tres repeticiones, lo cual significa que varios factores afectan a esta variabilidad, por ejemplo: el tipo de suelo, la temperatura, la cosecha, el porcentaje de humedad, entre otros factores.

A pesar de la alta variación de este coeficiente, de acuerdo a algunos modelos estadísticos como el SPSS, indica que para experimentos de tipo biológicos un coeficiente de variación correspondiente a 20% se considera aceptable dentro del rango de variabilidad en estos experimentos.

El coeficiente de variación, se puede ver afectado por alguno factores dentro del laboratorio, tales como: microorganismos, temperatura, agitación, pH, entre otros, los cuales producen esta alta variación.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

Los inhibidores de fermentación resultantes de pretratamiento físico-químico, se encuentran en bajas concentraciones debido al ácido sulfúrico que se utiliza al 1%. Pezoa (2010) explica que cantidades superiores al 2% elevan la obtención de compuestos inhibidores de fermentación, lo cual indica que el pretratamiento seguido en esta investigación es adecuado para la posterior fermentación de azúcares, sin problemas de inhibición.

La concentración de la xilosa es superior a la glucosa y otros azúcares que se disuelven en el pretratamiento físico-químico, por lo que se debería buscar algún tipo de técnica que permita fermentar a este compuesto obtenido, así se podría evitar la utilización de enzimas.

El desarrollo de los métodos por HPLC que se utilizaron para la determinación de azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación fueron comprobados mediante las diferentes curvas de calibración realizadas (Anexo 6) con el estándar Supelco Mix Fuel Ethanol para azúcares y productos de fermentación y Furfural y 5-hidroximetilfurfural para inhibidores de fermentación, las cuales dieron el coeficiente de correlación > 0.999 indicando que la relación es directa entre los datos obtenidos y que se puede cuantificar los valores de las muestras de los mostos dentro de los rangos de la curva de calibración.

El contenido de celulosa y lignina es un factor importante en el proceso de obtención de glucosa y posteriormente de etanol. Si se tiene un alto contenido de celulosa, se obtiene en una alta concentración de glucosa, pero si se tiene un alto contenido de lignina el rendimiento de glucosa es inferior.

El bagazo de caña es el desecho que produce una mayor concentración de glucosa, con relación a otros desechos (datos proyecto RESETA), lo cual produce una alta concentración de etanol al final del proceso.

El microorganismo utilizado para el proceso de fermentación (*Saccharomyces cerevisiae*), es eficiente, ya que al cabo de 24 horas se consume toda la glucosa obtenida a partir del tratamiento con enzimas.

Otro tipo de tratamiento como es la SSF produce un alto porcentaje de etanol, a partir de la glucosa inicial en el proceso. Este tratamiento a más de dar mejores resultados, tiene varias ventajas, tales como: aumento del rendimiento de etanol por la acción continua de las levaduras, menos equipos para el proceso, la presencia de etanol previene la contaminación del mosto que se está fermentando. [22]

4.2 RECOMENDACIONES

Se debería realizar más investigación acerca de otro tipo de desechos lignocelulósicos para la producción de etanol, ya que se pueden realizar otro tipo de tratamientos (AFEX, hidrólisis alcalina, entre otros) de acuerdo a la fibra y a la composición de celulosa y hemicelulosa que tenga en su estructura, para obtener una alta cantidad de azúcares fermentables.

En la hidrólisis enzimática se debería colocar, a más de en una incubadora con agitación, una hélice dentro del envase donde se está realizando para homogeneizar mejor la muestra y así obtener mayor cantidad de azúcar por la degradación de la celulosa en glucosa.

Se debería buscar otro tipo de enzimas que tengan una mayor degradación de la celulosa y por lo tanto se obtenga una mayor concentración de glucosa a un costo menor.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sun. Y., Cheng. J., (2002) *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*, Elsevier, Review paper, Estados Unidos.1-11
- [2] Alonso J., (2009) *Estudio del efecto de tipo, concentración de ácido y tiempo de digestión en hidrólisis de forraje de camote (Ipomoea batatas)*, Tesis, Honduras.
- [3] Carvajal Javier, Comunicación personal, (2011) Nuestra Ciencia, Quito, Ecuador.
- [4] Biomasa <<[http:// es.wikipedia.org/wiki/Biomasa](http://es.wikipedia.org/wiki/Biomasa)>> Fecha de consulta: 19 de Abril de 2011
- [5] Biomasa Lignocelulósica <<http://www.wikipedia.org/wiki/Lignocellulosic_biomass>>
Fecha de consulta: 19 de Abril de 2011
- [6] Cuervo. L., Folch. J., Quiroz. E., (2009) *Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol*, Centro de investigación en biotecnología, BioTecnología, , México.
- [7] White., A, Philip., H, Smith., E, Hill., R, Lehman., R, (1987) *Principios de bioquímica*, Mc. Graw Hill, 6ta. Edición, Madrid, España.

[8] Cheng., J., (2010) *Biomass to Renewable Energy Processes*, CRC Press Taylor & Francis Group, 2010, Estados Unidos.

[9] Hemicelulosa <<<http://www.wikipedia.org/wiki/Hemicelulosa>>> Fecha de consulta: 19 de Abril de 2011

[10] Carbohidratos ó Glúcidos, Estructura Química (2008) Antonio Zamora <<<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>>> Fecha de consulta: 19 de Abril de 2011

[11] Hendriks., Zeeman, G., (2008) *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*, Journal review, Bioresource technology, Wageningen university. 10-11.

[12] Lignina <<<http://es.wikipedia.org/wiki/Lignina>>> Fecha de consulta: 19 de abril de 2011

[13] Biocombustibles de primera generación contaminan y dañan la salud más que la gasolina, (2009) <<<http://www.ecologiablog.com/post/511/biocombustibles-de-primera->

generacion-contaminan-y-danan-la-salud-mas-que-la-gasolina>> Fecha de Consulta: 05 de Abril de 2011

[14] Galbe, M., Zacchi, G., (2007) *Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production*, Springer Verlag, Sweden. 48.

[15] Taherzahed, M., y Karimi, K., (2007) *Enzyme – based hydrolysis processes for etanol from lignocellulosic materials: a review*. BioResources, 707-738.

[16] Domínguez, J., (2005) Efectos de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de Chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Microbiología III. Madrid, España.

[17] Pezoa, R., (2010) *Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación*, Tesis magister, Universidad de Chile, Santiago de Chile.

[18] García G., (2008) *Energías del siglo XXI*, AMV ediciones, 1era. edición, Madrid, España.

[19] Demirbas, A., (2005) *Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass*, Taylor & Francis Group, Konya, Turkey.

[20] González., V., J., (2009) *Energías Renovables*, Editorial Reverté, España, Barcelona.

[21] Castaño, P., Hader, I., Mejia, G., Carlos, E., (2008) *Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de procesos de sacarificación-fermentación simultáneas (SSF)*, vol. 15 num. 2, pp. 251-258, Universidad de Antioquía, Medellín Colombia.

[22] Juri, S., (2011) *Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca*, Tesis pregrado, Universidad de Chile, Santiago de Chile.

[23] Skoog. D., Holler, F., Nieman, T. (2001) *Principios de análisis instrumental 5^a edición*, McGraw-Hill, España.

[24] Días, N., Bárcena, A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., Meléndez, F., Túnez, I., s/a, *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*, Departamento de bioquímica y biología molecular, Córdoba – Argentina.

[25] Gonçalves, C., Rodriguez, M., Gomes, N., Texeira, J., Belo, I., (2010), *Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates*, Analytical methods, The royal Society of chemistry, United States.

[26] Miller, G., (1959) *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, Analytical chemistry, vol. 31 No. 3, 31-246.

[27] Cromatografía líquida de alta eficiencia

<<<http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa>>> Fecha de consulta: 1 de Febrero de 2011

[28] Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC

<<http://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography>> Fecha de consulta: 01 de mayo de 2011

[29] Túnez, F., s/a, *Cromatografía en capa fina de lípidos*, Departamento de bioquímica y biología molecular, Facultad de medicina Universidad de Córdoba, Argentina.

[30] Manual de Agilent Technologies Serie 1200, (2008), *Bomba binaria Agilent Serie 1200*, Agilent Technologies, Alemania.

[31] Manual de Agilent Technologies Serie 1200, (2008), *Inyector automatic de alto rendimiento y microinyector automático con placa de pocillos Agilent Serie 1200*, Agilent Technologies, Alemania.

[32] McGinley, M., Mott, J., (2008) *Bioethanol production monitoring using ion exclusion HPLC with RezexTM Roa Column*, Phenomenex Inc. 1-4.

[33] Cromatografía de intercambio iónico

<<http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatograf%C3%ADa_de_intercambio_i%C3%B3nico>>

[34] Manual de Agilent Technologies Serie 1200, (2008), *Detector de longitud de onda variable G1314D/G1314E*, Agilent Technologies, Alemania.

[35] Pandey, A., Soccol, C., Nigam, P., Soccol, V., (2000) *Biotechnological potencial of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse*, review paper, Bioresource technology, Brazil.

