

**EFFECTOS DEL PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO DILUIDO E HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA DEL BAGAZO DE CAÑA PARA LA PRODUCCIÓN DE GLUCOSA**

**JOSÉ FERNANDO CUADROS BOHORQUEZ
OSCAR JAVIER CELIS ARIZA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2007

**EFFECTOS DEL PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO DILUIDO E HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA DEL BAGAZO DE CAÑA PARA LA PRODUCCIÓN DE GLUCOSA**

**JOSE FERNANDO CUADROS BOHORQUEZ
OSCAR JAVIER CELIS ARIZA**

**Trabajo de Grado para optar el título de
Ingeniero Químico**

Director:

**RUBENS MACIEL FILHO
Ph.D Ingeniero químico**

Lector:

**Viacheslav Kafarov
Ph.D Ingeniero químico**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2007

DEDICATORIA

A Dios por ser la luz que guía mi camino, a mi madre por ser la fuente de inspiración hacia el éxito personal y profesional, por ser aquella persona que me da la confianza y la tranquilidad en los momentos difíciles, aquella que a pesar de la distancia siempre esta allí dándome una palabra de aliento para seguir siempre adelante, por ella estoy aquí y en ella siempre me voy a inspirar para seguir siempre adelante en este largo camino.

A mis hermanas Rosana y Tatiana, aquellas que a pesar de todas las dificultades siempre estuvieron al lado mío y se que siempre lo estarán.

A mi tia Alba Luz quien es como mi segunda madre.

A mis abuelitas, Alicia y Lilia ellas son grandes personas por ellas hago parte de una grandiosa familia, creo que la mejor del mundo.

A mis amigos con quienes viví una gran etapa de mi vida y de quienes aprendí muchas cosas.

A todas aquellas personas que siempre estuvieron a mi lado apoyándome y con las cuales tuve la gran oportunidad de culminar esta etapa de mi vida con gran éxito, a todos muchas gracias.

JOSÉ FERNANDO CUADROS BOHÓRQUEZ

Primero a Dios, quien fue mi luz en el sendero que cada día iluminó mis pasos e hizo que este sueño fuese realidad. A mis padres quienes me apoyaron con amor y comprensión, a mis hermanos Jinet, Sergio y Paulis que son motivo de superación.

A Danielita mi linda sobrina que hace de nuestras vidas felicidad. A mis tíos y primos que son motor de alegría y de esfuerzo.

A mis parceritos del alma; Nidis, Hector, Roby, Monica, Angélica, Kevin, Ramón, Laura Garzón, Pio y Cordero quien con su amistad verdadera aportaron apoyo y felicidad.

A Olga Lucía y Pablo Antonio, quienes siempre están allí impulsando y dando un aliento más de ilusiones.

Bueno a todos que estuvieron conmigo y los que no, en las buenas y en las malas Que ahora no recuerdo...pero bien...los llevo en mi corazón y gracias ...muchas gracias.....

OSCAR JAVIER CELIS ARIZA

AGRADECIMIENTOS

A Dios...

A nuestras familias... quienes fueron unos de los principales precursores de este logro; gracias por el amor, apoyo, fuerza y comprensión brindados en este proceso.

Al Prof. Dr. Rubéns Maciel Filho y a la Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa por la oportunidad de crecimiento personal e intelectual. Sus energías, disposición, entusiasmo, optimismo, dedicación y productividad dejarán marcas imborrables en nuestras vidas.

A los Ingenieros Químicos Ph.D. Vyacheslav Kafarov y Álvaro Ramírez García, por su ayuda y absoluta confianza.

A Sarita Candida Rabelo quien guió y orientó nuestro trabajo; su experiencia, ayuda y consejos fueron determinantes.

A nuestra "Alma Mater", Universidad Industrial de Santander, que gracias a su gran capacidad científica y académica tuvimos la oportunidad de acceder a una de las más interesantes experiencias académica.

A todos los colegas del laboratorio LDPS/LBP con los que compartimos día a día, durante la permanencia en el Brasil.

A profesores y funcionarios de la UNICAMP y de la UIS que estuvieron con nosotros en este tiempo, acompañándonos en este proceso de crecimiento intelectual e integral.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. GENERALIDADES.....	4
1.1 ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	6
1.1.1 La Celulosa.....	6
1.1.2 La Hemicelulosa.....	7
1.1.3 La Lignina.....	8
1.2 CAÑA DE AZUCAR.....	9
1.2.1 Bagazo de Caña.....	10
1.2.1.1 Caracterización del Bagazo.....	10
1.3 PRETRATAMIENTO.....	14
1.3.1 Pretratamiento ácido.....	16
1.4 HIDRÓLISIS.....	17
1.4.1 Hidrólisis Enzimática.....	18
1.4.1.1 Trichoderma Reesei.....	21
1.4.1.2 Celulazas.....	21
1.4.1.3 Adsorción de las Celulazas.....	21
1.4.1.4 Sinergismo.....	22
2. METODOLOGIA ADOPTADA PARA EL PRETRATAMIENTO ÁCIDO, LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y EL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24

2.1	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	25
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	27
4.	CONCLUSIONES.....	34
	BIBLIOGRAFÍA.....	36
	ANEXOS.....	39

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructuras de la unidad repetitiva de celulosa, la anhidrocelubiosa.....	7
Figura 2. Estructura de la pared de la celula de una planta.....	9
Figura 3. Macrofotografía de sección de caña.....	12
Figura 4. Principales derivados del Bagazo.....	13
Figura 5. Esquema del objetivo del pretratamiento sobre materiales lignocelulósicos.....	16
Figura 6. Representación de la Hidrólisis de un disacárido.....	18
Figura 7. Diagrama de flujo del procedimiento experimental del pretratamiento ácido.....	26
Figura 8. Hidrólisis enzimática del máximo del tercer planeamiento estrella del ácido Fosfórico.....	29
Figura 9. Hidrólisis enzimática del máximo del segundo planeamiento estrella del ácido Sulfúrico	31
Figura 10. Hidrólisis enzimática del máximo del ácido sulfúrico cambiando la actividad enzimática.....	32
Figura 11. Hidrólisis enzimática del máximo del ácido fosfórico cambiando la actividad enzimática.....	32

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición del bagazo de caña.....	11
Tabla 2. Datos máximos del tercer planeamiento estrella del ácido Fosfórico.....	29
Tabla 3. Datos máximos del segundo planeamiento estrella del ácido Sulfúrico.....	31
Tabla 4. Datos del máximo del ácido fosfórico cambiando la actividad enzimática.....	32
Tabla 5. Datos del máximo del ácido fosfórico cambiando la actividad enzimática.....	32

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Planeamiento Factorial 23 para el ácido Fosfórico y Sulfúrico	40
Anexo B. Preliminar de Pretratamiento ácido e Hidrólisis Enzimática	43
Anexo C. Primer Planeamiento Experimental de Composición Central para el ácido Fosfórico	48
Anexo D. Primer Planeamiento Experimental de Composición Central del ácido Sulfúrico.	54
Anexo E. Segundo Planeamiento Experimental de Composición Central del ácido Fosfórico.	60
Anexo F. Segundo Planeamiento Experimental de Composición Central del ácido Sulfúrico.	66
Anexo G. Tercer Planeamiento Experimental de Composición Central del ácido Fosfórico.	72
Anexo H. Procedimiento Experimental del pretratamiento ácido.	78
Anexo I. Preparación de los Reactivos y curva patrón del DNS	82
Anexo J. Manuales del Laboratorio	86

RESUMEN

Título: EFECTOS DEL PRETRATAMIENTO CON ÁCIDO DILUIDO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL BAGAZO DE CAÑA PARA LA PRODUCCIÓN DE GLUCOSA*.

Autores: José Fernando Cuadros Bohórquez, Óscar Javier Celis Ariza**.

Palabras Claves: Caña de azúcar, Bagazo de caña, Pretratamiento ácido, Hidrólisis enzimática, Glucosa.

En el presente trabajo, se estudió el efecto en la variación de la concentración de ácido diluido y el tiempo de reacción en el pretratamiento del Bagazo de caña para la producción de glucosa por hidrólisis enzimática. Muestras fueron pretratadas con concentraciones de ácido Fosfórico y ácido Sulfúrico que variaron entre 0.1-6% v/v y 0.1-3% v/v respectivamente, con tiempos de reacción entre 30 y 120 min. La determinación cuantitativa de Glucosa se realizó por espectrofotometría usando el método de glucosa GOD-PAD. El experimento involucró inicialmente un diseño factorial 2^3 hasta un diseño de composición central (Estrella). Los resultados demostraron que los factores en estudio afectaron significativamente la cantidad de glucosa producida. La concentración de glucosa varió entre 0.051-0.593 mg/mL para el ácido Fosfórico y 0.113-0.768 mg/mL para el ácido Sulfúrico. La mayor producción de glucosa (0.230 g) se obtuvo en la hidrólisis con ácido sulfúrico al 0.1% v/v y 120 min. de tiempo de reacción en el pretratamiento.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Dir :Pr. Dr Rubens Maciel Filho

ABSTRACT

Title: EFFECT OF PRETREATMENT WITH DILUTED ACID AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SUGAR CANE BAGASSE FOR THE PRODUCTION OF GLUCOSE*.

Authors: José Fernando Cuadros Bohórquez, Óscar Javier Celis Ariza**.

Keywords: Sugar cane, sugar cane bagasse, acid pretreatment, enzymatic hydrolysis, Glucose.

In the present work, the effect in variation of the concentration of diluted acid, and reaction time in the pretreatment of the cane Bagasse for the glucose production by enzymatic hydrolysis, was studied. Several samples were pretreated with concentrations of Phosphoric acid and sulfuric acid that varied between 0,1-6% (v/v) and 0,1-3% (v/v) respectively, with reaction times between 30 and 120 min. The quantitative determination of glucose was made by spectrophotometry through the glucose method GOD-PAD. Initially, the experiment involved a factorial design 2^3 until a design of central composition (Star). The results demonstrated that the factors in study significantly affected the amount of glucose. The glucose concentration varied from 0.051 to 0.593 mg/mL for phosphoric acid, and from 0.113 to 0.768 mg/mL for sulfuric acid. The maximum glucose production (0,230 g) was obtained during hydrolysis with sulfuric acid (0,1% v/v) and 120 min. of time reaction in the pretreatment.

* Graduation Project

** Physicochemical faculty. Chemical Engineering School. Director: Pr. Dr Rubens Maciel Filho

INTRODUCCIÓN

Los usos de Biomasa para fines de generación de energía son de gran interés para el Brasil, especialmente en la dirección de una mayor aplicación tecnológica; este es el caso de la generación de electricidad, la producción de vapor y de combustibles para el transporte.

El programa de alcohol en Brasil comenzó en 1975 el cual se denominó PROALCOHOL, teniendo como finalidad estimular la producción de este, además de la sustitución a gran escala de los derivados del petróleo. De acuerdo con este programa la producción de alcohol oriundo de la caña de azúcar, de la yuca o de cualquier otro insumo debería ser incentivada por la expansión de la oferta de las materias primas, con especial énfasis en el aumento de la producción agrícola, de la modernización y ampliación de las plantas de destilación existentes y de la instalación de nuevas unidades productoras. La caña de azúcar tiene el más alto retorno para los agricultores por hectárea plantada¹. La industria de la caña en el Brasil mantiene el mayor sistema de producción de energía comercial de biomasa en el mundo a través del etanol (sustituyendo cerca del 40% de la gasolina) y del uso casi total del bagazo (equivalente a 11 millones de ton) para producción del combustible. Después de más de veinte años de uso a gran escala del etanol como combustible automotriz, el conocimiento adquirido sobre los impactos ambientales, sociales y económicos permite analizar con cierta seguridad el ciclo completo del mismo y su sustentabilidad. El Brasil produce cerca de 300 millones de ton de caña por año; en los últimos años (25% de la producción mundial) en 5 millones de hectáreas, con concentración en el sudeste y nordeste (~60% en *São Paulo*). En el Brasil hay 50 mil productores de caña y 308 unidades de

¹ PROALCOHOL. Programa Brasileiro de Álcool [en línea]. <<http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool.htm> > [Enero de 2007].

procesamiento industrial, todas privadas, dando como resultado 17,7 millones de toneladas de azúcar (cerca de 50% para exportación) y 15,5 millones de m³ de etanol por año (2005)².

En el año 2001, el Congreso de la República de Colombia expidió la ley 693 que dispuso el uso de etanol mezclado con la gasolina corriente a partir del mes de septiembre del año 2005. Actualmente en Colombia están en marcha 5 proyectos para la producción de alcohol en las regiones del Valle del Cauca, Cauca y Risaralda los cuales utilizan como materia prima la caña de azúcar, y se encuentran en estudio otros cinco proyectos tres de los cuales irían a utilizar esta materia prima. Para satisfacer plenamente el alcohol necesario para mezclar con la gasolina corriente, se estima que son necesarias entre diez y doce refinerías para producir 2,5 millones de litros diarios, con capacidades variables entre 150 y 300 mil litros por día de alcohol, una manera de aumentar la producción de alcohol en cada una de estas refinerías es la utilización del bagazo de caña mediante la aplicación de tecnologías como la hidrólisis enzimática, lo cual vendría a reducir los costos de producción ya que se tendría una mayor cantidad de alcohol por planta sin aumentar el área sembrada,³.

Por varias décadas la hidrólisis del material lignocelulósico y la fermentación de los azúcares para producir etanol competitivamente han sido un gran desafío. Las rutas mas conocidas son la hidrólisis ácida y la enzimática. El proceso usando catálisis por ácido ya fue practicado desde la segunda guerra mundial; procesos catalizados por ácido diluido son aun hoy usados en la antigua Unión Soviética para producir etanol así como furfural, pero las bajas tasas de conversión de la celulosa y hemicelulosa (50-60% del teórico) los inhabilitan económicamente. El

² CARVALHO, Isaías. Estado da arte e tendências tecnológicas para energia [en línea]. <http://www.finep.gov.br/fundos_setoriais/ct_energ/documentos/ct-energ03estado_arte.pdf > [citado en enero de 2003]

³ FEDERACIÓN NACIONAL DE COMBUSTIBLES. ABC de los alcoholes carburantes [en línea]. <<http://www.minminas.gov.co/minminas/sectores.nsf/> > [Enero de 2007].

uso de ácidos concentrados trae la conversión para valores adecuados, pero el costo de recuperación de los mismos es muy alto. Procesos catalizados por enzimas son objeto de mayor parte de los estudios hoy en el mundo, en principio por ofrecer mayor potencial de reducción de costos a medio y largo plazo y por ofrecer menor potencial de daño ambiental. Hay varias opciones de procesos en estudio hoy en día, pero ninguno realmente comercial.⁴

En base a las premisas anteriores se desarrolló un estudio para el manejo del material lignocelulósico de Bagazo de caña de la planta *São Luís* del Estado de *São Paulo*, mediante un pre-tratamiento con ácido diluido para una posterior hidrólisis enzimática como fundamento de estudios posteriores del departamento de Procesos Químicos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Estatal de Campinas- Brasil. Esta propuesta fué planteada con el fin de determinar los efectos que tiene la concentración del ácido y el tiempo de reacción del pre-tratamiento en la hidrólisis enzimática para dos tipos de ácidos utilizados, mediante un planeamiento estadístico no factorial de punto central (Estrella).