ANEXOS

ANEXO 1: Perfil de fermentación de la especie CLQCA-Int-005

ANEXO 2: Curva de calibración grados Brix

Concentración g/L de azúcar	°Brix
4	1,6
17	2,7
30	3,8
44	4,9
57	6
70	7,1
83	8,2
97	9,3
110	10,4
123	11,5
136	12,6
149	13,7
163	14,8
176	15,9
189	17
202	18,1
215	19,2
228	20,3
242	21,4
255	22,5

Tabla 1 Concentración g/L de azúcar vs. Grados Brix para la curva de calibración

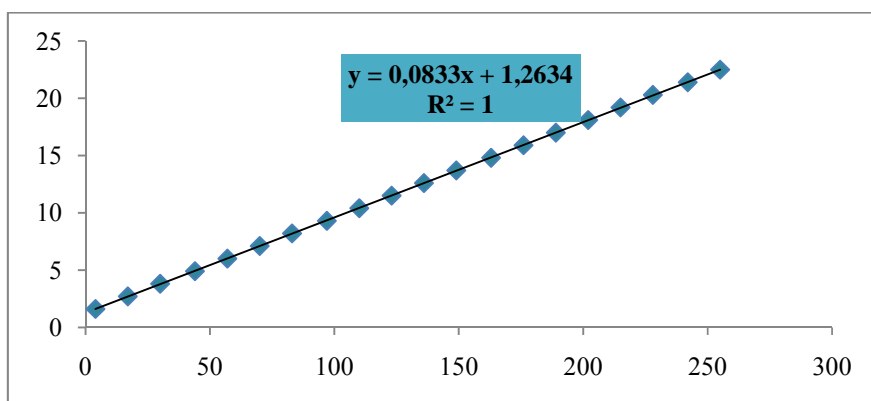


Gráfico 1 Curva de calibración grados Brix

ANEXO 3: Curva de calibración DNS

Concentración mg/ml	Absorbancia
0,2	0,052
0,3	0,131
0,4	0,212
0,5	0,292
0,6	0,371
0,7	0,452
0,8	0,541
0,9	0,620
1	0,710

Tabla 2 Concentración mg/ml de azúcar vs. Absorbancia medida

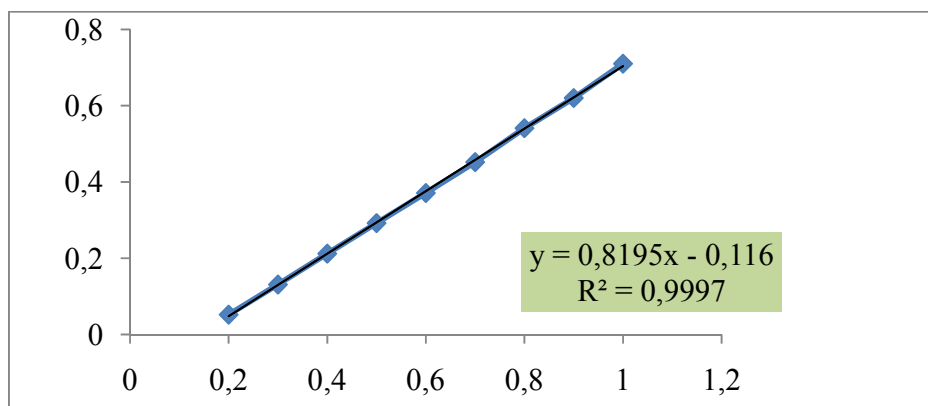


Gráfico 2 Curva de calibración DNS

ANEXO 4: Preparación de los reactivos para el método de DNS

Tampón acetato de sodio 0.05M pH 6

Acetato de sodio: Peso 82.03 g. Marca Panreac. Pureza 99%. Anhidro.

Ácido acético Glacial: Peso 60.05 g. Marca JT. Baker. Pureza 100%. Densidad 1.05 g/L.

pKa = 4.76

$$pH = pKa + \log \frac{[base]}{[ácido]}$$

$$6 = 4.76 + \log \frac{[base]}{[ácido]}$$

$$\log \frac{[base]}{[ácido]} = 1.26$$

$$\frac{[base]}{[ácido]} = \text{antilog } 1.26 = 18.197$$

$$[CH_3COONa] = 18.197[CH_3COOH]$$

Ecuación 1

$$0.05M = [ácido] + [base]$$

$$0.05M = [CH_3COOH] + [CH_3COONa]$$

Ecuación 2

Sustituyendo 1 en 2

$$0.05M = [CH_3COOH] + 19.197 [CH_3COOH] = 19.197$$

$$[CH_3COOH] = \frac{0.05M}{19.197} = 0.0026 M$$

$$[CH_3COONa] = 19.197 (0.0026M) = 0.049M$$

$$1 \text{ litro} \longrightarrow 0.049 \text{ mol}$$

Cantidad a pesar de acetato de sodio

$$1 \text{ mol } CH_3COONa \longrightarrow 82.03 \text{ g}$$

$$0.049 \text{ ml } CH_3COONa \longrightarrow x = 4.019 \text{ g de } CH_3COONa$$

Volumen de ácido acético

$$\frac{1 \text{ mol}}{60 \text{ g } CH_3COOH} \times \frac{1 \text{ g}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 16.66 M$$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{0.0026M \times 1L}{16.66 M} = 0.00015 L$$

$$1 L \longrightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$0.00015 L \longrightarrow x = \mathbf{0.15 \text{ ml}}$$

Para la preparación del tampón acetato de sodio se debe pesar 4.019 g de CH₃COONa y adicionar 0.15 ml de ácido acético glacial para ajustar el pH a 6 en 1 litro de agua destilada.

Preparación del reactivo DNS

- ✓ Preparar 40 ml de una solución 2N de hidróxido de sodio.
- ✓ Pesar en un frasco de vidrio 2 gramos de ácido 3-5 dinitrosalicílico y colocar 40 ml de la solución 2N de hidróxido de sodio.
- ✓ Añadir 100 ml de agua destilada hasta la disolución y colocar en un agitador magnético.
- ✓ Añadir 82 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado.
- ✓ Aforar a 200 ml con agua destilada.
- ✓ El frasco debe estar en un lugar fresco a temperatura ambiente y cubierto con papel aluminio.

Tomado de: Miller, G.L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry

ANEXO 5

Especificaciones de la columna Rezex Roa Organic Acids H⁺

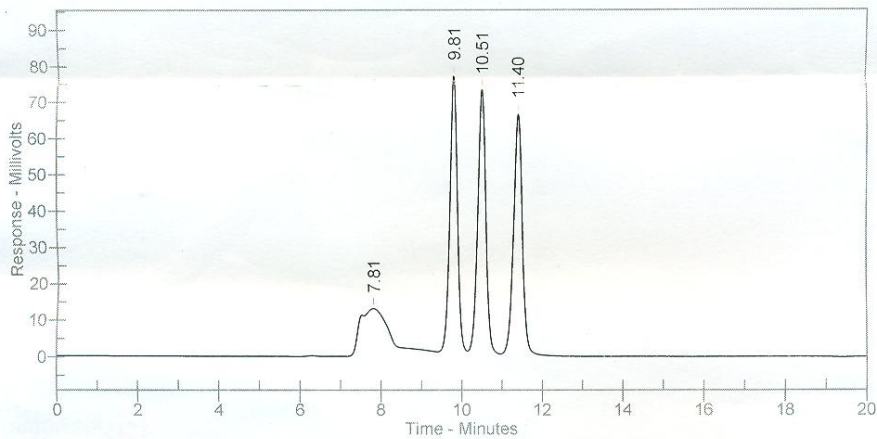
HPLC Certificate of Quality Assurance



Part No: 00H-0132-K0 Serial No.: 483679-11
 Description: Rezex RHM-Monosaccharide H+(8%) Size: 300 X 7.8 mm

Measured Parameters Based on the RIBITOL Peak

Efficiency: 45890 plates/meter k Factor: 0.461
 Peak Asym.: 0.89 Ret. Time: 11.4 minutes



Test Analytes

Peak	Analyte	Time	Area	k Factor	Width	Eff.	Asym.
1	Melezitose	7.81	706341	0.000	0.798	526	3.18
2	Glucose	9.81	1038562	0.256	0.198	13542	0.93
3	Fructose	10.51	1050656	0.346	0.212	13484	0.92
4	Ribitol	11.40	1027187	0.461	0.228	13767	0.89

Testing Condition

Mobile Phase: H2O Temperature: 85C
 Flow Rate: 0.6 mL Injection: 10 µL
 Detection: ri Back Pressure: 433 psi

Checked By: _____

Instrument: QC005

Approved By: _____

Tested: Tuesday, May 26, 2009

Printed: Tuesday, May 26, 2009



ANEXO 6: Certificación del estándar Mix Fuel Ethanol y curvas de calibración para HPLC.