⁴ Op. cit. CARVALHO, Isaías. 2003.

1. GENERALIDADES

Actualmente la principal materia prima usada para la producción de etanol es la sacarosa de la caña de azúcar. Muchas investigaciones se han venido realizando para viabilizar el uso del material lignocelulósico hidrolizado como materia prima, con el objetivo de bajar los costos de producción y aumentar la cantidad de etanol utilizando la menor área plantada. Considerando la gran disponibilidad de esta materia prima en el Brasil (Bagazo de caña, selvas de eucalipto, etc), a costos mucho más bajos comparados con otros países, hace de esta una gran opción para obtener buenos resultados.

Los azúcares resultantes de la hidrólisis del material lignocelulósico (hexosas y pentosas), pueden ser considerados como materia prima no solo para la producción de etanol sino también para la producción de otros bioproductos de alto valor agregado. Una de las opciones atractivas en el Brasil es usar el bagazo de caña como materia prima para la producción de etanol. El uso del bagazo presenta una serie de ventajas:

- El bagazo ya viene procesado de las molinos.
- Esta disponible en grandes cantidades.
- Tiene un bajo costo.
- Esta listo para el uso local evitando el aumento en el costo debido al transporte.

Actualmente el bagazo es usado en las plantas para la generación de vapor y energía eléctrica, con un excedente que gira en torno al 10%, lo que aun así corresponde aproximadamente a 4,75 millones de toneladas de material lignocelulósico seco. La cantidad de materia prima que sobra es poca porque no hay motivos para un mejor aprovechamiento de energía. Con el uso creciente de

maquinaria automatizada, el follaje o paja de caña que antes era quemada durante la colecta, podrá ser aprovechada para generar energía en lugar del bagazo de caña o como materia prima para la hidrólisis. En el caso del uso de la paja para la generación de energía, considerándose que la cantidad de follaje o paja equivale aproximadamente a la misma cantidad de bagazo y que 50% de esa paja pueda ser aprovechada, se puede disponer así de una mayor cantidad de bagazo para la hidrólisis. Otra opción para aumentar la disponibilidad de bagazo es la implantación de tecnología para la optimización energética de las plantas. Un proceso ya fue planteado en el Brasil y en otros países para la producción de etanol a partir de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. La tecnología DHR (Denini Hidrolise Rapida), esta siendo desarrollada por la Denini S.A, industrias de base en conjunto con Copersucar, a través de un acuerdo de investigación con la FAPESP, (*Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo*).

Sin embargo, a pesar que la hidrólisis ácida de la biomasa es eficiente y relativamente barata, genera residuos poluentes y productos que inhiben la fermentación posterior. Por ello, la sacarificación enzimática ha sido objeto de la mayor parte de los estudios hoy en el mundo. El proceso enzimático ofrece un potencial de reducción de costos a largo plazo pues es posible alcanzar rendimientos próximos de los estequiométricos en condiciones menos críticas de temperatura, presión y agresividad química, siendo así menos poluente. Sin embargo en el estado de desarrollo actual, este proceso no es económicamente viable.

El mayor problema con esta opción es el costo de las enzimas usadas, las celulazas. Los programas de investigación en los Estados Unidos proponen reducir substancialmente el costo de las enzimas, sin embargo, en el futuro el mayor costo estará representado por la biomasa. En este punto Brasil posee una ventaja extraordinaria debido no solo a la gran disponibilidad de materia prima,

sino también a la posibilidad de la integración de las plantas de azúcar con las destilerías, usando una infraestructura ya existente. La gran dificultad de introducir procesos hidrolíticos en los EUA y Europa es el alto costo de la materia prima, lo que los fuerza a investigar la fermentación simultánea de las pentosas y la recuperación del sub-producto para tornar el proceso viable.⁵

1.1 ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA⁶

La biomasa lignocelulósica esta compuesta de polímeros de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa), lignina y una parte mas pequeña restante (extractivos, ácidos, sales y minerales). La celulosa y la hemicelulosa, los cuales comprenden generalmente dos terceras partes de la biomasa seca son polisacáridos que pueden ser hidrolizados a azúcares y eventualmente fermentados a etanol. La lignina no puede ser usada para la producción de etanol.

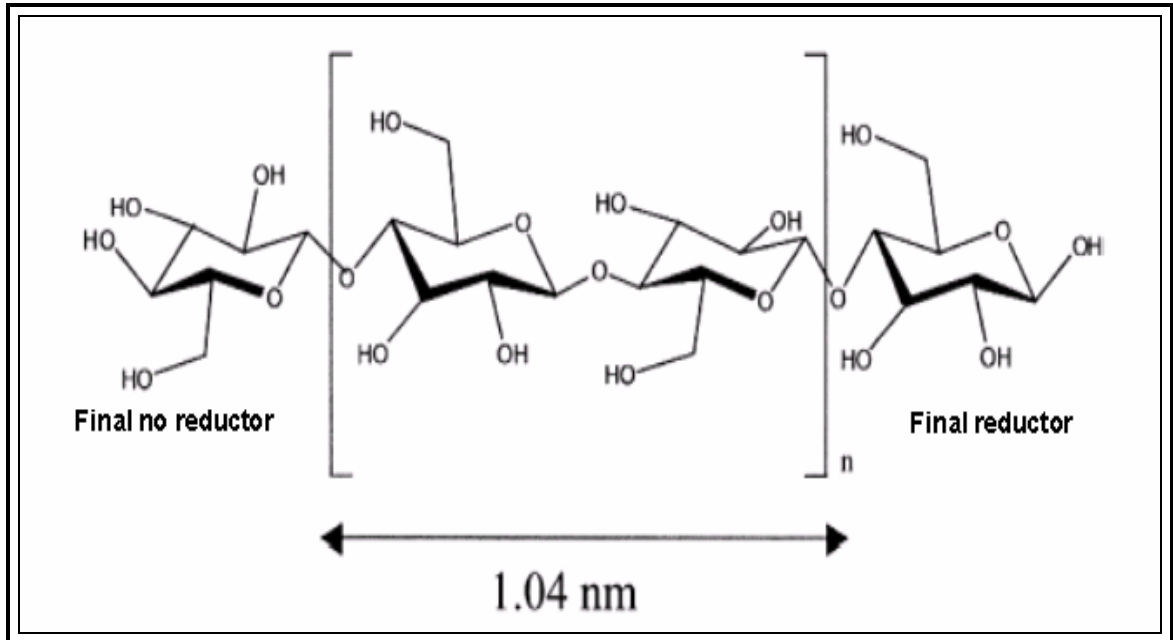
1.1.1 La Celulosa. (40- 60% de la biomasa seca), es un polímero lineal de celubiosa (dímero glucosa- glucosa), (Figura. 1), cuyos monómeros están unidos por enlaces β -1,4-glucosídicos para formar materiales altamente cristalinos que resisten la hidrólisis enzimática. La orientación de los enlaces y uniones adicionales de hidrógeno hacen el polímero rígido y difícil de romper. En la hidrólisis el polisacárido es quebrado a moléculas de azúcar libres mediante la adición de agua, este procedimiento es llamado sacarificación. El producto, glucosa, es un azúcar de seis carbonos o hexosa. La relación entre las características estructurales de la celulosa y el ritmo de la hidrólisis enzimática ha sido sometida a extensivos estudios, pero desafortunadamente aun no han sido completamente entendidos. Las características estructurales de la celulosa que

⁵ ENTREVISTA con Aline Carvalho da Costa, Profesora del Departamento de Procesos Químicos de la Facultad de Ingeniería Química de Universidad Estadual de Campinas. Campinas (SP), Septiembre de 2006.

⁶ HAMELINCK, Carlo. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno- economic performance in short-, middle- and long-term. En: Biomass and Bioenergy. No. 28 (Dic, 2004); p. 384- 410

comúnmente se tienen en cuenta como factores que afectan la velocidad de la hidrólisis enzimática son: El índice de cristalinidad, el grado de polimerización y el área accesible.⁷

Figura 1. Estructura de la unidad repetitiva de celulosa, la anhidrocelubiosa.



Fuente: ZHANG, Yi- Heng. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. En: Biotechnology and Bioengineering. No. 88 (Nov., 2004); p. 797- 824

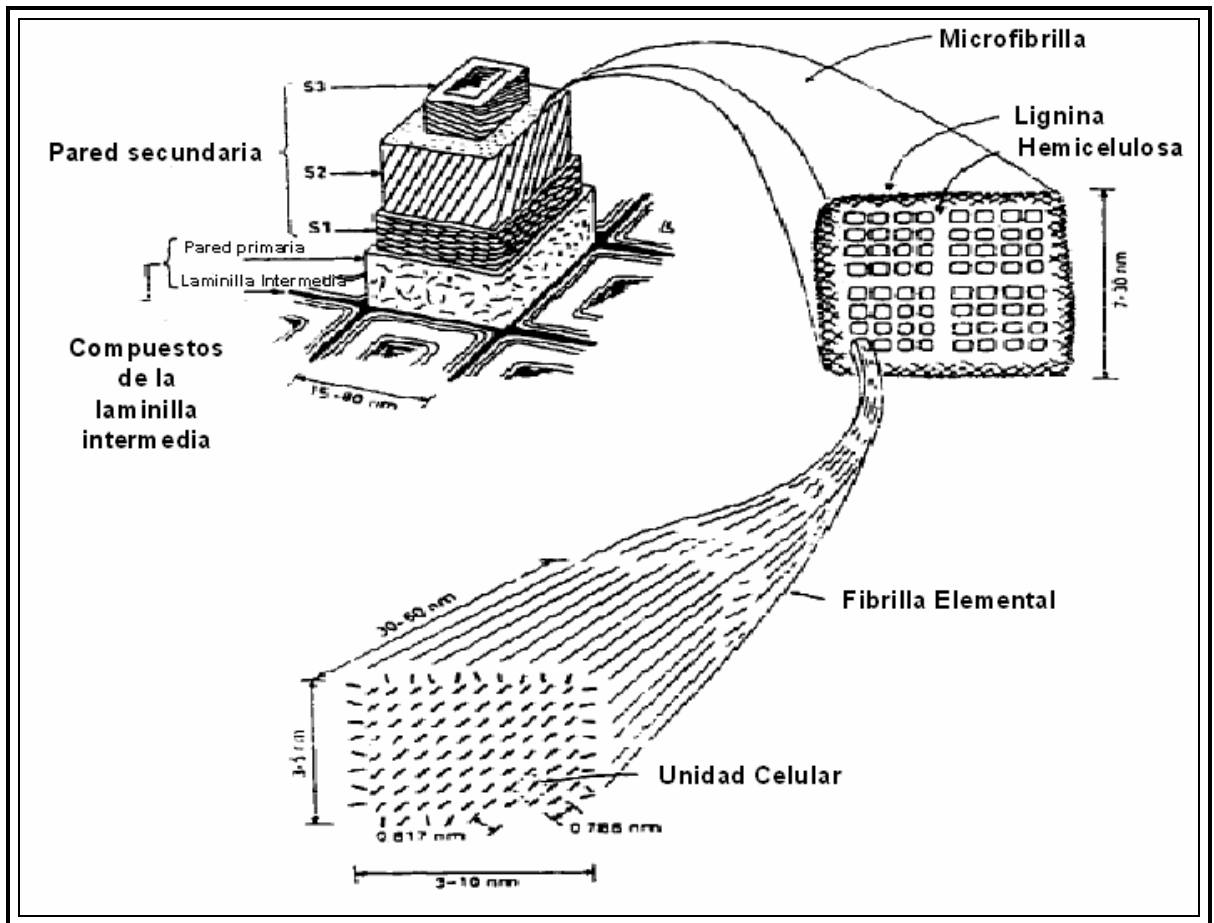
1.1.2 La Hemicelulosa. (20-40% de la biomasa seca), la cual sirve de unión entre la lignina y la celulosa, consiste de cadenas cortas altamente ramificadas de varios azúcares: principalmente xilosa y arabinosa (cinco carbonos), galactosa, glucosa y manosa (todas de seis carbonos). Esta también contiene pequeñas cantidades de no azúcares tales como grupos acetil. La hemicelulosa debido a sus ramificaciones y naturaleza amorfa es relativamente fácil de hidrolizar.

⁷ ZHANG, Yi- Heng. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. En: Biotechnology and Bioengineering. No. 88 (Nov., 2004); p. 797- 824

1.1.3 La Lignina. (10- 25% de biomasa seca), un polímero tridimensional de fenilpropileno, altamente entre cruzado, tiene un alto peso molecular y es amorfo, está presente en toda la biomasa lignocelulósica. Es una sustancia polifenólica (no carbohidrato), que se incrusta en las paredes de las células manteniéndolas juntas. Por lo tanto, cualquier proceso de producción de etanol tendrá lignina como residuo la cual se degrada mediante pocos organismos a productos de alto valor como ácidos orgánicos y fenoles. Su naturaleza hidrofóbica resiste el ataque químico y microbiano. La combinación de hemicelulosa y lignina proporciona una capa protectora alrededor de la celulosa, la cual debe ser modificada o removida antes de que se lleve a cabo un proceso de hidrólisis eficiente, además la estructura cristalina de la celulosa hace que esta sea altamente insoluble y resistente al ataque. Por lo tanto, para hidrolizar económicamente la hemicelulosa o la celulosa, se deben desarrollar tecnologías de pretratamiento más avanzadas.

La pared de la célula de un material lignocelulósico consiste de una pared primaria y una secundaria. La Figura 2 muestra la estructura esquemática de la pared de la célula de una planta. La primera pared esta compuesta principalmente de hemicelulosa y pectina. La segunda pared contiene tres capas (S1, S2, y S3), siendo S2 la mas gruesa. Todas las capas de la segunda pared están compuestas de largas fibras de material llamadas micro fibrillas las cuales están compuestas de cuatro arreglos 4x4 de fibrillas elementales embebidas en una matriz de hemicelulosa. Las fibrillas elementales están compuestas de celulosa pura la cual es altamente cristalina y soporta la estructura de la planta. Las fibrillas elementales y la matriz de hemicelulosa se mantiene juntas por medio de la lignina. La estructura de una micro fibrilla es análoga a aquella de un pilar de concreto en la cual las fibrillas elementales se parecen a las barras de metal y la lignina y la hemicelulosa se asemejan al cemento.

Figura 2. Estructura de la pared de la célula de una planta.