Certificate of Analysis

DESCRIPTION: Fuel Ethanol Residual Saccharides Mix

CATALOG NO.: 48468-U
LOT NO.: LB-81911

MFG. DATE: Jan 2011
EXP. DATE: Jul 2012

ANALYTE	CAS NO.	PURITY (1)	WEIGHT (2)	ANALYTICAL(3)	STD.	SUPELCO
			CONCENTRATION		DEV.	LOT NO.
GLYCEROL	56-81-5	99.9	1.00	1.00	+/- 0.01	LB68608
D-(+)-GLUCOSE	50-99-7	99.9 (a)	2.00	2.01	+/- 0.01	LB75527
MALTOTRIOSE, DP3	1109-28-0	98.0 (b)	1.00	1.04	+/- 0.02	LB46201
MALTOSE MONOHYDRATE	6363-53-7	99.0 (b)	2.00	2.01	+/- 0.01	LB77643
L(+) LACTIC ACID	79-33-4	99.4 (c)	0.30	0.31	+/- 0.01	LB78812
ACETIC ACID	64-19-7	99.9	0.30	0.10	+/- 0.01	LB63026
DEXTRIN	9004-53-9	N/A (d)	3.25	3.34	+/- 0.12	LB48742
ETHANOL, ABSOLUTE	64-17-5	99.9	12.00	11.96	+/- 0.01	LB77387

(1) Determined by GC-FID unless otherwise noted.

(a) Purity.

(b) HPLC; wavelength not specified/Result supplied by vendor.

(c) HPLC UV-210nm

(d) Complex mixture, purity cannot be accurately determined.

(2) NIST traceable weights are used to verify balance calibration with the preparation of each lot.

Concentration of analyte in solution is wt / vol %, uncertainty based upon balance and Class A volumetric glassware. Weights are corrected for analytes less than 98% pure.

(3) Determined by chromatographic analysis against an independently prepared reference lot. Mean of replicate injections. Analytical values are within +/- 10% of weight concentrations.



Elwood Doughty
Quality Control Supervisor

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.



595 North Harrison Road
Bellefonte, PA 16823-0048 USA
Phone (814) 359-3441

Curvas de calibración para determinación de azúcares y productos de fermentación

Concentración de dextrina g/L	Área
327	41236,9
654	80116,8
1308	144951,6
3270	396260,8

Tabla 3 Concentración de dextrina g/L vs. Área

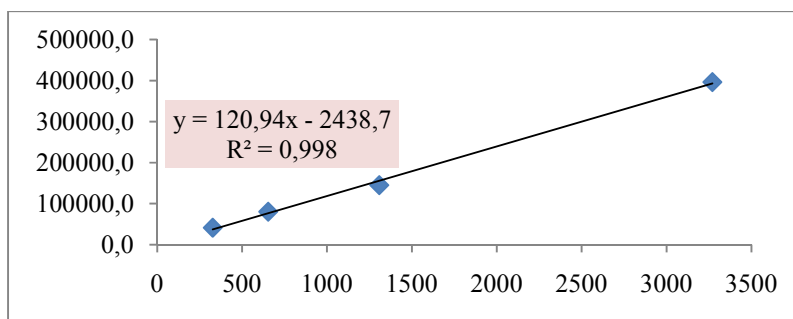


Gráfico 3 Curva de calibración de la dextrina por HPLC

Concentración de celotriosa g/L	Área
96	15037,3
192	30558,2
384	61778,8
960	156866,6

Tabla 4 Concentración de celotriosa g/L vs. Área

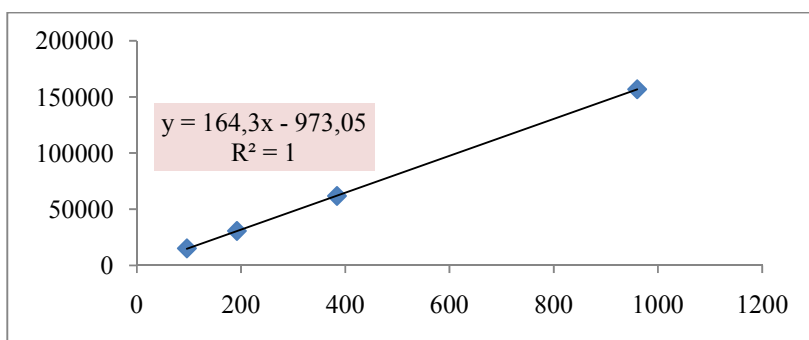


Gráfico 4 Curva de calibración de la celotriosa por HPLC

Concentración de celobiosa g/L	Área
190	27866,1
380	56788,8
760	115756,8
1900	292767,8

Tabla 5 Concentración de celobiosa g/L vs. Área

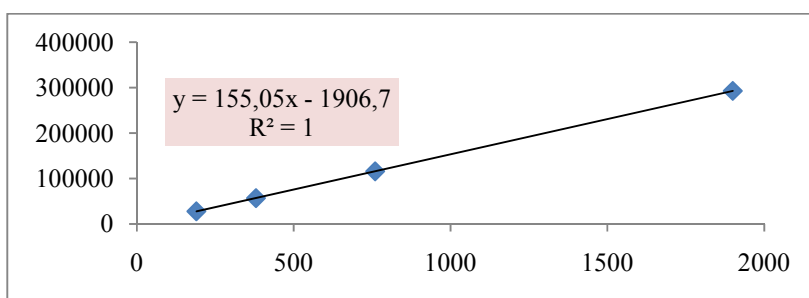


Gráfico 5 Curva de calibración de la celobiosa por HPLC

Concentración de D-glucosa g/L	Área
182	28875,9
364	58960,3
728	120038,6
1820	303155

Tabla 6 Concentración de glucosa g/L vs. Área

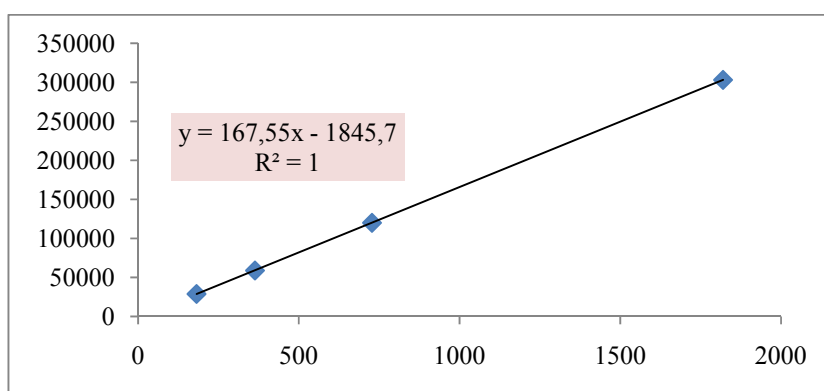


Gráfico 6 Curva de calibración de la glucosa por HPLC

Concentración de xilosa g/L	Área
200	28157,6
400	57023
800	114991,9
2000	288253,6

Tabla 7 Concentración de xilosa g/L vs. Área

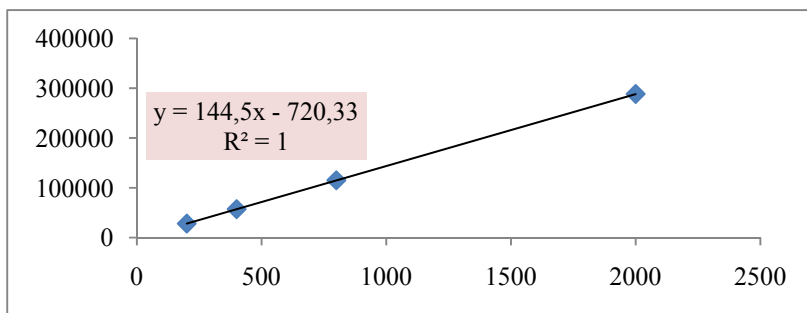


Gráfico 7 Curva de calibración de la xilosa por HPLC

Concentración de Ác. láctico g/L	Área
31	2376,4
62	5083
124	10078,6
310	25420,8

Tabla 8 Concentración de ácido láctico g/L vs. Área

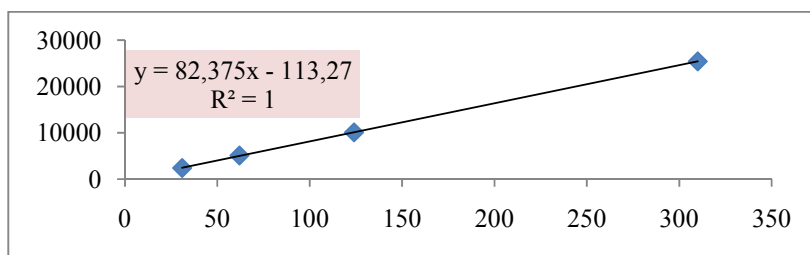


Gráfico 8 Curva de calibración del ácido láctico por HPLC

Concentración de glicerol g/L	Área
100	11369,6
200	23190,9
400	47352,6
1000	119290,5