Fuente: CHANG, Shushien. Lime pretreatment of lignocellulosic biomass: Biomass conversion processes. College Station (TX), 1999, 290 p. Tesis de grado (Doctor of philosophy in Chemical Engineering). Texas A&M University. Departamento de Ingeniería Química. Disponible en el catalogo en línea de la biblioteca de la Universidad Estadual de Campinas: < <http://proquest.umi.com/pqdweb> >

1.2 CAÑA DE AZUCAR

La caña de azúcar es una hierba gigante que pertenece a la familia GRAMINEAE, de la clase de las monocotiledóneas y al genero *Saccharum*: “azúcar, sustancia dulce, sabor de sacarina”. Las cañas llamadas nobles o nativas, que eran todas las cañas cultivadas en las regiones tropicales y semitropicales del mundo, hasta la introducción de las variedades nacidas de semillas, pertenecen todas a la

misma especie: *Saccharum officinarum*. Las amplias variaciones en el tamaño, el color y el aspecto son resultado de las diversas condiciones del terreno, del clima, de los métodos de cultivo y de la selección local. La gran extensión del territorio brasileiro, así como el cultivo de mas de cuatro millones de hectáreas distribuidos por todos los estados de la federación posibilitan que la caña de azúcar crezca sobre los mas variados tipos de suelos, siendo el estado de *São Paulo*, responsable por cerca de 60% de la producción nacional. Otros estados donde se cultiva la caña de azúcar son: Los estados de Pernambuco, Alagoas y el estado de Río de Janeiro, y otros estados donde se da una menor producción son: Santa Catarina, Bahia, Sergipe, Paraíba y Río Grande del Norte, el planalto central brasileiro, Amazonas y Pará.⁸

1.2.1 Bagazo de Caña. El bagazo es el residuo fibroso del tallo de caña que queda después de triturar y extraer el jugo. Consiste de fibras, agua y cantidades relativamente pequeñas de sólidos solubles – principalmente azúcar. Su composición varía según la variedad de caña, su madurez, el método de cosecha y finalmente la eficiencia de la fábrica moledora. La tabla 1 indica la composición promedio que se puede esperar para el bagazo entero.

1.2.1.1 Caracterización del Bagazo.⁹ La fibra de bagazo es por definición aquel componente que es insoluble en agua. Consiste principalmente de celulosa, de pentosanos y de lignina. La celulosa es un polisacárido que tiene la fórmula general $(C_6H_{10}O_5)_n$ y es el componente principal del tejido vegetal, el cual rara vez ocurre en la naturaleza en estado puro y en general está íntimamente entremezclada con lignina, pentosanos, gomas, taninos, grasas, materias

⁸ BICUDO PARANHOS, Sérgio. Cana de açúcar cultivo e utilização: botânica da cana de açúcar. Campinas (SP): Fundação Cargill, 1987. 431p.

⁹ PATURAU, Maurice. El uso del bagazo como materia prima industrial para la obtención de derivados y generación de energía. En: Seminario Internacional Sobre Derivados de la Caña de Azúcar. (1: 1988: Cuba). Memorias del Seminario Internacional Sobre Derivados de la Caña de Azúcar. Cuba: publicación del grupo de países latinoamericanos y del caribe, 1988. p. 369- 411.

colorantes, etc. La celulosa de bagazo tiene probablemente una cadena de polímeros de 2000 a 3000 unidades de glucosa.

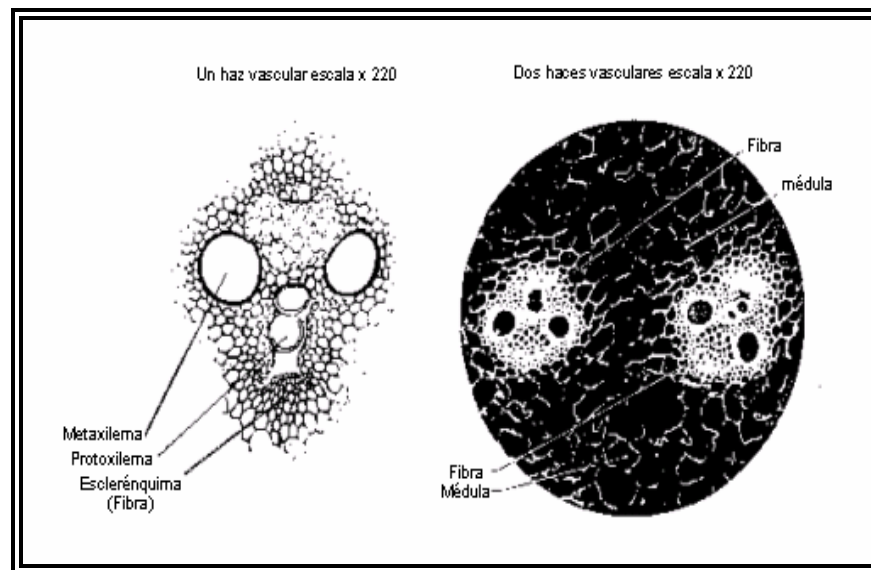
Los pentosanos son una forma de hemicelulosa que mediante hidrólisis se obtiene xilosa, arabinosa y ácido urónico. Bajo el efecto de ácido hidroclicórico hirviendo los pentosanos se convierten en furfural.

Tabla 1. Composición de bagazo de caña

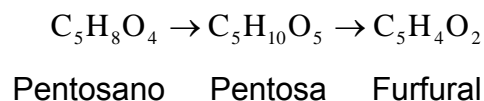
A. Análisis Físico (a la salida del ingenio).	
Humedad	50%
Fibra	48%
Sólidos Solubles	2%
TOTAL	100%
B. Análisis Químico (en base seca).	
Celulosa	45%
Pentosanos	26%
Lignina	21%
Ceniza	3%
Otras sustancias orgánicas	5%
TOTAL	100%
C. Análisis Final (a la salida del ingenio).	
Carbono	23%
Hidrógeno	3%
Oxígeno	23%
Ceniza	2%
Humedad	49%
TOTAL	100%
D. Análisis Físico Fibroso (en base seca).	
Fibras verdaderas	55%
Pared celular	20%
Médula	20%
Otros no fibrosos	5%
TOTAL	100%

Fuente: PATURAU, Maurice. El uso del bagazo como materia prima industrial para la obtención de derivados y generación de energía. En: Seminario Internacional Sobre Derivados de la Caña de Azúcar. (1: 1988: Cuba). Memorias del Seminario Internacional Sobre Derivados de la Caña de Azúcar. Cuba: publicación del grupo de países latinoamericanos y del caribe, 1988. p. 369- 411.

Figura 3. Macrofotografía de sección de caña.



Fuente: SUBPRODUCTOS Y DERIVADOS DE LA AGROINDUSTRIA AZUCARERA. (1: 1988: Cuba). Seminario Internacional Sobre Derivados de la Caña de Azúcar. México D.F: Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe Exportadores de Azúcar, 1988. 468p.

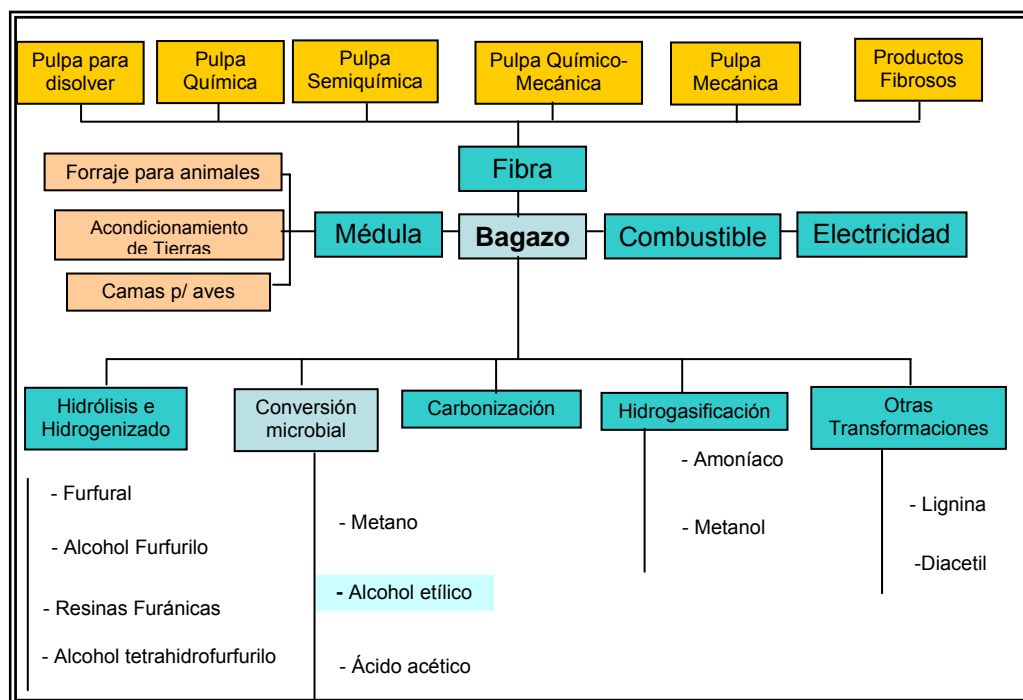


Estructuralmente, el tallo de caña consiste de varios tipos de tejido de fibra. Los dos tipos más importantes de residuo fibroso que se encuentran en el bagazo son, (Figura 3):

- Las células cilíndricas firmes, de pared dura, de la corteza y los tejidos vasculares o *fibra auténtica*.
- Las células parenquimatosas suaves, de pared delgada y forma irregular del tejido interior del tallo o *médula*.

La fibra auténtica y la médula tienen casi la misma composición química, pero su estructura difiere considerablemente. El bagazo puede transformarse en un buen número de productos finales, como se indica en la Figura 4. También se obtiene cierto número de productos finales mediante hidrólisis y mediante *conversión microbiana del bagazo*.

Figura 4. Principales derivados del bagazo



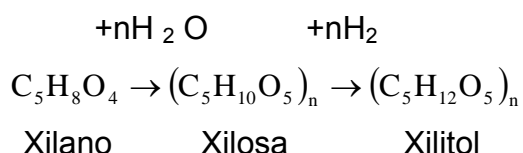
Fuente: PATURAU, Maurice. El uso del bagazo como materia prima industrial para la obtención de derivados y generación de energía. En: Seminario Internacional Sobre Derivados de la Caña de Azúcar. (1: 1988: Cuba). Memorias del Seminario Internacional Sobre Derivados de la Caña de Azúcar. Cuba: publicación del grupo de países latinoamericanos y del caribe, 1988. p. 369- 411.

A continuación se enunciarán los productos finales de mayor importancia tanto de la hidrólisis como del pretratamiento y sus posibles usos:

- **Furfural** El furfural se produce a partir de diversos materiales vegetales que contienen pentosanos- en el caso del bagazo más del 90% es xilano-.

Mediante hidrólisis ácida del xilano se obtiene xilosa que posteriormente pierde tres moléculas de agua para formar furfural. El furfural se utiliza principalmente como un solvente en la producción de aceite lubricante y también como intermediario en la producción de resina para fundición.

- **Xilitol** El bagazo contiene pentosanos que están principalmente compuestos de xilano y arabán. El xilitol se obtiene mediante la hidrogenación a alta presión de la xilosa. La transformación de xilano en xilosa y xilitol puede indicarse esquemáticamente mediante la siguiente fórmula:



El xilitol es un alcohol dulce que se cristaliza muy fácilmente y de esta forma puede ser fácilmente purificado.

1.3 PRETRATAMIENTO¹⁰

El pretratamiento es una importante herramienta en los procesos de conversión de celulosa, el cual se requiere para alterar la estructura de la biomasa celulósica para así hacer la celulosa mas accesible a las enzimas que convierten los polímeros de carbohidrato en azúcares fermentables como se representa en el esquema de la Figura 5. El objetivo es romper la capa de lignina y hemicelulosa además de destruir la estructura cristalina de la celulosa. El pretratamiento se ha caracterizado por ser unos de los pasos de proceso mas costosos en la conversión de azúcares de biomasa a azúcares fermentables.

¹⁰ MOSIER, Nathan. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. En: Bioresource Technology. No. 96 (Sep., 2004); p. 673-686.

Un efectivo pretratamiento se caracteriza por diferentes criterios. Este evita la necesidad de reducir el tamaño de las partículas de biomasa, preserva las fracciones de pentosas (hemicelulosa), limita la formación de productos de degradación que inhiben el crecimiento de los microorganismos fermentativos, minimiza las demandas energéticas y limita los costos.

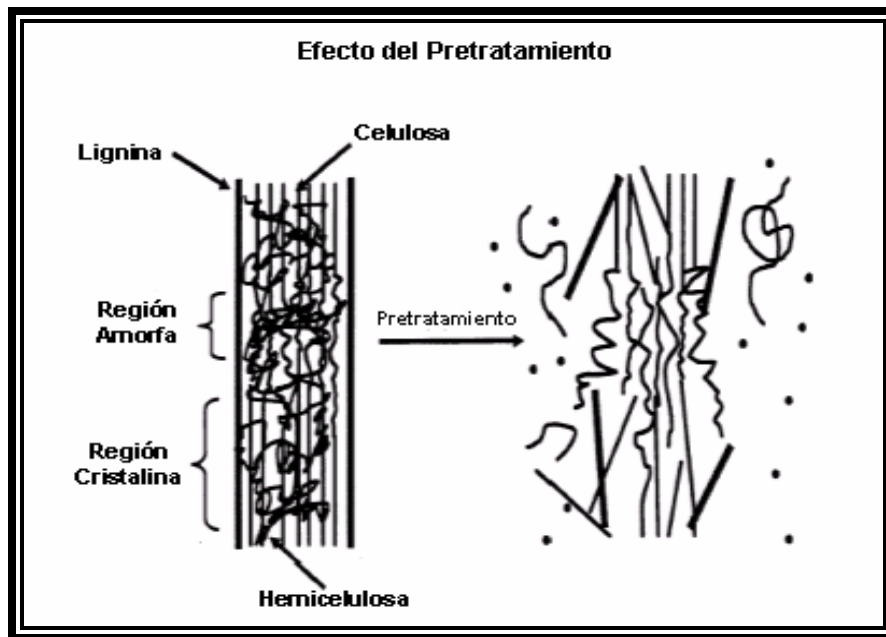
Estas propiedades, junto con otras incluyendo bajos costos de catalizadores de pretratamiento o catalizadores de reciclaje de bajo costo, y la generación de co-productos de alto valor a partir de la lignina forman las bases de comparación para varias opciones de pretratamiento.

El pretratamiento debe atender los siguientes requerimientos:

- Mejorar la formación de azúcares ó la habilidad de la formación futura de azúcares por hidrólisis.
- Evitar la degradación o pérdida de carbohidratos.
- Evitar la formación de co-productos que sean inhibitorios para la hidrólisis subsecuente.
- Tener un costo razonable.

A continuación se realizara una breve descripción del pretratamiento ácido, el cual fue el tipo de pretratamiento utilizado en el presente trabajo:

Figura 5. Esquema del objetivo del pretratamiento sobre materiales lignocelulósicos.



Fuente: MOSIER, Nathan. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. En: Bioresource Technology. No. 96 (Sep., 2004); p. 673-686.

1.3.1 Pre-tratamiento Ácido. El pre-tratamiento ácido ha recibido gran investigación y atención por muchos años. En este tipo de pretratamiento el ácido es mezclado con la biomasa y la mezcla es mantenida a temperaturas que varían entre 160-220 ° C por un rango de tiempo que va desde segundos a minutos.

El ácido ha sido añadido a los materiales lignocelulósicos por algunos años para obtener comercialmente furfural, el cual es mezclado con la biomasa para hidrolizar la hemicelulosa a xilosa y otros azúcares y luego romper continuamente la xilosa hasta formar furfural el cual es recuperado por destilación.

La adición de ácido ha sido inicialmente aplicado a la remoción de hemicelulosa pudiéndose realizar la transformación de la celulosa a la glucosa o como

tratamiento previo a la hidrólisis de la celulosa, el cual es el caso que se lleva a cabo en el presente trabajo.

La hemicelulosa es removida cuando el ácido es adicionado y esto aumenta la digestibilidad de la celulosa en los sólidos residuales. Entre los ácidos más usados se encuentran el ácido sulfúrico, el ácido nítrico, ácido hidrociorhídrico y ácido fosfórico. El ácido que ha sido utilizado en la mayoría de pruebas de hidrólisis ácida es el ácido sulfúrico el cual tiene ciertas limitaciones incluyendo corrosión lo cual demanda altos costos en materiales de construcción.

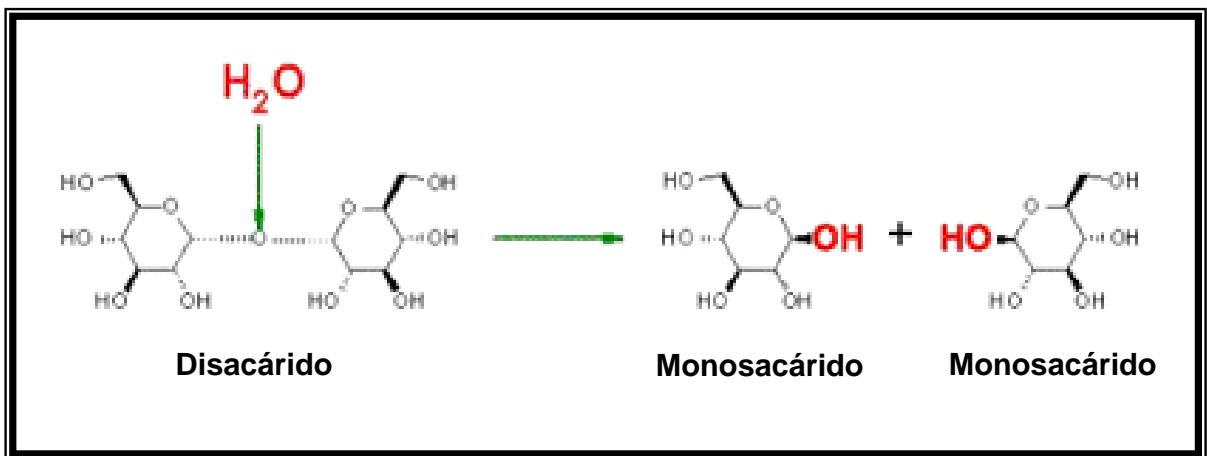
1.4 HIDRÓLISIS

La hidrólisis es la reacción química del agua con alguna sustancia. En el caso de un polisacárido, la hidrólisis del enlace glicosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio, donde el hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar y el -OH se une al carbono libre del otro residuo de azúcar.

El resultado de esta reacción (Figura 6), es la liberación de un monosacárido y el resto de la molécula que puede ser monosacárido si se trata de un disacárido o bien del polisacárido restante si se trata de un polisacárido más complejo.¹¹

¹¹ CONTRERAS, Edgar. Bioquímica y biología molecular en línea [en línea]. <<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacaridos.htm>> [citado el 3 de octubre de 2003]

Figura 6. Representación de la hidrólisis de un disacárido



Fuente: CONTRERAS, Edgar. Bioquímica y biología molecular en línea [en línea]. <<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacaridos.htm>> [citado el 3 de octubre de 2003]

1.4.1 Hidrólisis Enzimática.¹² La hidrólisis enzimática se define como una reacción heterogénea, catalizada por las celulasas, siendo caracterizada por un sustrato insoluble (celulosa) y un catalizador soluble (enzimas). De esta manera las características estructurales de la celulosa y el modo de acción de las enzimas influyen la tasa de reacción. La susceptibilidad de la celulosa al ataque enzimático se determina por la accesibilidad de los sitios de unión en la celulosa, lo que determina la subsiguiente adsorción de la enzima en el sustrato sólido.

A lo largo de los años, fueron propuestos varios mecanismos para la conversión de celulosa a glucosa. A continuación se describe un esquema hipotético para la degradación de la celulosa:

Etapas 1

Celulosa Nativa \longrightarrow Endoglucanasa \longrightarrow Celulosa Activa

¹² DOCUMENTO REALIZADO por Aline Carvalho da Costa, Profesora departamento de procesos químicos FEQ- UNICAMP. Campinas (SP), Agosto de 2006.

Etapas 2

Celulosa Activa \longrightarrow Exoglucanasa \longrightarrow Celobiosa

Etapas 3

Celobiosa \longrightarrow β - Glucosidasa \longrightarrow Glucosa

La adsorción de las enzimas celulasas y la formación del complejo enzima/sustrato son considerados los pasos críticos en la hidrólisis enzimática de la celulosa. Se sabe que las enzimas celulasas son inhibidas por la celobiosa y por la glucosa y el patrón de esta inhibición ha sido objeto de varios estudios. Algunos autores sugieren que la inhibición competitiva es dominante, otros que es no competitiva sin embargo otros autores reportan una combinación de ambas.¹³

En la hidrólisis enzimática ocurre la transferencia de masa de las moléculas de enzima a través del lecho fijo de capa líquida que encierra las partículas sólidas de celulosa y después la difusión interna de las moléculas de enzima en la matriz sólida. La tasa de reacción global puede ser influenciada por estas resistencias a la transferencia de masa, en el comienzo de la hidrólisis en el caso del reactor por cochedas con agitación, la tasa de reacción global, es determinada por las tasas de tres eventos en secuencia:

- La tasa de transferencia de masa de la enzima.
- La tasa de adsorción de la enzima en la superficie del sustrato.
- Tasa de catálisis de la celulosa.

¹³ DING, Hanshu. Adsorption and synergism of cellulases during hydrolysis of cellulosic materials: Cellulase. Davis, 2000, 157 p. Tesis de grado (Doctor of philosophy in food science). University of California. Graduate programs of study. Food Science and Technology. Disponible en el catalogo en línea de la biblioteca de la Universidad Estadual de Campinas: < <http://proquest.umi.com/pqdweb> >

A continuación de la hidrólisis después de la primera fase de reacción rápida, la tasa de reacción comienza a depender de la mayor penetración de la enzima y difusión dentro del sustrato sólido. La mayoría de los autores, sin embargo ignoran la resistencia a la transferencia de masa externa, que suponen insignificante en comparación con la catálisis más lenta.¹⁴

En general los modelos cinéticos propuestos para predecir la tasa de reacción inicial tienen buenos resultados usando tasas de reacción de Michaelis- Menten, sin embargo, los modelos que intentan predecir la producción de azúcares en reacciones por cochedas con tiempos largos no dan buenos resultados, lo cual posiblemente se debe a la cinética lenta de la hidrólisis después del estado inicial y a la dificultad de las moléculas de enzima en difundirse y unirse al sustrato.

La hidrólisis de la celulosa en sus monómeros constituyentes es hecha por un complejo de enzimas llamadas **celulazas** las cuales actúan en sinergismo. Las celulazas son producidas por una amplia variedad de microorganismos entre los cuales se encuentran los hongos, actinomicetos, myxobacterias y verdaderas bacterias. Solo una poca cantidad de microorganismos producen sistemas completos de celulazas que son capaces de degradar la celulosa cristalina, mientras que una gran cantidad de especies producen sistemas de celulazas incompletas. Representantes de los verdaderos organismos celulósicos son la *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani* y *Irpex lacteus*. ***Trichoderma Reesei***, es el microorganismo cuya producción de celulazas ha sido más investigada y de la cual hay más datos reportados en la literatura.

¹⁴ Ibíd. P.157

1.4.1.1 Trichoderma Reesei.¹⁵ También conocida como *Hypocrea Jecorina*, es un hongo mesófilico el cual es uno de los productores más eficientes de celulasas y xylanazas. Producciones industriales de *Trichoderma Reesei* pueden conseguir producciones de proteínas por encima de los 100 g/L.

La eficiente habilidad secretora y el fácil y barato cultivo hacen de este un útil microorganismo para la producción de enzimas a gran escala para una gran variedad de aplicaciones industriales.

1.4.1.2 Celulasas.¹⁶ Las celulasas a partir de sistemas celulósicos verdaderos son sistemas enzimáticos multicomponentes. Las enzimas que componen las celulasas actúan en cooperación para degradar la celulosa nativa a celuoligosacáridos y glucosa. Los componentes de la celulaza pueden ser clasificados de acuerdo a la localización para la separación de los enlaces y a los productos liberados. Las cuatro principales categorías son: 1) Endoglucanazas (endo-1,4- β -D- glucan 4- glucanohidrolazas), las cuales atacan en conjunto los enlaces internos de la celulosa; 2) Exocelubiohidrolazas (1,4- β -D- glucan celubiohidrolazas), las cuales atacan las cadenas externas de la celulosa, y liberan la celobiosa; 3) Exo- glucohidrolazas (1,4- β - D- glucan glucobiohidrolaza) las cuales liberan la glucosa de los finales no reductores de la cadena de celulosa; 4) β - glucosidazas (β - glucoside glucohidrolaza), las cuales hidrolizan la celobiosa y los celuoligosacáridos.

1.4.1.3 Adsorción de las celulasas.¹⁷ La adsorción de las celulasas sobre materiales celulósicos insolubles, es el paso prerequisite de la conversión enzimática de celulosa. Hay una relación cercana entre la adsorción y la hidrólisis.

¹⁵ XIONG, Hairong. Production and characterization of *trichoderma reesei* and *thermomyces lanuginosus* xylanases [en línea].<<http://lib.tkk.fi/Diss/2004/isbn9512273187/isbn9512273187.pdf>> [citado el 30 de octubre de 2004]

¹⁶ Op. cit DING p.157

¹⁷ Ibid. p.157

Se ha sugerido que un incremento en la adsorción conduce a un incremento en la hidrólisis, y que la adsorción de celulasas sobre materiales celulósicos es la característica central de diferentes modelos mecánicos para la hidrólisis enzimática de la celulosa. Las acciones sinérgicas de los componentes de las celulasas pueden ser también explicados por medio de la adsorción.

1.4.1.4 Sinergismo.¹⁸ El sinergismo es el fenómeno por el cual la acción de una mezcla de dos o más componentes individuales de las celulasas es más grande que la suma de la acción de cada componente. Las acciones sinérgicas son mas obvias en la celulosa microcristalina, menos en la celulosa amorfa y no están presentes cuando se usan en derivados solubles de las celulosas.

El tipo mas común de sinergismo observado es con las mezclas de endo-exo glucanazas, sin embargo también se ha reportado sinergismo con las exo-exo glucanazas y las endo-endo glucanazas. En resumen existen tres grupos de enzimas que son conocidas como las celulasas:¹⁹

- Endoglucanazas: Las cuales atacan las regiones de baja cristalinidad de la fibra celulósica.
- Exoglucanazas: Que degradan todavía mas la molécula separando las unidades de celobiosa,
- β – glucosidazas: las cuales se encargan de hidrolizar la celobiosa para producir glucosa.

Como resultado de la acción de las enzimas en la celulosa, se obtienen glucosa y celobiosa. Sin embargo, conforme las concentraciones de estos monómeros en el

¹⁸ Ibidem.

¹⁹ Op. cit. CARVALHO DA COSTA, ENTREVISTA

medio aumentan las actividades de las celulasas son inhibidas. La celobiosa es un inhibidor más fuerte que la glucosa, lo que hace importante su transformación rápida en glucosa por la β - glucosidaza. Como muchos complejos enzimáticos comerciales presentan bajas concentraciones de β - glucosidazas, muchas veces es conveniente que se adicione β - glucosidazas de otras fuentes a los complejos enzimáticos para disminuir la concentración de celobiosa en el medio reaccional y de la misma manera la inhibición.

2. METODOLOGÍA ADOPTADA PARA EL PRE-TRATAMIENTO ÁCIDO, LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y EL DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se realizaron planeamientos experimentales usando el programa *STATISTICA release 7* para el cual se tomaron muestras tamizadas (-20 mesh) e *in -natura* (sin tamizar) para ciertos experimentos del planeamiento. El bagazo de caña provenía de la planta *São Luis* del estado de *São Paulo*. Las condiciones iniciales experimentales del pretratamiento se llevaron a cabo usando los valores de concentración de ácido, tiempo de pretratamiento y concentración de biomasa (Anexo A), aplicando un planeamiento experimental factorial 2^3 ,²⁰ con lo cual se esperaba obtener valores de glucosa en el rango entre 0- 1 g/L por litro de solución determinando de esta manera un procedimiento experimental para las pruebas siguientes. Además se tuvo en cuenta un ajuste de pH de 5 (SAHA, 2005), para realizar las lecturas de azúcares reductores totales (ART). Después que se determinó una metodología experimental de pretratamiento (Anexo H), que fuese válida para realizar las lecturas de ART mediante el método del ácido 3-5 Dinitrosalicílico (DNS), y de glucosa (Anexo I), se procedió a realizar una prueba experimental para estudiar el efecto del tamaño de partícula (Anexo B), teniendo en cuenta que se realizó tanto el pretratamiento como la hidrólisis con actividades enzimáticas de 3,94FPU/ g de biomasa para el caso de las celulazas y de 28,4CBU/ g de biomasa para el caso de las β - glucosidasas para los dos ácidos con concentraciones de ácido sulfúrico de 0,3% y 0,8% v/v y de ácido fosfórico de 0,1% y 0,5% v/v, con un tiempo de 60min para los dos casos.²¹ A partir de este punto se procedió a realizar planeamientos estrella (planeamiento de composición central) para así buscar las condiciones del pretratamiento que produzcan los

²⁰ GAMEZ, Sara., GONZÁLEZ, Juan., RAMIREZ, José., GARROTE, Gil. and VAZQUEZ, Manuel. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *En: Journal of food engineering*. No. 74 (Abril, 2005); p. 78-88