Tabla 9 Concentración de glicerol g/L vs. Área

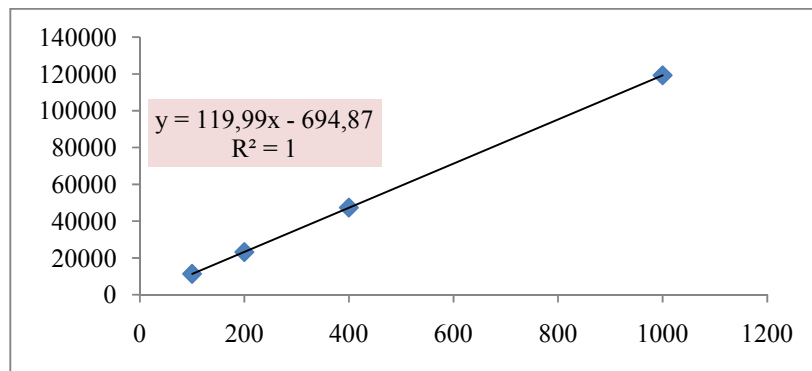


Gráfico 9 Curva de calibración del glicerol por HPLC

Concentración de Ác. Acético g/L	Área
31	1615
62	3482
124	7051,8
310	17749,3

Tabla 10 Concentración de ácido acético g/L vs. Área

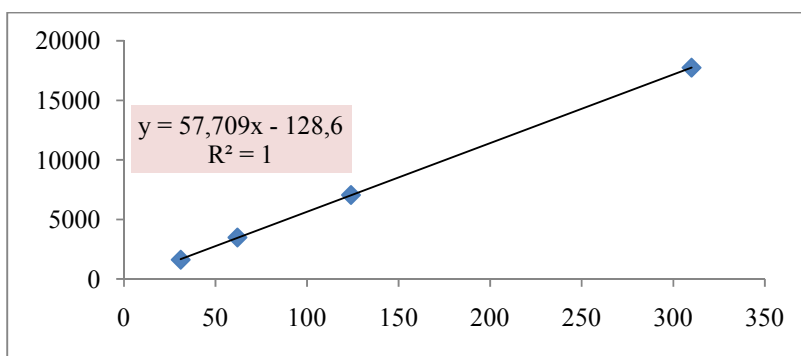


Gráfico 10 Curva de calibración del ácido acético por HPLC

Concentración de etanol g/L	Área
1263	71095,8
2526	145352,7
5052	295229,7
12630	741376,2

Tabla 11 Concentración de etanol g/L vs. Área

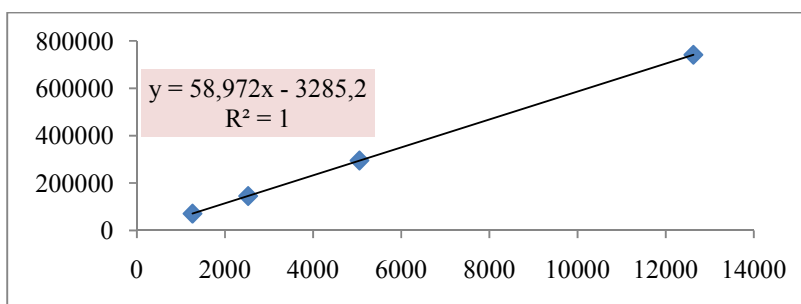


Gráfico 11 Curva de calibración del etanol por HPLC

Curvas de calibración para inhibidores de fermentación

Concentración de furfural mg/ml	Área
0,2	19354,5
0,26	26751,1
0,4	40382,6
0,57	59490,3
2	242647,3

Tabla 12 Concentración de furfural mg/ml vs. Área

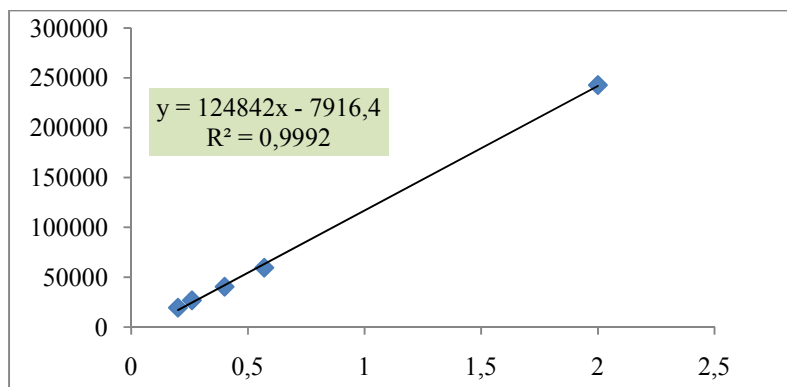


Gráfico 12 Curva de calibración del furfural por HPLC

Concentración de 5-HMF mg/ml	Área
0,2	21154,7
0,26	29581,1
0,4	41144,2
0,57	64473,4
2	199840

Tabla 13 Concentración de 5-HMF mg/ml vs. Área

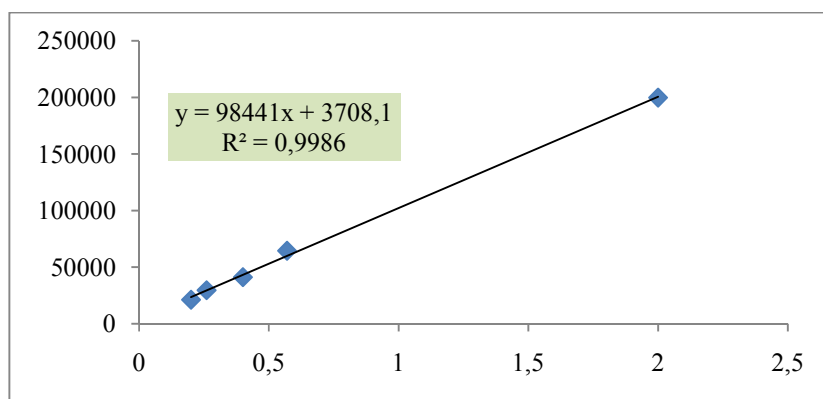
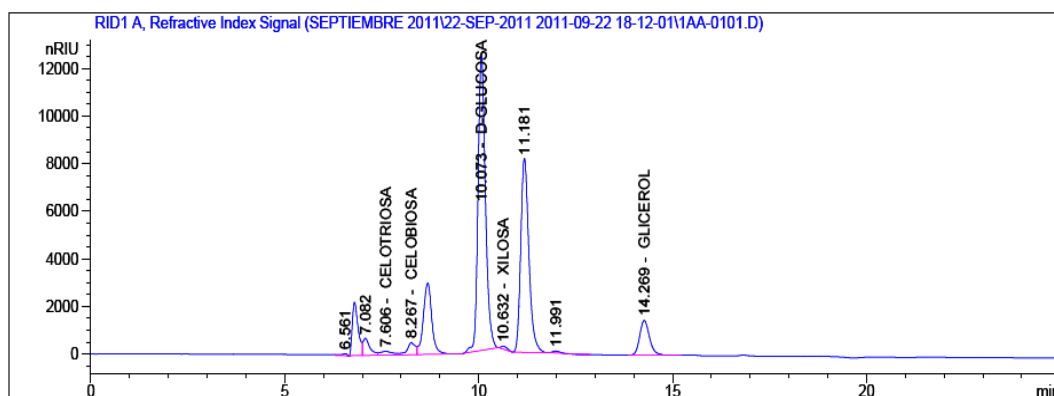
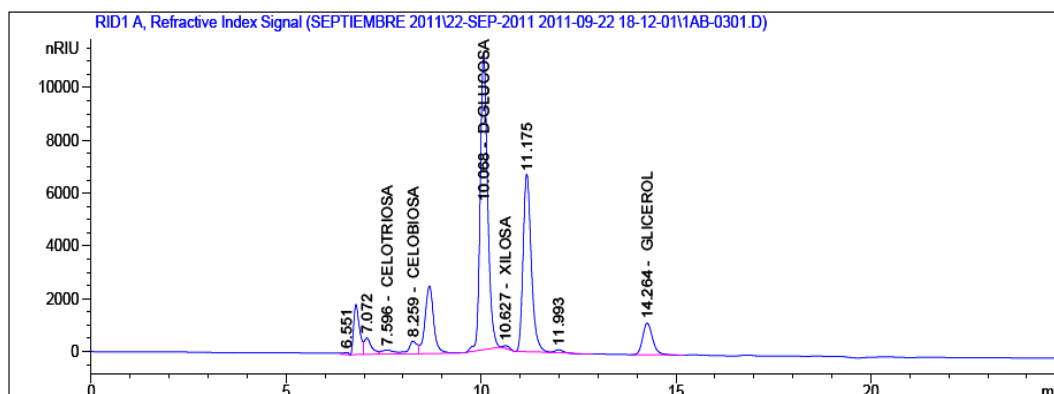


Gráfico 13 Curva de calibración de 5-HMF por HPLC

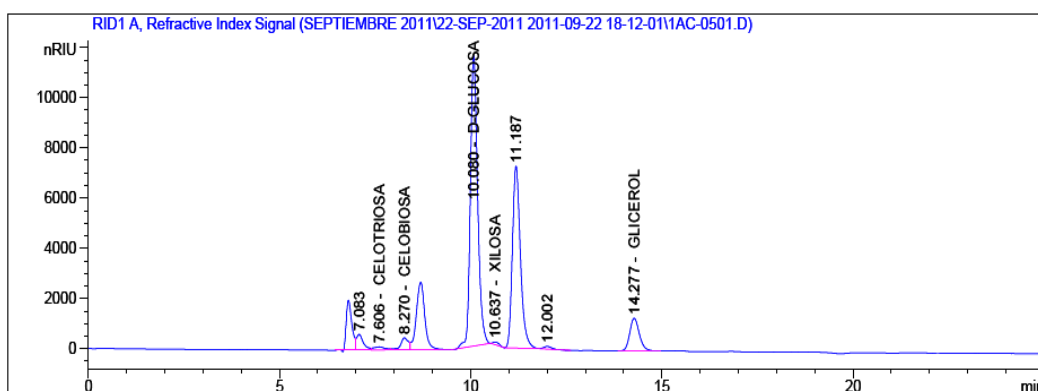
ANEXO 7: Cromatogramas obtenidos por HPLC en la hidrólisis enzimática y fermentación



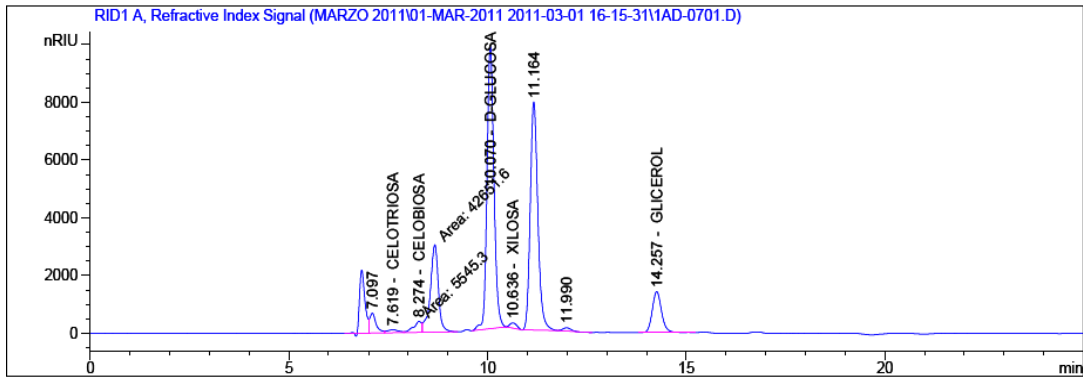
R1 160°10' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



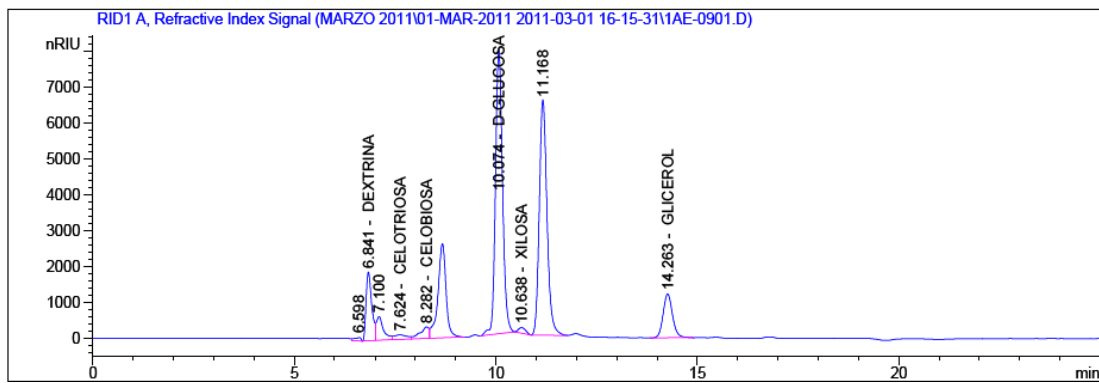
R2 160°10' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



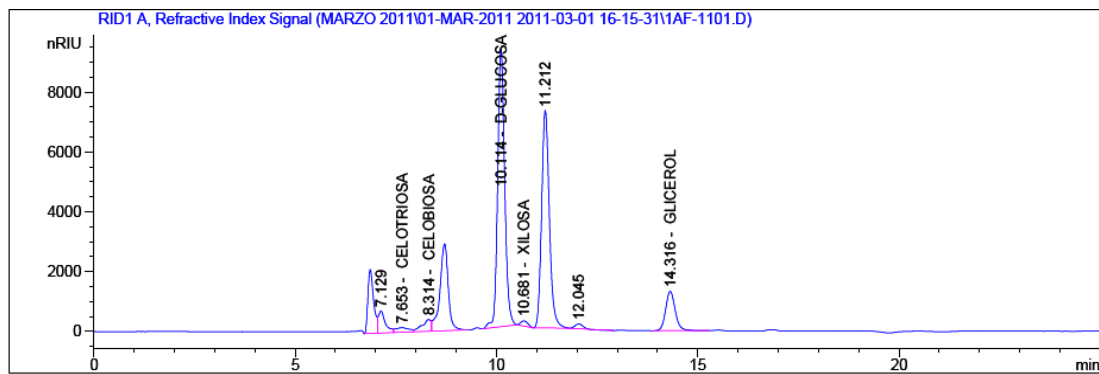
R3 160°10' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



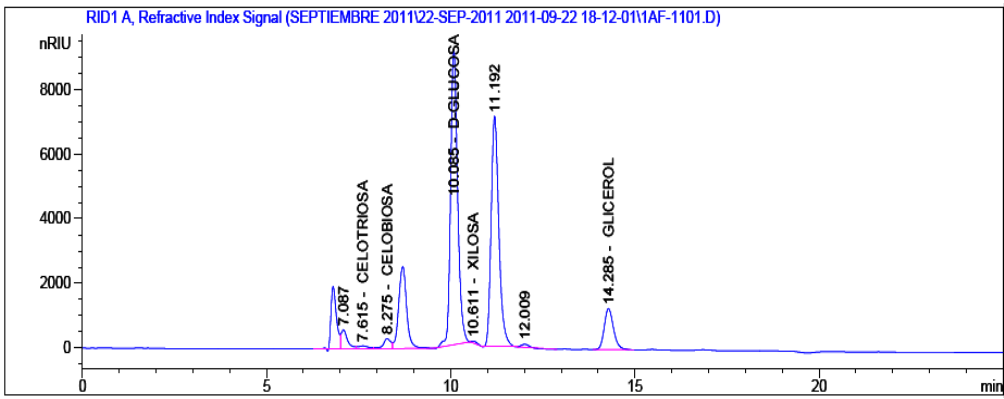
R1 160°20' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



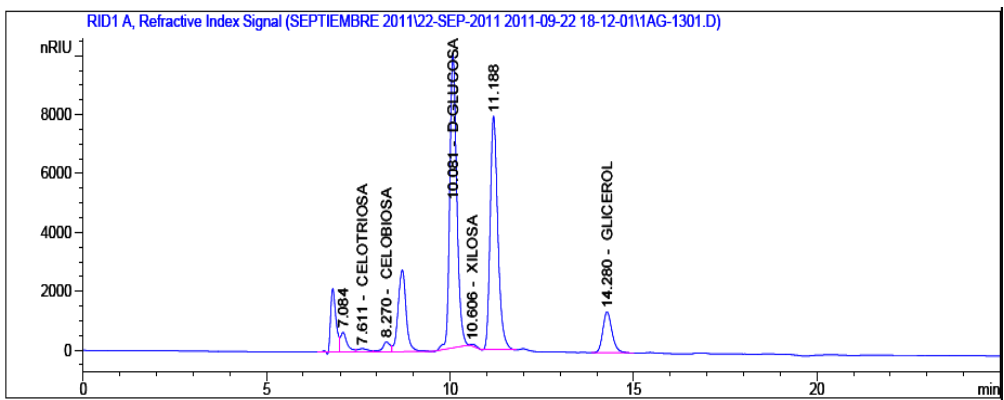
R2 160°20' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



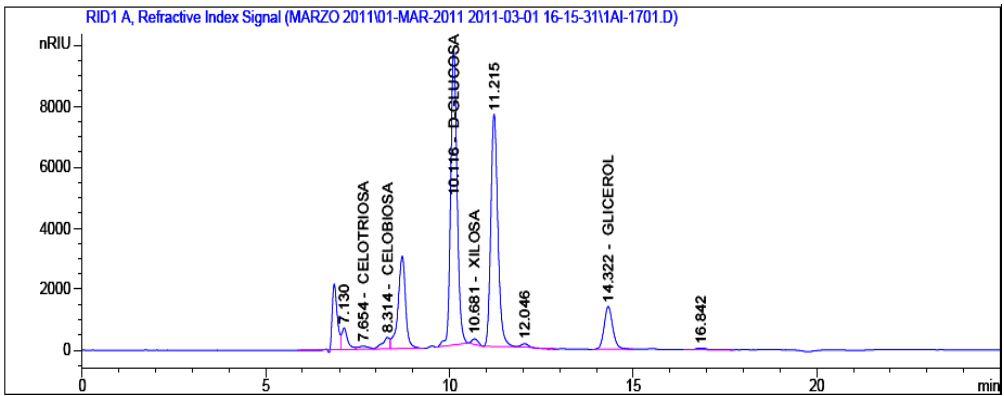
R3 160°20' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