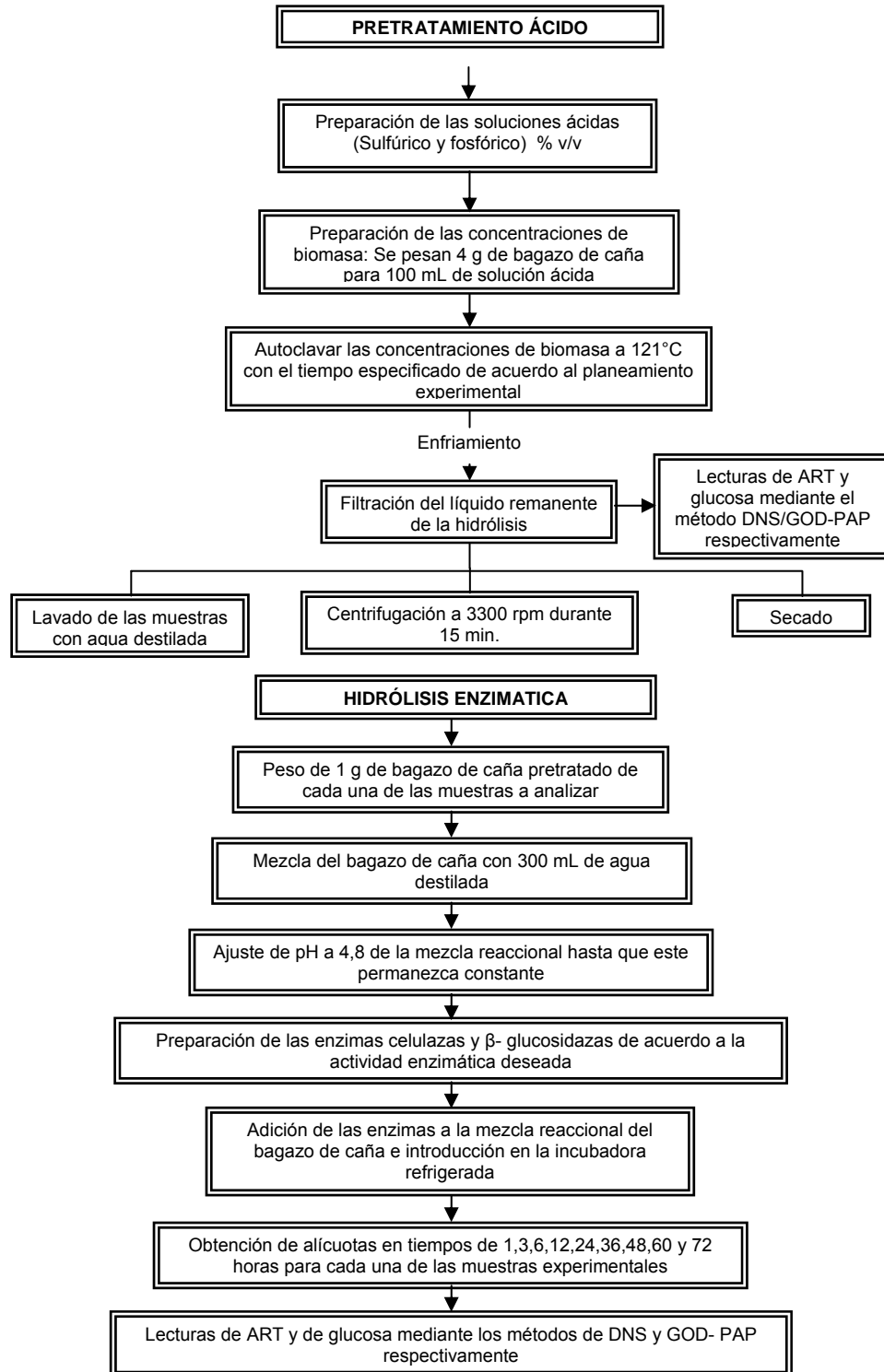
²¹ Op. cit. CARVALHO DA COSTA, ENTREVISTA

mejores valores de glucosa en la hidrólisis enzimática para la biomasa de estudio. El siguiente planeamiento estrella se realizó tomando como base los resultados anteriores los cuales mostraban que para valores de concentraciones y tiempos menores se obtenían mejores resultados en el pretratamiento. Para el caso de la hidrólisis enzimática se continuó con la misma carga enzimática tanto para las celulasas como para las β - glucosidazas, por ello se realizó el siguiente planeamiento para el pretratamiento con ácido fosfórico en un rango entre 0,5% - 2% v/v y en un intervalo de tiempo de 30 - 90 min. Para el caso del ácido sulfúrico el rango de concentraciones fue entre 0,3% - 0,8% v/v) en el mismo intervalo de tiempo utilizado para el ácido fosfórico, para el caso de la hidrólisis enzimática se procedió como en los casos anteriores. Los siguientes planeamientos se realizaron teniendo en cuenta un análisis estadístico de variables en busca de los valores de concentración de ácido y tiempo de pretratamiento respecto a la mayor cantidad posible de glucosa en el líquido remanente de la hidrólisis.

2.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Esta parte describe de manera general la metodología experimental del Pretratamiento ácido como también de la Hidrólisis enzimática (Figuras 7), realizada en el Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Procesos Químicos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Estatal de Campinas.

Figura 7. Procedimiento experimental del Pre-tratamiento ácido e hidrólisis enzimática.



3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al tener en cuenta los conceptos de pretratamiento ácido e hidrólisis ácida se debe tener claridad en cuanto a las diferencias de cada una de ellas. El primero busca remover las capas de lignina y hemicelulosa dejando al descubierto la mayor cantidad de celulosa para ser convertida a glucosa mediante un posterior tratamiento; la hidrólisis ácida tiene como objetivo la obtención de glucosa a partir de la celulosa en una sola etapa.

De acuerdo a los resultados obtenidos del primer planeamiento factorial 2^3 del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido así como para el ácido fosfórico se obtuvieron valores máximos de ART de 0.026 g y de 0.041 g respectivamente. Como se puede observar (Anexo A) la mayoría de las lecturas de absorbancia fueron negativas, esto se presenta debido a las condiciones de reacción tales como, altas concentraciones y largos tiempos de pretratamiento los cuales convirtieron las pentosas así como las hexosas a furfural e hidroximetilfurfural respectivamente, no siendo posible su detección. El objetivo en este paso (pretratamiento), es retirar la lignina y la hemicelulosa; las altas concentraciones de ácido así como los altos tiempos destruyen estas dos capas anteriores además de la celulosa, la cual debe ser convertida a monómeros mediante la acción enzimática y no mediante la acción ácida. Como consecuencia de los resultados anteriores se desarrollaron unas pruebas preliminares en las cuales se disminuyeron los valores de concentraciones ácidas como de los tiempos de pretratamiento (Anexo B) esto, con el fin de encontrar un rango de condiciones experimentales adecuadas para los futuros planeamientos, además de conocer la influencia del tamaño de partícula del bagazo de caña en la hidrólisis enzimática. Para el primer tipo de estas pruebas preliminares, se obtuvo para el ácido fosfórico un valor máximo de glucosa de 0.058 g (in-natura) y de ART de

0.116 g (in-natura) con una concentración de ácido de 0.1 %v/v con un tiempo de pretratamiento de 60 min. Para este mismo preliminar en el caso del ácido sulfúrico se obtuvo un valor máximo de glucosa de 0.077 g (tamizado) y de ART de 0.086 g (tamizado) con una concentración de ácido igual a 0.3 %v/v para un tiempo de pretratamiento de 60 min. Como se puede observar el rango de concentraciones en estudio, arroja valores adecuados de azúcares para un próximo planeamiento, no encontrando diferencia significativa entre el bagazo de caña in-natura y tamizado; de acuerdo a estos resultados la opción a seguir en los próximos experimentos es el bagazo in-natura ya que este reduce los costos a nivel industrial eliminando así una etapa más del proceso. A partir de este punto se realizaron los diferentes planeamientos de composición central (Estrella), obteniendo para el primer planeamiento del ácido fosfórico (Anexo C) una cantidad máxima de glucosa equivalente a 0.038 g con una concentración de ácido igual a 1.25 %v/v en un tiempo de pretratamiento de 102 min. y de ART igual a 0.101 g para una concentración de 2 %v/v en un tiempo de pretratamiento igual a 90 min. Como se puede observar los resultados obtenidos a estas condiciones permiten identificar mediante el análisis estadístico de datos, que el siguiente planeamiento se debe realizar mediante dos alternativas. La primera es bajas concentraciones y largos tiempos de pretratamiento y la otra es altas concentraciones a tiempos cortos.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente se optó por la primera alternativa debido a cuestiones operacionales del autoclave con respecto al tiempo de reacción en el pretratamiento.

En el segundo planeamiento Estrella para el ácido fosfórico (Anexo E) se obtuvo una cantidad máxima de glucosa igual a 0.051 g y de ART 0.088 g para una misma concentración de ácido de 0.2%v/v en un tiempo de pretratamiento de 60 min. respectivamente. Este resultado indica que al disminuir drásticamente la concentración y el tiempo de pre-tratamiento no influyen de manera significativa

los resultados de glucosa y ART; de acuerdo también a los análisis estadísticos de datos se debe reducir aun más las concentraciones y aumentar los tiempos de pre-tratamiento para obtener resultados considerables.

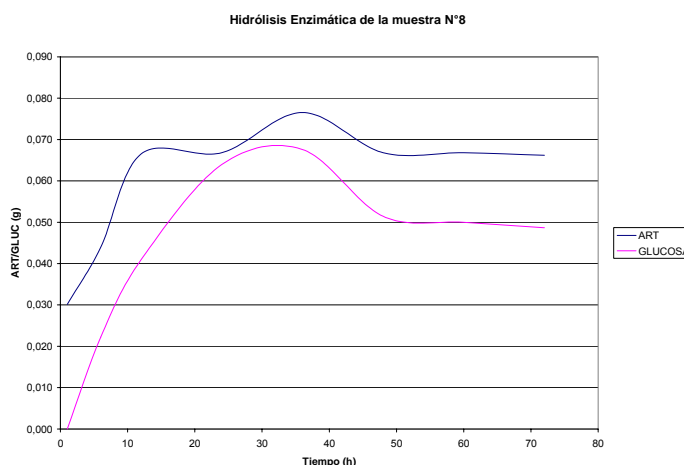
Para el tercer planeamiento estrella (Anexo G) se obtuvieron valores máximos de glucosa de 0.068 g. y de ART de 0.077g como se puede apreciar en la Figura 8 y Tabla 2, para un tiempo de hidrólisis 36 h con una concentración de ácido fosfórico de 0.20% v/v en un tiempo de pretratamiento de 126 min.

Los resultados en este planeamiento mejoraron respecto al segundo, incrementándose de esta manera los valores de glucosa siendo este nuestro principal objetivo. El comportamiento de los demás resultados comienza a mostrarse constantes respecto a la variación con el tiempo.

Tabla 2. Datos máximos del Tercer planeamiento Estrella del Acido fosfórico

Muestra	Concentración Ácido (%v/v)	Tiempo (min.)
8	0,20	126
TIEMPO(h)	ART (g)	GLUCOSA (g)
1	0,030	0,000
6	0,044	0,022
12	0,067	0,041
24	0,067	0,064
36	0,077	0,068
48	0,067	0,051
60	0,067	0,050
72	0,066	0,049

Figura 8. Hidrólisis Enzimática del máximo del tercer planeamiento Estrella del Ácido Fosfórico



En el caso del ácido sulfúrico se obtuvo en el primer planeamiento estrella (Anexo D) una cantidad máxima de glucosa igual a 0.079 g y de ART de 0.096 g ambos bajo una misma concentración de 0.3% v/v en un tiempo de pretratamiento de 90 min. De acuerdo a estos resultados podemos comparar los valores obtenidos con el segundo planeamiento estrella del ácido fosfórico debido a que se establecieron rangos de concentraciones de ácido y tiempos de pretratamiento iguales, arrojando de esta manera el ácido sulfúrico valores mayores de glucosa y ART y perfilándose como un mejor agente de pretratamiento.

Mediante el análisis estadístico de datos de este planeamiento se opta así, por concentraciones más bajas y tiempos de pretratamientos más largos como en el caso del ácido fosfórico.

Para el ácido sulfúrico en un segundo planeamiento estrella (Anexo F) se obtuvo un valor máximo de glucosa de 0.089 g para un tiempo de hidrólisis de 24h y de ART de 0.105g para un tiempo de hidrólisis de 36h, (Figura 9 y Tabla 3). La concentración de ácido en el pretratamiento fue de 0.10 %v/v y el tiempo de pretratamiento fue de 120 min.

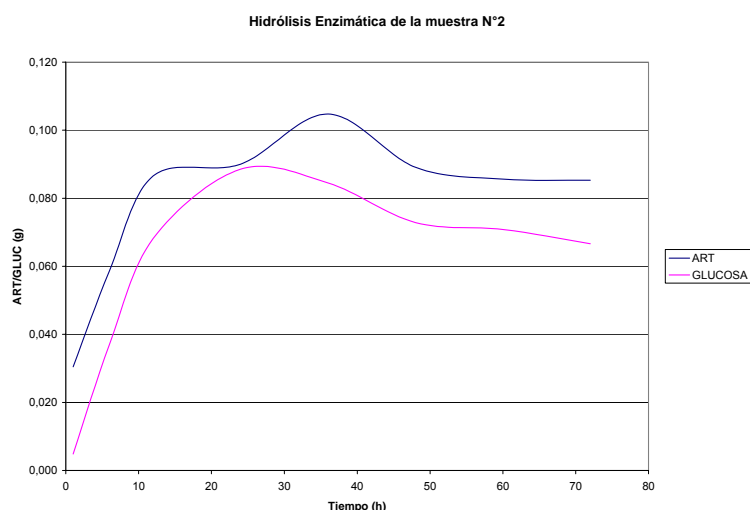
A partir de este último resultado se puede apreciar que las cantidades de glucosa y de ART son mayores con respecto a las del anterior planeamiento, así como también a los valores obtenidos del tercer planeamiento del ácido fosfórico.

Tabla 3. Datos máximos del segundo planeamiento Estrella del Ácido sulfúrico.

I

Muestra	Concentración Ácido (%v/v)	Tiempo (min.)
2	0,10	120
TIEMPO(h)	ART (g)	GLUCOSA (g)
1	0,030	0,005
6	0,059	0,037
12	0,087	0,068
24	0,090	0,089
36	0,105	0,085
48	0,089	0,073
60	0,086	0,071
72	0,085	0,067

Figura 9. Hidrólisis Enzimática del máximo del segundo Planeamiento Estrella del Ácido Sulfúrico



Un último análisis del proyecto es la influencia de la carga enzimática en la producción de glucosa del material pretratado. Las muestras tomadas para realizar estas pruebas fueron los máximos del anterior planeamiento estrella, muestra 8 para el ácido fosfórico (Tabla 4) y muestra 2 para el ácido sulfúrico (Tabla 5). La actividad enzimática en este caso fue de 25 FPU/ g de biomasa seca para las celulasas y de 75 CBU/ g de biomasa seca para la β -glucosidaza.

En la Figura 10, se muestra un valor máximo de 0.178 g de glucosa y de ART de 0.181 g, para un tiempo de hidrólisis de 36h para el ácido fosfórico. Para el caso del ácido sulfúrico se obtuvo un valor de 0.230 g de glucosa y de 0.234 g de ART también en un tiempo de 36 h de hidrólisis enzimática. Estos valores reportados son los mas altos comparados con todos los anteriores, esto se presenta debido a que hay una mayor cantidad de enzimas quebrando el polímero de celulosa a monómeros de glucosa. El comportamiento cóncavo al inicio de la curva, (Figura 10), se puede presentar debido a la alta presencia de dímeros de celobiosa las

cuales inhiben la acción enzimática cuando alcanzan concentraciones de azúcares cada vez mas altas.