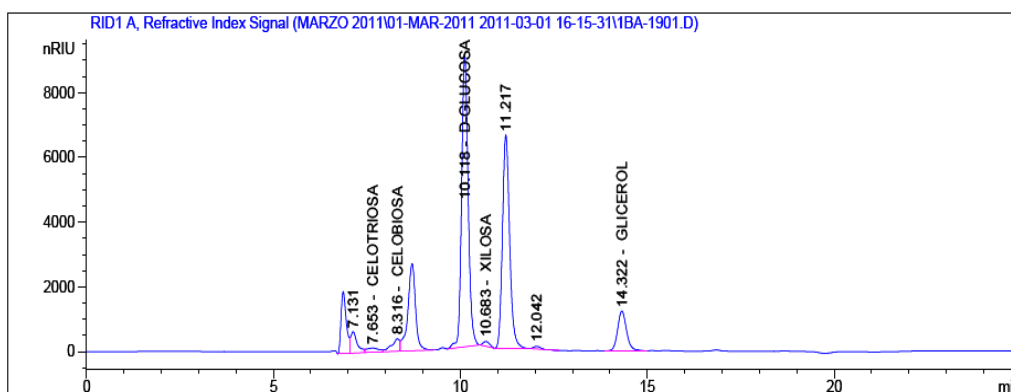
R1 160°30' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



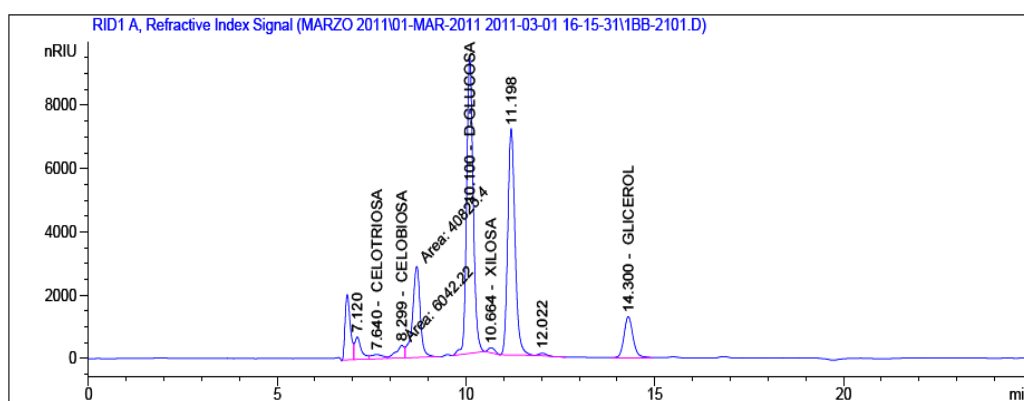
R2 160°30' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



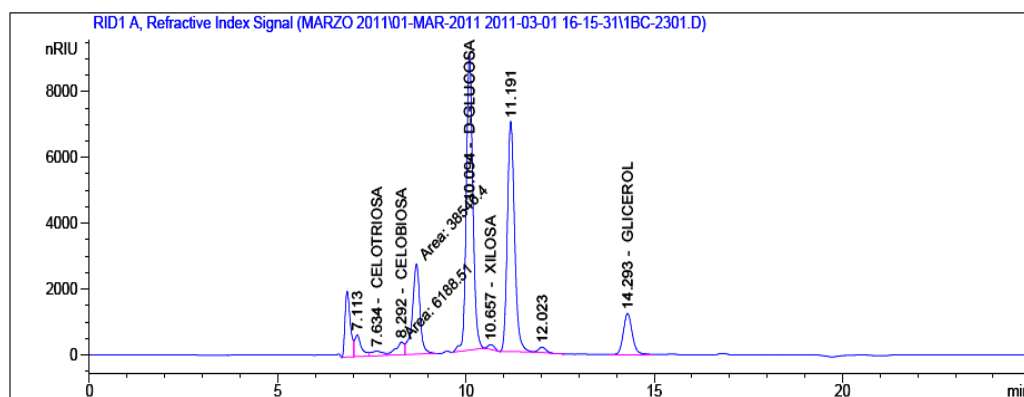
R3 160°30' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



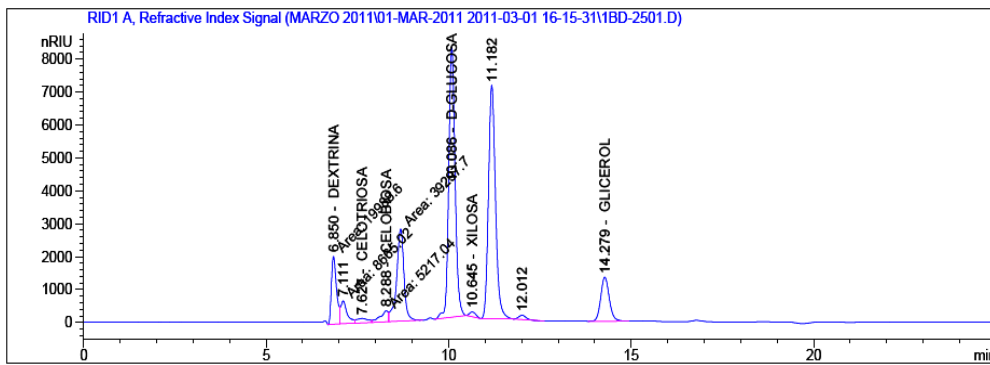
R1 170°10' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



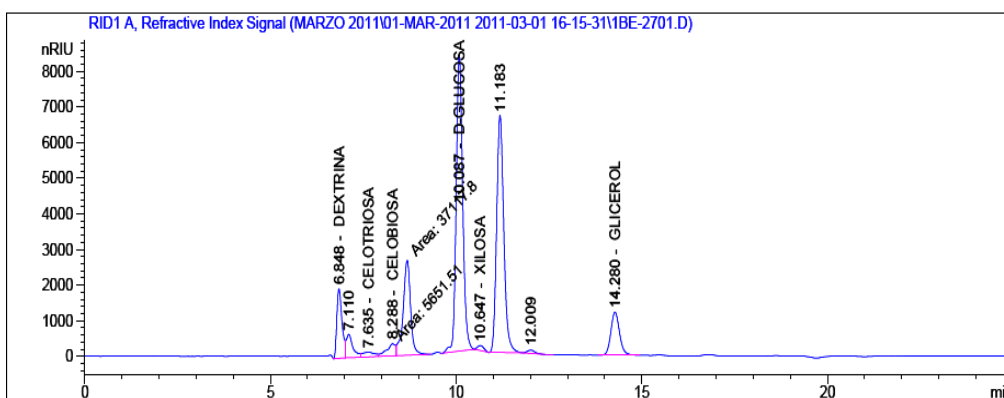
R2 170°10' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



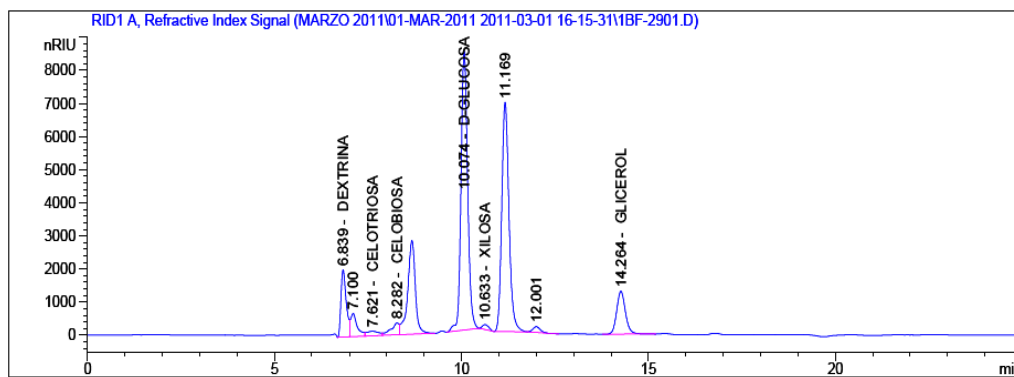
R3 170°10' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



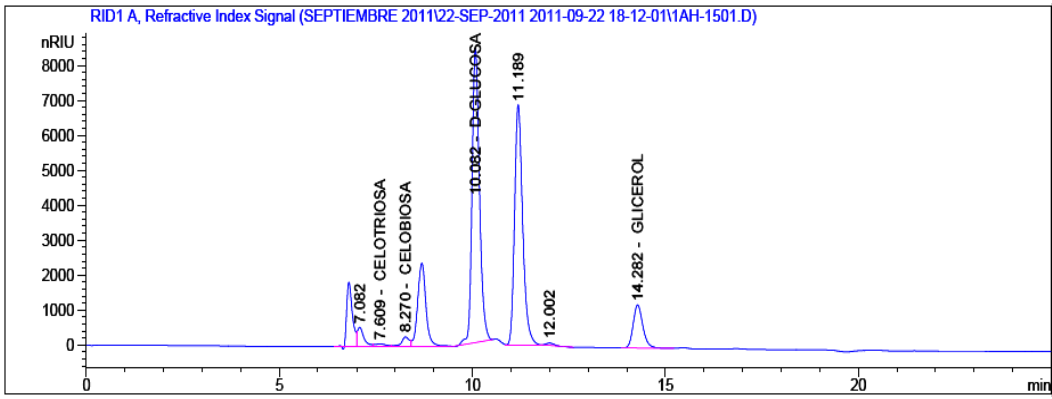
R1 170°20' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



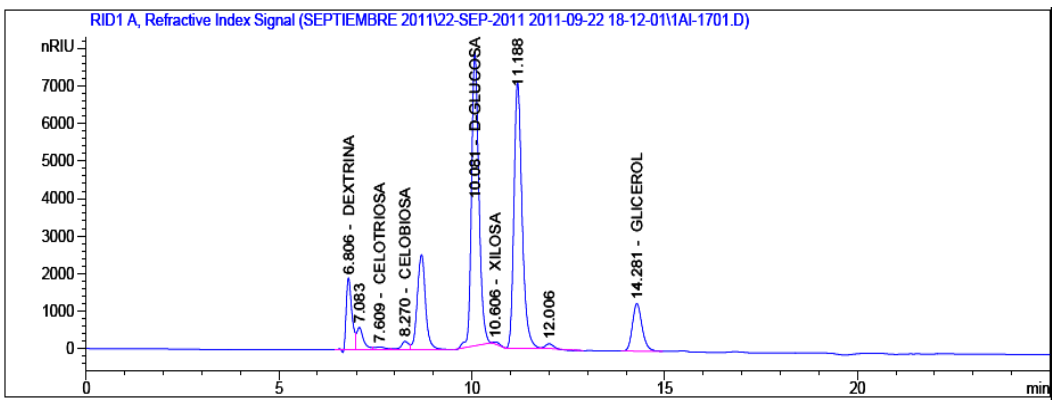
R2 170°20' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



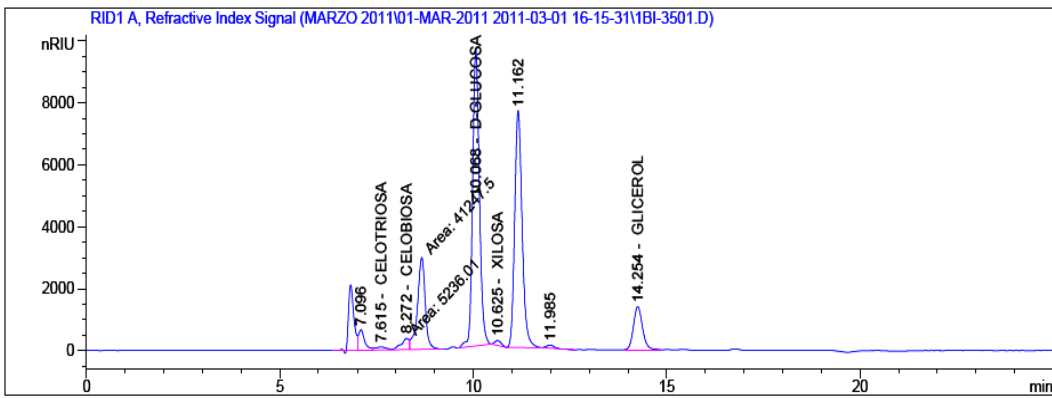
R3 170°20' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



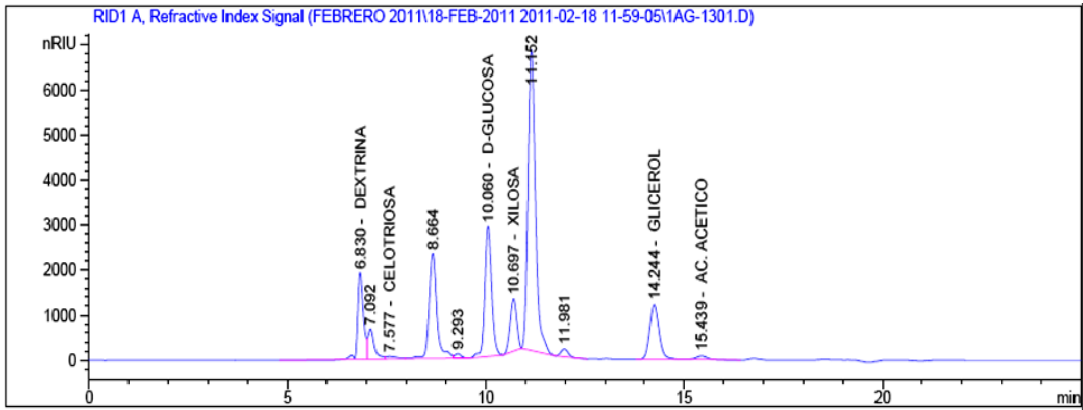
R1 170°30' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



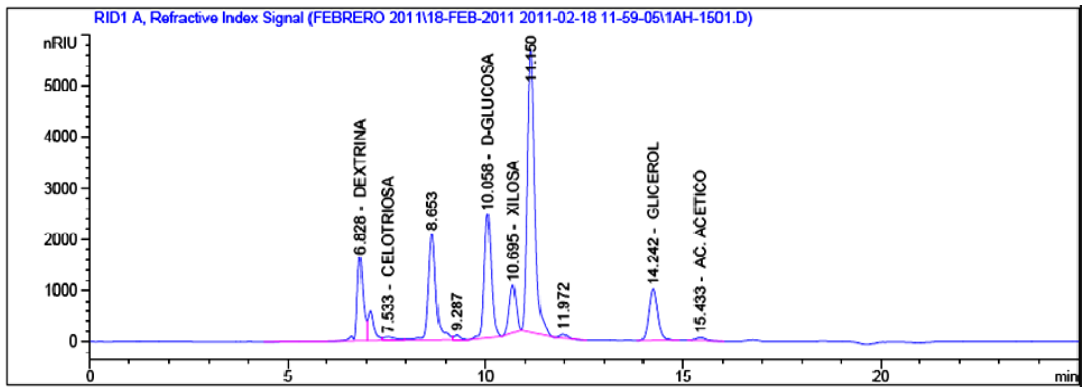
R2 170°30' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



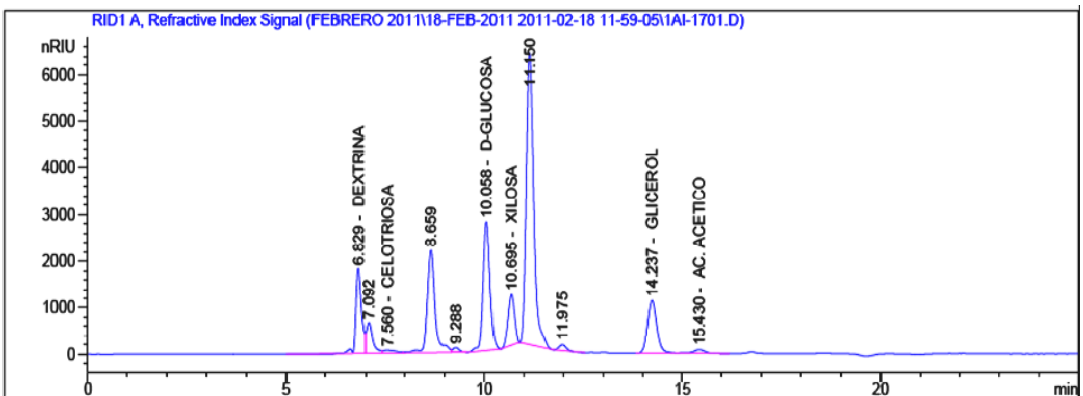
R3 170°30' Caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



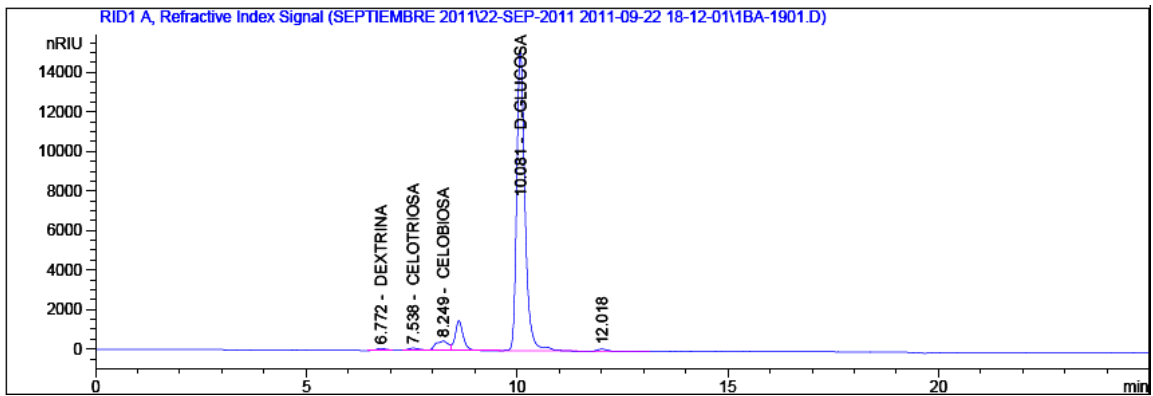
R1 control caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