Tabla 4. Datos del máximo del ácido fosfórico cambiando la actividad enzimática

TIEMPO (min)	ART(g)	GLUCOSA(g)	Conc. Glucosa (mg/mL)
1	0,038	0,026	0,087
6	0,060	0,052	0,174
12	0,077	0,065	0,217
24	0,155	0,152	0,507
36	0,181	0,178	0,594
48	0,164	0,157	0,522
60	0,142	0,139	0,464
72	0,136	0,122	0,406

Figura 10. Hidrólisis enzimática del máximo del ácido Fosfórico cambiando la actividad enzimática

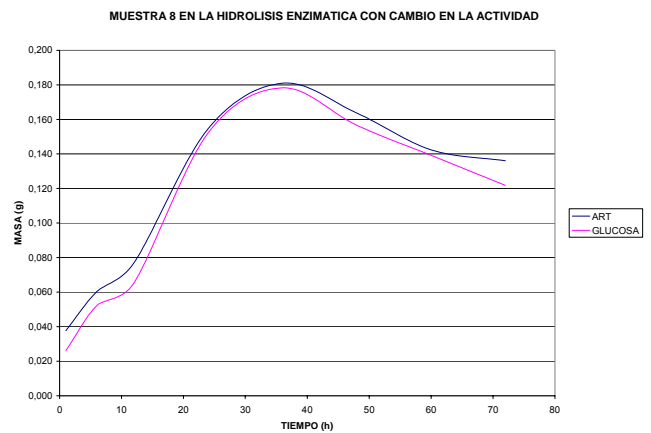
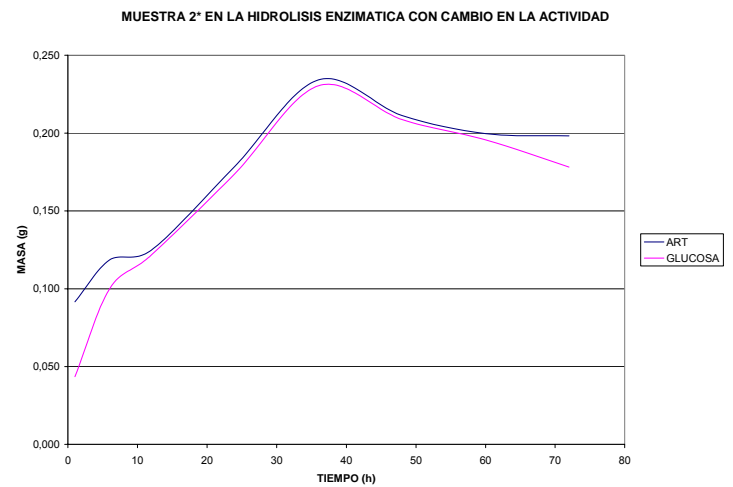


Tabla 5. Datos del máximo del ácido Sulfúrico cambiando la actividad Enzimática

TIEMPO (min)	ART (g)	GLUCOSA (g)	Conc. Glucosa (mg/mL)
1	0,092	0,043	0,145
6	0,119	0,100	0,333
12	0,125	0,122	0,406
24	0,179	0,174	0,580
36	0,234	0,230	0,768
48	0,211	0,209	0,696
60	0,200	0,196	0,652
72	0,198	0,178	0,594

Figura 11. Hidrólisis Enzimática del máximo del ácido Sulfúrico cambiando la actividad Enzimática



En las curvas que se obtuvieron como resultado de la hidrólisis enzimática se pueden observar dos comportamientos: al inicio de la curva se observa un comportamiento con pendiente positiva la cual va decreciendo con el tiempo debido posiblemente a la inhibición de la celobiosa y de la celulosa sobre la celulasa y la β -glucosidasa. Después que se alcanza la producción máxima de azúcares se observa una región con pendiente negativa a cual se debe posiblemente al volumen de muestra que se tomaba en las alícuotas durante la hidrólisis las cuales retiraban gran cantidad de azúcares que ya se habían producido y parte de enzimas.

4. CONCLUSIONES

Las variables que se tuvieron en cuenta debido a la gran influencia sobre el material lignocelulósico son la concentración de ácido y el tiempo de reacción. A medida que se avanzó en los planeamientos experimentales se obtuvieron mejores resultados de glucosa trabajando con concentraciones de ácido bajas y tiempos de pretratamiento largos, esto indica que al diluir el ácido se tiene un mejor control de la manera como este ataca las capas de lignina y hemicelulosa obteniendo la mayor cantidad de glucosa y evitando que esta se transforme en productos no deseados.

De acuerdo con las pruebas preliminares no existe una diferencia significativa en los resultados de glucosa para el bagazo de caña tamizado e *in-natura*. Este hecho es de gran importancia para el caso de estudio, debido a que se eliminaría una etapa mas en el proceso reduciendo así los costos de producción.

Si se tienen en cuenta los resultados de glucosa respecto a los dos ácidos utilizados en el pretratamiento se puede concluir que el ácido sulfúrico actúa como un mejor agente de pretratamiento, el valor máximo que se obtuvo fue de 0,089 g de glucosa para un tiempo de hidrólisis de 24 h, mientras que para el ácido fosfórico fue de 0,068 g de glucosa para un tiempo de hidrólisis de 36 h, así mismo se pudo observar que el tiempo de hidrólisis para el ácido sulfúrico es mas bajo, lo que indica que este alcanza de una mejor manera el objetivo de pretratamiento que es romper la capa de lignina y hemicelulosa además de destruir la estructura cristalina de la celulosa para que se lleve a cabo la hidrólisis enzimática de una mejor manera.

Teniendo en cuenta los tiempos de reacción y las concentraciones de ácido para los dos casos de estudio, el ácido sulfúrico alcanzó la mayor cantidad de glucosa con una concentración y un tiempo de pretratamiento menor que la obtenida para el caso del ácido fosfórico, demostrando así una vez más su efectividad plasmada en la literatura por diferentes autores; resaltándolo como uno de los mejores ácidos para llevar a cabo no solo el pretratamiento sino la hidrólisis ácida cuando los objetivos son obtener furfural e hidroximetilfurfural.

La hidrólisis enzimática a pesar de ser un proceso eficiente y seguro, requiere de mucho cuidado ya que las enzimas celulasas y β - glucosidasas tienen que ser manejadas bajo condiciones muy específicas de temperatura (50 °C) y de pH 4,8, condiciones que lo ponen en desventaja frente a la hidrólisis ácida la cual puede ser llevada a cabo bajo condiciones mucho más agresivas, pero con los inconvenientes de corrosión de los equipos y los productos de reacción secundarios que se generan inhibiendo la acción enzimática.

Al aumentar la actividad enzimática se observaron resultados de glucosa más altos tanto para el ácido sulfúrico como para el ácido fosfórico con valores de 0,230 g y 0,178g respectivamente, indicando que al aumentar la actividad enzimática se pueden llegar a esperar rendimientos superiores.

A pesar de que la hidrólisis enzimática es un proceso complejo, actualmente está tomando gran importancia en el área de los biocombustibles ya que es un proceso favorable con el medio ambiente en el cual todavía hay mucho por descubrir.

BIBLIOGRAFIA

BICUDO PARANHOS, Sérgio. Cana de açúcar cultivo e utilização: botânica da cana de açúcar. Campinas (SP): Fundação Cargill, 1987. 431p.

CARVALHO, Isaias. Estado da arte e tendências tecnológicas para energia [en línea].< [http:// www.finep.gov.br/fundos_setoriais/ct_energ/documentos/ct-energ03estado_arte.pdf](http://www.finep.gov.br/fundos_setoriais/ct_energ/documentos/ct-energ03estado_arte.pdf) > [citado en enero de 2003]

CHANG, Shushien. Lime pretreatment of lignocellulosic biomass: Biomass conversion processes. College Station (TX), 1999, 290 p. Tesis de grado (Doctor of philosophy in Chemical Engineering). Texas A&M University. Departamento de Ingeniería Química. Disponible en el catalogo en línea de la biblioteca de la Universidad Estadual de Campinas: < <http://proquest.umi.com/pqdweb> >

CONTRERAS, Edgar. Bioquímica y biología molecular en línea [en línea]. <<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacaridos.htm>> [citado el 3 de octubre de 2003]

DING, Hanshu. Adsorption and synergism of cellulases during hydrolysis of cellulosic materials: Cellulase. Davis, 2000, 157 p. Tesis de grado (Doctor of philosophy in food science). University of California. Graduate programs of study. Food Science and Technology. Disponible en el catalogo en línea de la biblioteca de la Universidad Estadual de Campinas: < <http://proquest.umi.com/pqdweb> >

DOCUMENTO REALIZADO por Aline Carvalho da Costa, Profesora departamento de procesos químicos FEQ- UNICAMP. Campinas (SP), Agosto de 2006.

ENTREVISTA con Aline Carvalho da Costa, Profesora del Departamento de Procesos Químicos de la Facultad de Ingeniería Química de Universidad Estadual de Campinas. Campinas (SP), Septiembre de 2006.

FEDERACION NACIONAL DE COMBUSTIBLES. ABC de los alcoholes carburantes [en línea]. <<http://www.minminas.gov.co/minminas/sectores.nsf/>>[Enero de 2007].

GAMEZ, Sara., GONZÁLEZ, Juan., RAMIREZ, José., GARROTE, Gil. and VAZQUEZ, Manuel. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. En: Journal of food engineering. No. 74 (Abril, 2005); p. 78-88

HAMELINCK, Carlo. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno- economic performance in short-, middle- and long-term. En: Biomass and Bioenergy. No. 28 (Dic, 2004); p. 384- 410

MEADE, George. Manual del azúcar de caña. 9 ed. Barcelona: Montaner y Simon S.A, 1967. 940 p.

MOSIER, Nathan. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. En: Bioresource Technology. No. 96 (Sep., 2004); p. 673-686.

PATURAU, Maurice. El uso del bagazo como materia prima industrial para la obtención de derivados y generación de energía. En: Seminario Internacional Sobre Derivados de la Caña de Azúcar. (1: 1988: Cuba). Memorias del Seminario Internacional Sobre Derivados de la Caña de Azúcar. Cuba: publicación del grupo de países latinoamericanos y del caribe, 1988. p. 369- 411.

PLAYNE, M. Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. En: *Biotechnology and Bio engineering*. No. 26 (May, 1984); p. 426- 436.

PROALCOHOL. Programa Brasileiro de Álcool [en línea]. < <http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool.htm> > [Enero de 2007].

SUBPRODUCTOS Y DERIVADOS DE LA AGROINDUSTRIA AZUCARERA. (1: 1988: Cuba). Seminario Internacional Sobre Derivados de la Caña de Azúcar. México D.F: Grupo de Países Latinoamericanos y del Caribe Exportadores de Azúcar, 1988. 468p.

TEXTOS CIENTIFICOS. Producción de pasta termodinámica [en línea]. < <http://www.textoscientificos.com/papel/pulpa/pasta-termomecanica> > [citado en noviembre de 2006]

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. Modelos moleculares, 2: Hidratos de carbono [en línea]. < <http://www.usal.es/~dbbm//modmol/modmol02/index02.html> > [citado en noviembre de 2006]

XIONG, Hairong. Production and characterization of *trichoderma reesei* and *thermomyces lanuginosus* xylanases [en línea]. <<http://lib.tkk.fi/Diss/2004/isbn9512273187/isbn9512273187.pdf>> [citado el 30 de octubre de 2004]

ZHANG, Yi- Heng. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. En: *Biotechnology and Bioengineering*. No. 88 (Nov., 2004); p. 797- 824

ANEXOS

ANEXO A

PLANEAMIENTO FACTORIAL 2³ PARA EL ÁCIDO FOSFÓRICO Y SULFÚRICO.

Se realizó un planeamiento factorial 2³ el cual se hace variar en el pre-tratamiento la concentración del ácido, el tiempo de reacción y la concentración de biomasa.

Planeamiento experimental del Ácido Sulfúrico

Muestra	Concentración del ácido (%v/v)	Tiempo (min)	Concentración de Biomasa (%peso/v)
1	0,5	30	4
2	0,5	30	10
3	3	30	4
4	3	30	10
5.1	1,75	75	7
5.2	1,75	75	7
5.3	1,75	75	7
6	0,5	120	4
7	0,5	120	10
8	3	120	4
9	3	120	10

Planeamiento experimental del Ácido Fosfórico

Muestra	Concentración del ácido (%v/v)	Tiempo (min)	Concentración de Biomasa (%peso/v)
1	2	30	4
2	2	30	10
3	2	30	4
4	6	30	4
5	6	30	10
6,1	4	165	7
6,2	4	165	7
6,3	4	165	7
7	2	300	10
8	6	300	4
9	6	300	10

Resultados de Azucares reductores Totales (ART) del Pre-tratamiento para el Ácido Sulfúrico

Muestra	Volumen (mL)	Abs. ART	[ART] (g)
1	4,5	0,091	0,019
2	4,5	0,134	0,024
3	4,5	-0,012	0,008
4	4,5	-0,010	0,009
5,1	4,5	-0,005	0,009
5,2	4,5	-0,003	0,009
5,3	4,5	-0,008	0,009
6	4,5	0,120	0,022
7	4,5	0,157	0,026
8	4,5	-0,011	0,008
9	4,5	-0,009	0,009

Donde:

El volumen contiene 0,5 mL de muestra, 0,5 mL de DNS y 3,5 mL de estabilizante.

Resultados de Azucares Reductores Totales (ART) del Pre-tratamiento para el Ácido Fosfórico

N° Muestra	Volumen 1 (mL)	Abs. ART(1)	[ART 1] (g)	Volumen 2 (mL)	Abs. ART(2)	[ART 2] (g)	Volumen 3 (mL)	Abs. ART(3)	[ART 3] (g)
1	9,5	0,108	0,022	4,5	0,138	0,024	5,5	0,287	0,024
2	9,5	0,175	0,029	4,5	0,169	0,027	5,5	0,432	0,033
3	9,5	0,044	0,015	4,5	0,108	0,021	5,5	0,156	0,016
4	9,5	0,002	0,010	4,5	0,009	0,011	5,5	0,011	0,007
5	9,5	0,036	0,014	4,5	0,154	0,026	5,5	0,074	0,011
6,1	9,5	-0,003	0,010	4,5	0,003	0,010	5,5	0,006	0,006
6,2	9,5	0,026	0,013	4,5	0,001	0,010	5,5	0,063	0,010
6,3	9,5	0,002	0,010	4,5	0,003	0,010	5,5	0,161	0,016
7	9,5	0,229	0,035	4,5	0,305	0,041	5,5	0,547	0,041
8	9,5	-0,004	0,010	4,5	-0,001	0,010	5,5	-0,010	0,005
9	9,5	-0,002	0,010	4,5	0,009	0,011	5,5	-0,005	0,006

Donde:

El volumen1 contiene 0,5 mL de muestra, 0,5 mL de DNS, 3,5 mL de Estabilizante y 5 mL de Agua.

El volumen 2 contiene 0,5 mL de muestra, 0,5 mL de DNS y 3,5 mL de Estabilizante.

El volumen 3 contiene 1 mL de muestra, 1 mL de DNS y 3,5 mL de Estabilizante.

ANEXO B

PRELIMINAR DE PRE-TRATAMIENTO ÁCIDO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Antes de realizar el posterior planeamiento experimental se realizó este preliminar para determinar si existe alguna diferencia de resultados entre bagazo de caña tamizado y el in-natura (sin tamizar).

Para este caso solo se trabajaron dos muestras para cada ácido con diferente concentración en un tiempo y proporción de biomasa fija, 60 minutos y 4% peso/volumen respectivamente.

Preliminar Ácido Fosfórico

Muestra	Concentración Ácido	Tiempo (min)
1	0,5	60
1*	0,5	60
2	0,1	60
2*	0,1	60

* tamizado

Resultados del Pre-tratamiento

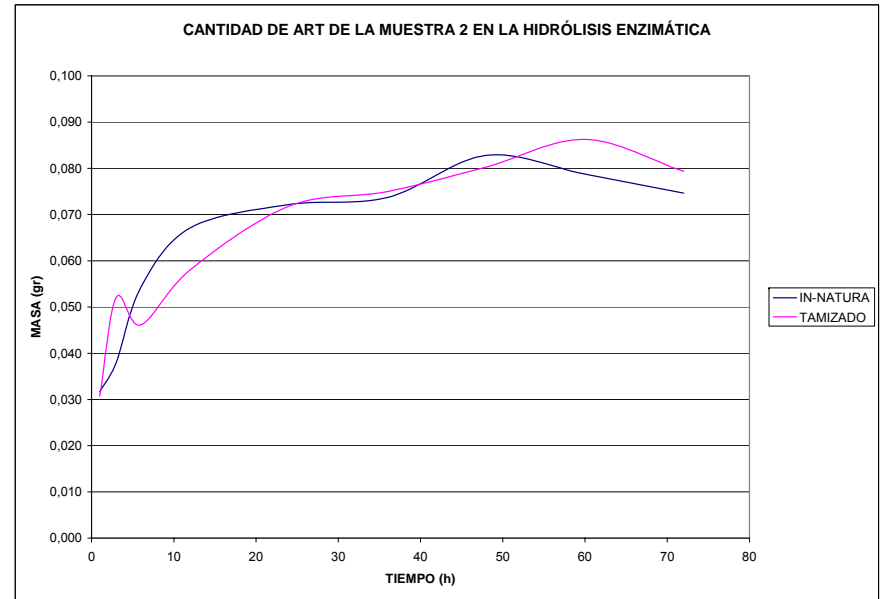
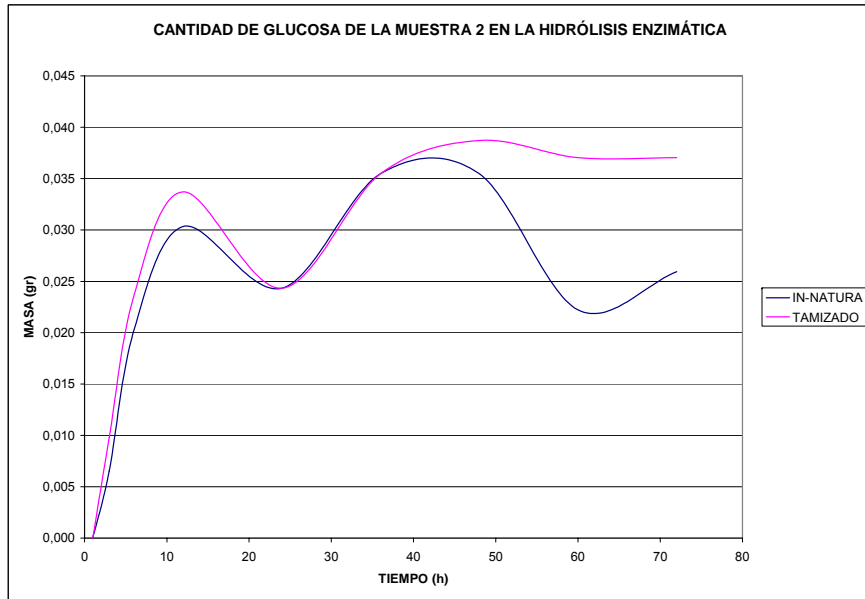
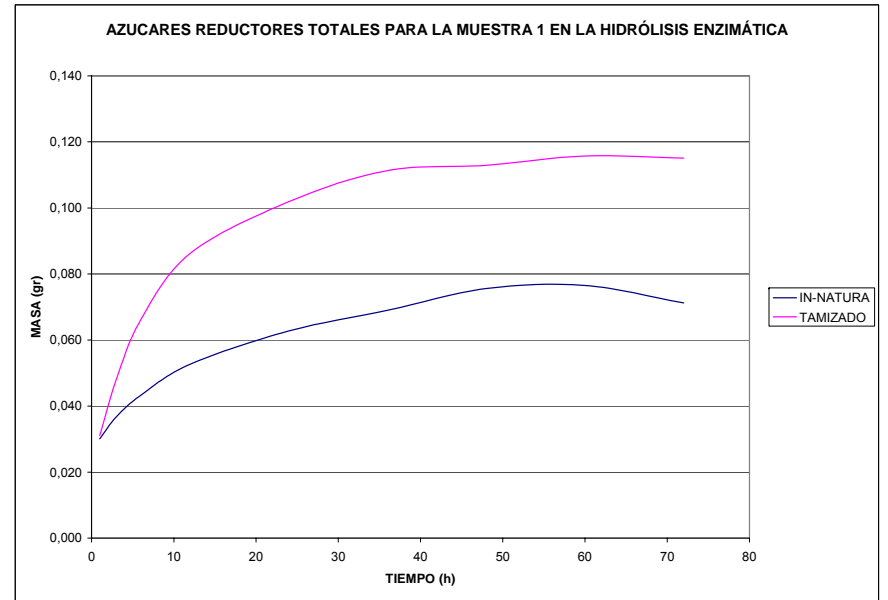
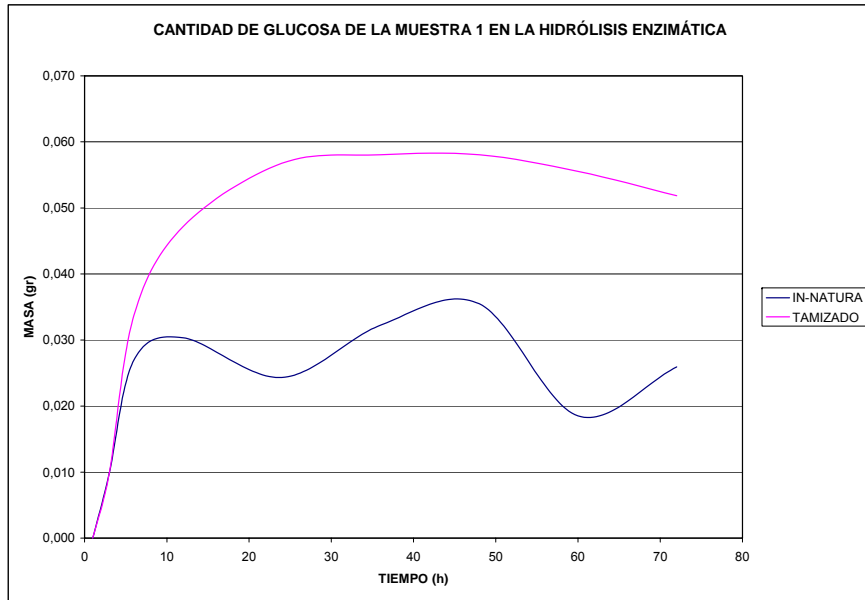
Muestra	[ART] (mg/mL)	Masa ART(g)	[Glucosa] (mg/mL)	Glucosa (g)
1	4,151	0,415	0,062	0,006
1*	3,988	0,399	0,049	0,005
2	1,926	0,193	0,037	0,004
2*	2,195	0,220	0,037	0,004

Cantidades máximas de Glucosa y ART obtenidas en la Hidrólisis enzimática

Muestra	[ART] (mg/mL)	Masa ART (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa (g)
1	0,255	0,077	0,118	0,035
1*	0,276	0,083	0,118	0,035
2	0,386	0,116	0,194	0,058
2*	0,288	0,086	0,129	0,039

* tamizado

Gráficas de la variación de las concentraciones de ART y glucosa en la Hidrólisis Enzimática.



Preliminar Ácido Sulfúrico

Muestra	Concentración Ácido	Tiempo (min)
3	0,8	60
3*	0,8	60
4	0,3	60
4*	0,3	60

* Tamizado

Resultados del Pre-tratamiento

Muestra	[ART] (mg/mL)	Masa ART (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa(g)
3	9,834	0,983	0,364	0,036
3*	10,404	1,040	0,390	0,039
4	8,254	0,825	0,143	0,014
4*	8,276	0,828	0,169	0,017

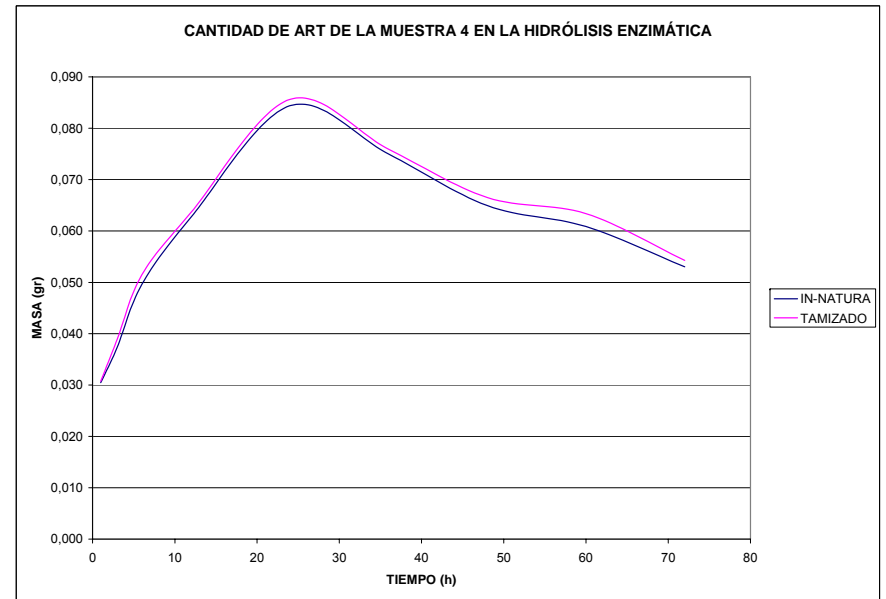
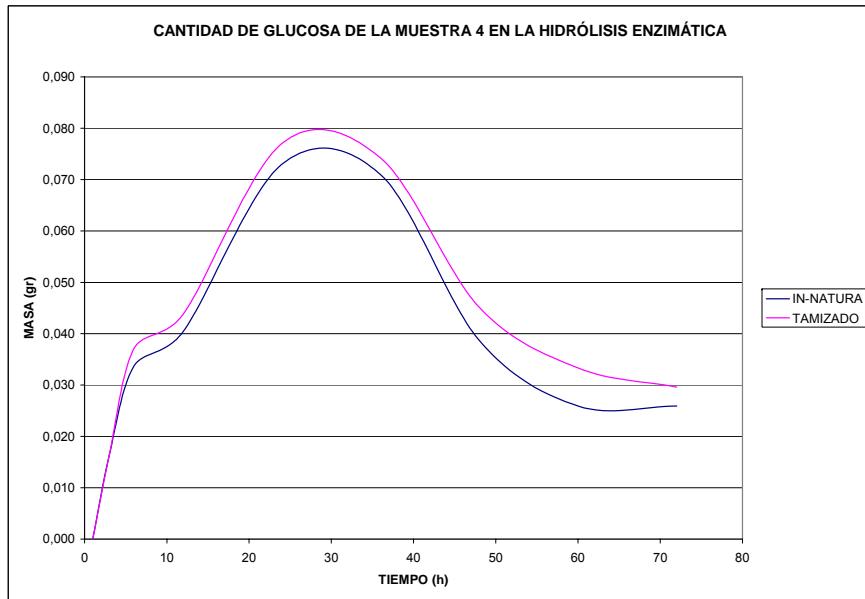
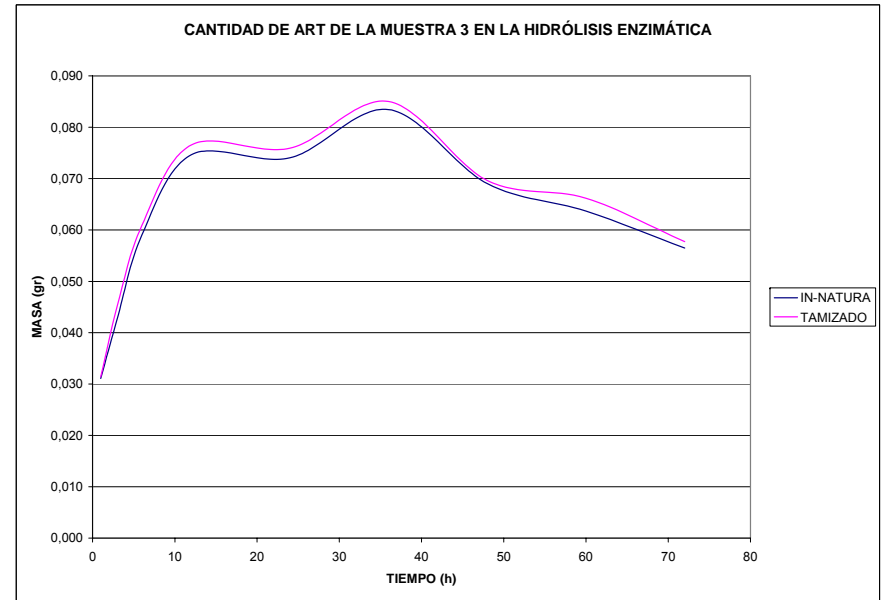
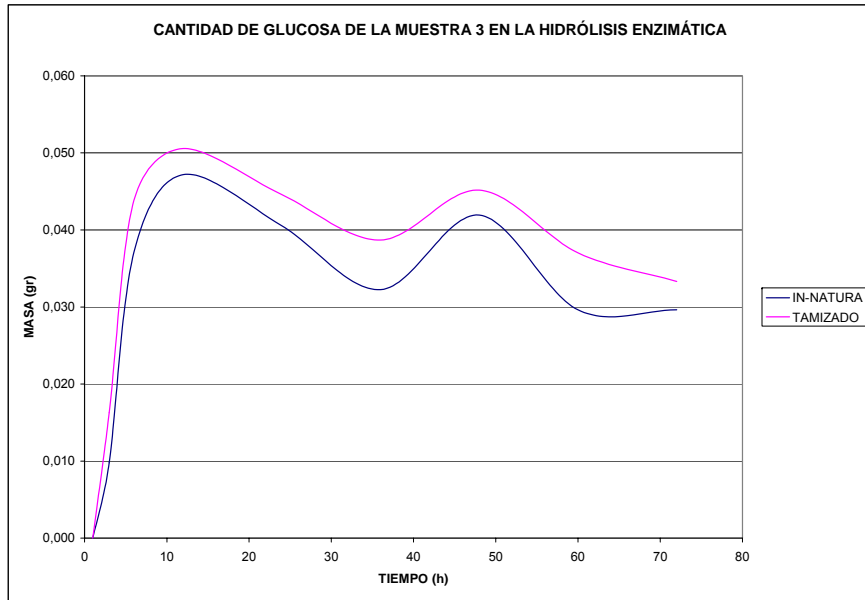
* Tamizado

Cantidades máximas de Glucosa y ART obtenidas en la Hidrólisis enzimática

Muestra	[ART] (mg/mL)	[ART] (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa(g)
3	0,278	0,083	0,157	0,047
3*	0,283	0,085	0,169	0,051
4	0,281	0,084	0,243	0,073
4*	0,285	0,086	0,257	0,077

* tamizado

Gráficas de la variación de las concentraciones de ART y glucosa en la Hidrólisis Enzimática.