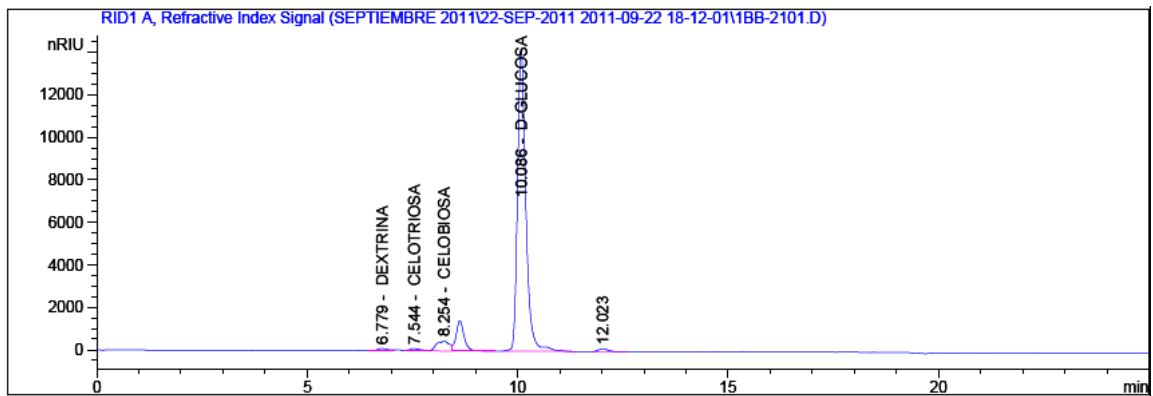
R2 control caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



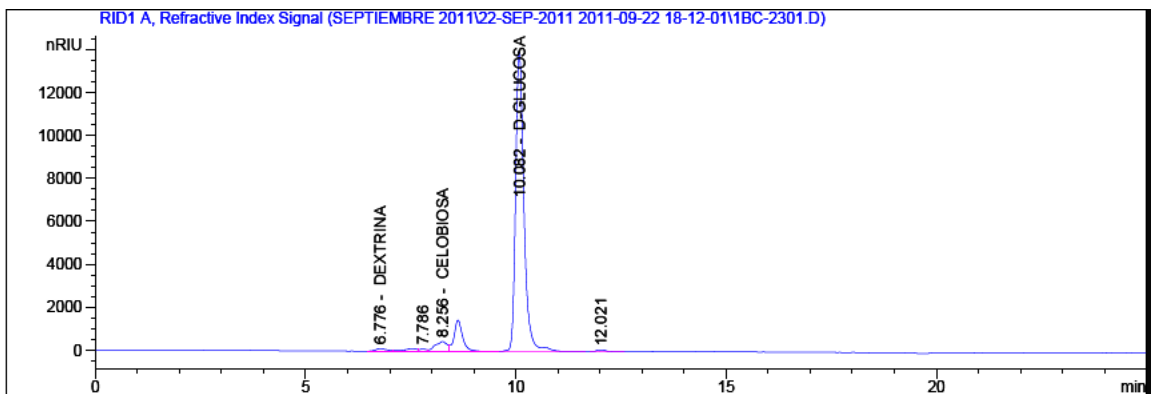
R3 control caña enzimas Biomass Kit 15% sólidos



R1 160 °C 10' caña enzimas Cellic® Kit 15% sólidos

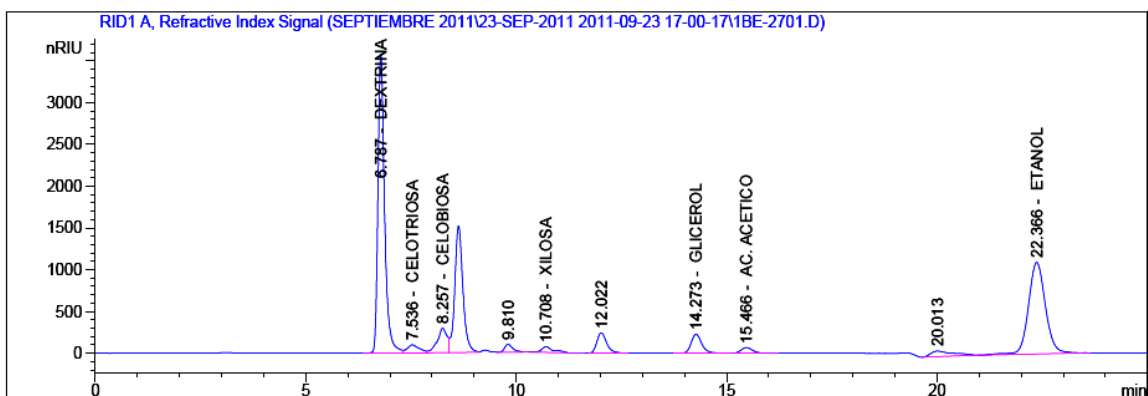


R2 160 °C 10' caña enzimas Cellic® Kit 15% sólidos

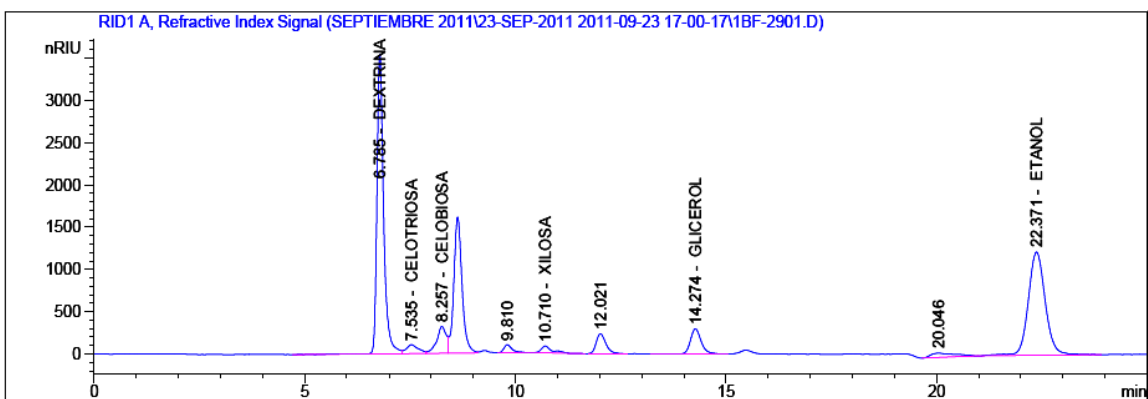


R3 160 °C 10' caña enzimas Cellic® Kit 15% sólidos

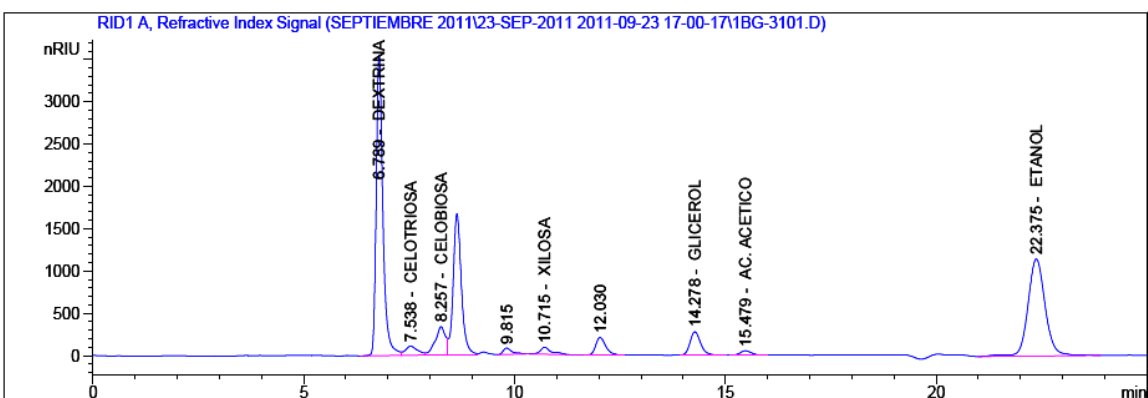
FERMENTACIÓN



R1 160 °C 10' caña enzimas Cellic® Kit 15% sólidos Fermentación 24 horas



R2 160 °C 10' caña enzimas Cellic® Kit 15% sólidos Fermentación 24 horas



R3 160 °C 10' caña enzimas Cellic® Kit 15% sólidos Fermentación 24 horas

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
SECRETARÍA

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, María Genoveva Granda Albuja, C.I. 172073554-5, autor del trabajo de graduación intitulado “Determinación de azúcares, productos de fermentación e inhibidores de fermentación por HPLC en un proceso de obtención de etanol lignocelulósico” previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS, MENCIÓN QUÍMICA ANALÍTICA** en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 13 de diciembre de 2011

Srta. María Genoveva Granda Albuja

C.I. 1720735545