ANEXO C

PRIMER PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL DE COMPOSICIÓN CENTRAL PARA EL ÁCIDO FOSFÓRICO

Se inició el primer planeamiento experimental de composición central para el ácido fosfórico con una variación de concentración entre 0,5-2% v/v y en un intervalo de tiempo de 30-90 min.

Muestra	Concentración de ácido (v/v%)	Tiempo (min)
1	0,5	30
2	0,5	90
3	2	30
4	2	90
5	0,19	60
6	2,31	60
7	1,25	18
8	1,25	102
9.1	1,25	60
9.2	1,25	60
9.3	1,25	60

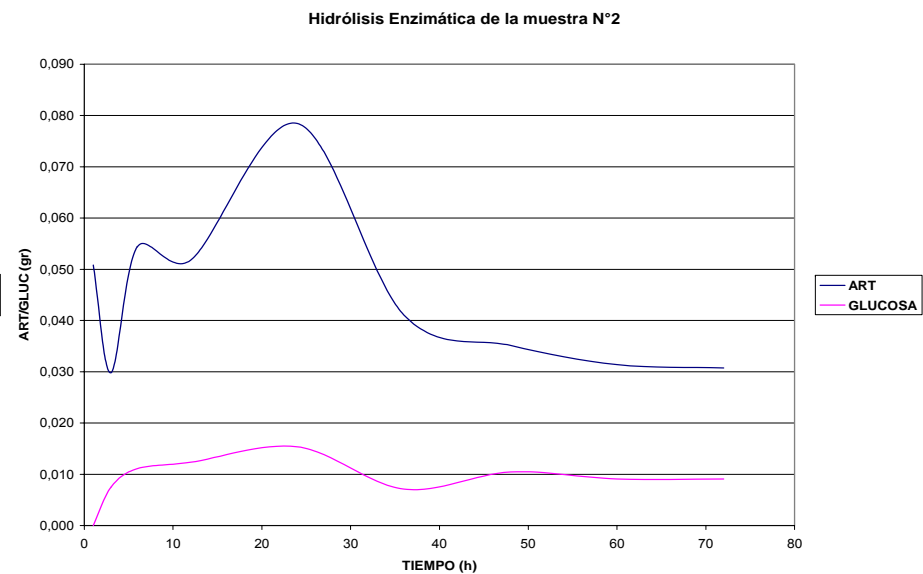
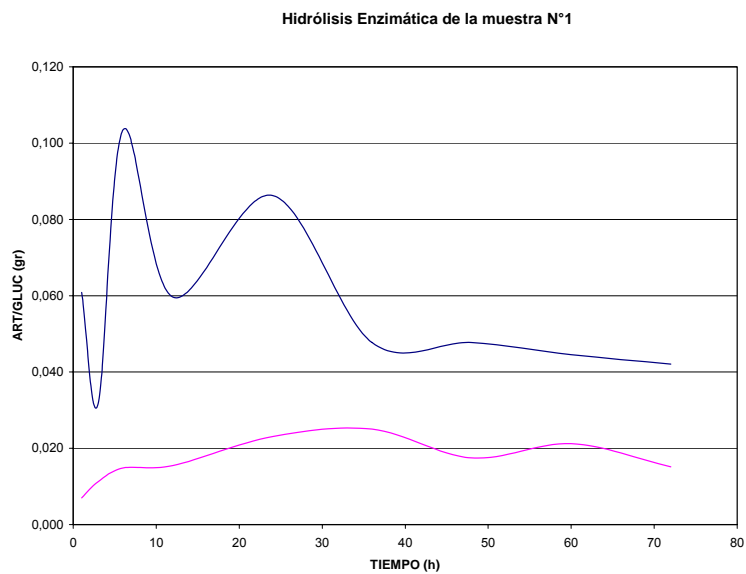
Concentración de Azúcares Reductores totales (ART) en el pre-tratamiento:

Muestra	[ART] real (mg/mL)	Masa de ART (g)
1	1,693	0,169
2	2,559	0,256
3	0,286	0,029
4	0,345	0,034
5	2,302	0,230
6	0,324	0,032
7	0,283	0,028
8	0,332	0,033
9.1	0,300	0,030
9.2	0,281	0,028
9.3	0,283	0,028

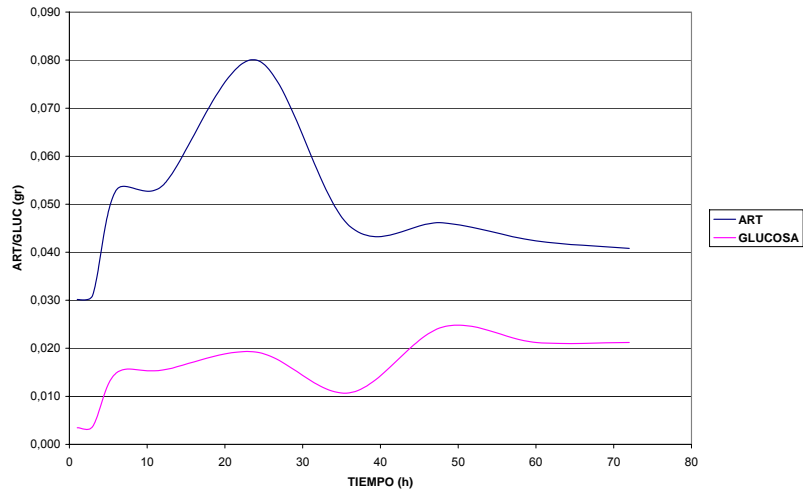
Concentración máxima de Glucosa y ART obtenido en la Hidrólisis enzimática

Muestra	[ART] (mg/mL)	Masa ART (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa (g)
1	0,159	0,048	0,083	0,025
2	0,262	0,078	0,051	0,015
3	0,154	0,046	0,081	0,024
4	0,336	0,101	0,115	0,035
5	0,251	0,075	0,051	0,015
6	0,275	0,083	0,103	0,031
7	0,246	0,074	0,051	0,015
8	0,328	0,098	0,128	0,038
9,1	0,174	0,052	0,093	0,028
9,2	0,164	0,049	0,081	0,024
9,3	0,312	0,094	0,103	0,031

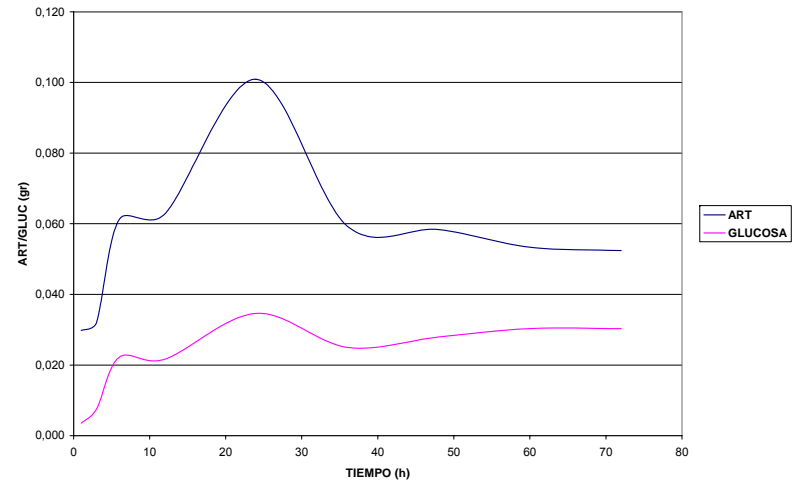
Gráficas de la variación de las concentraciones de ART y glucosa en la Hidrólisis Enzimática.



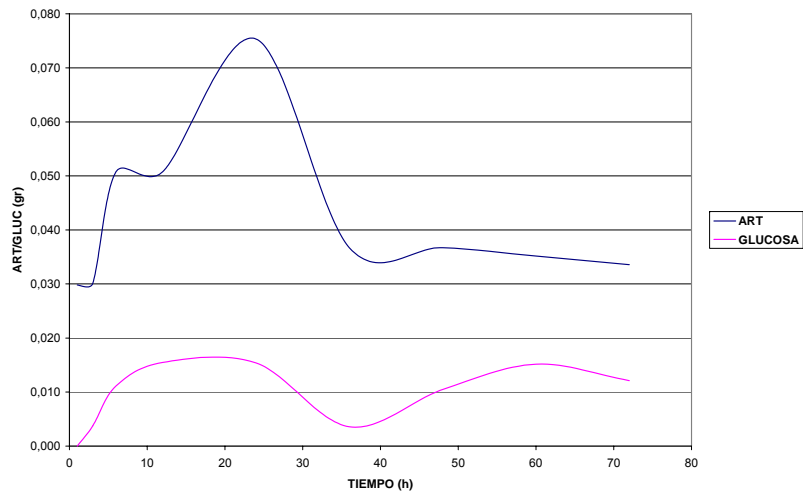
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°3



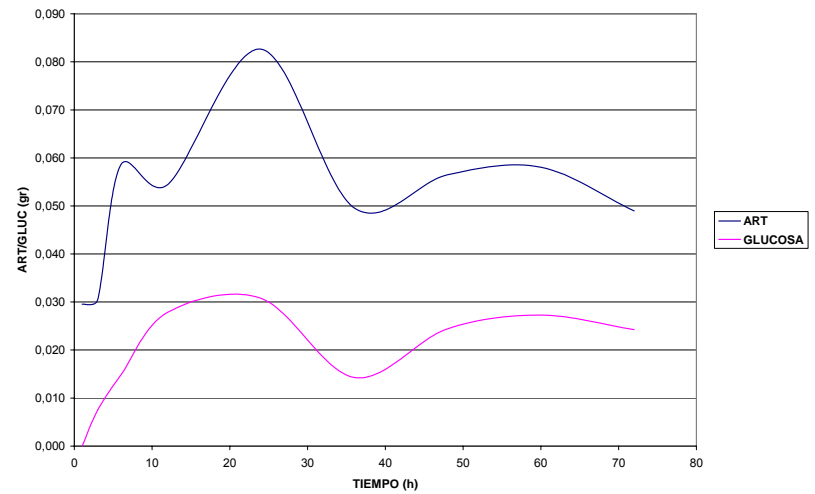
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°4



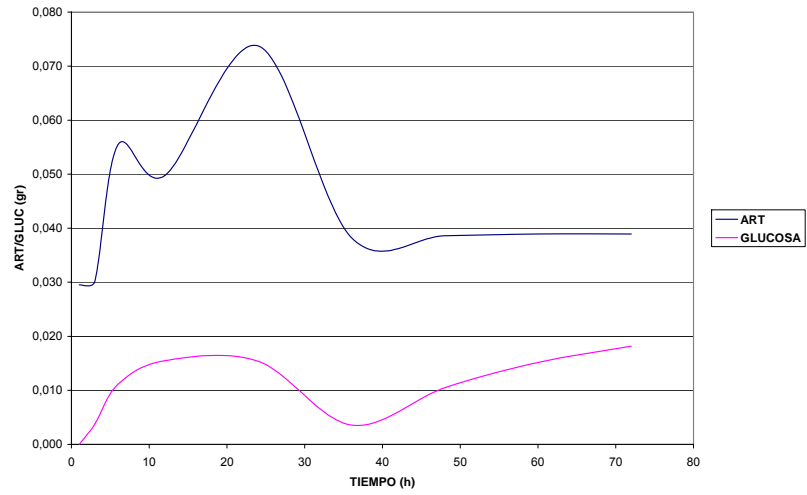
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°5



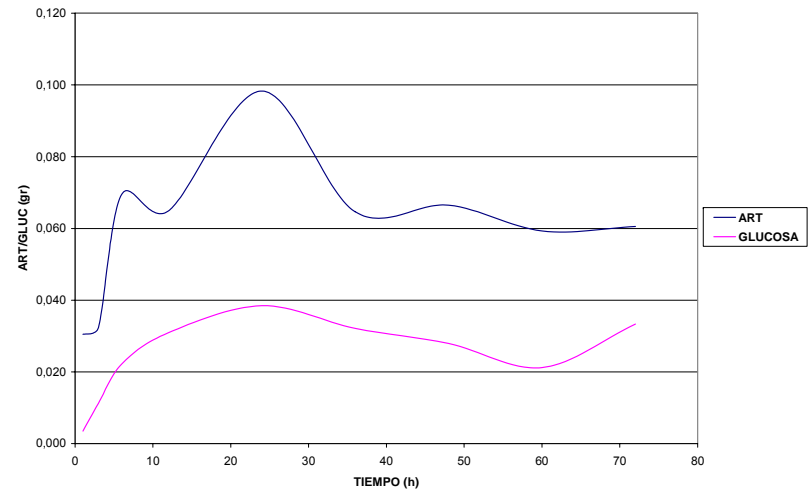
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°6



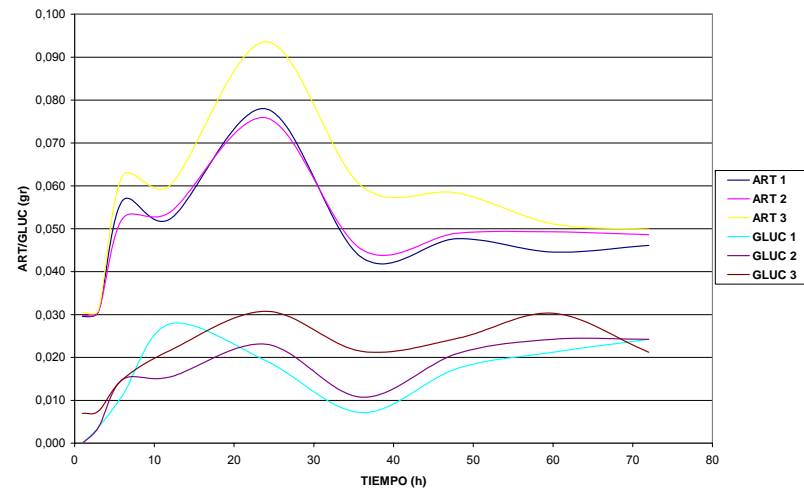
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°7



Hidrólisis Enzimática de la muestra N°8

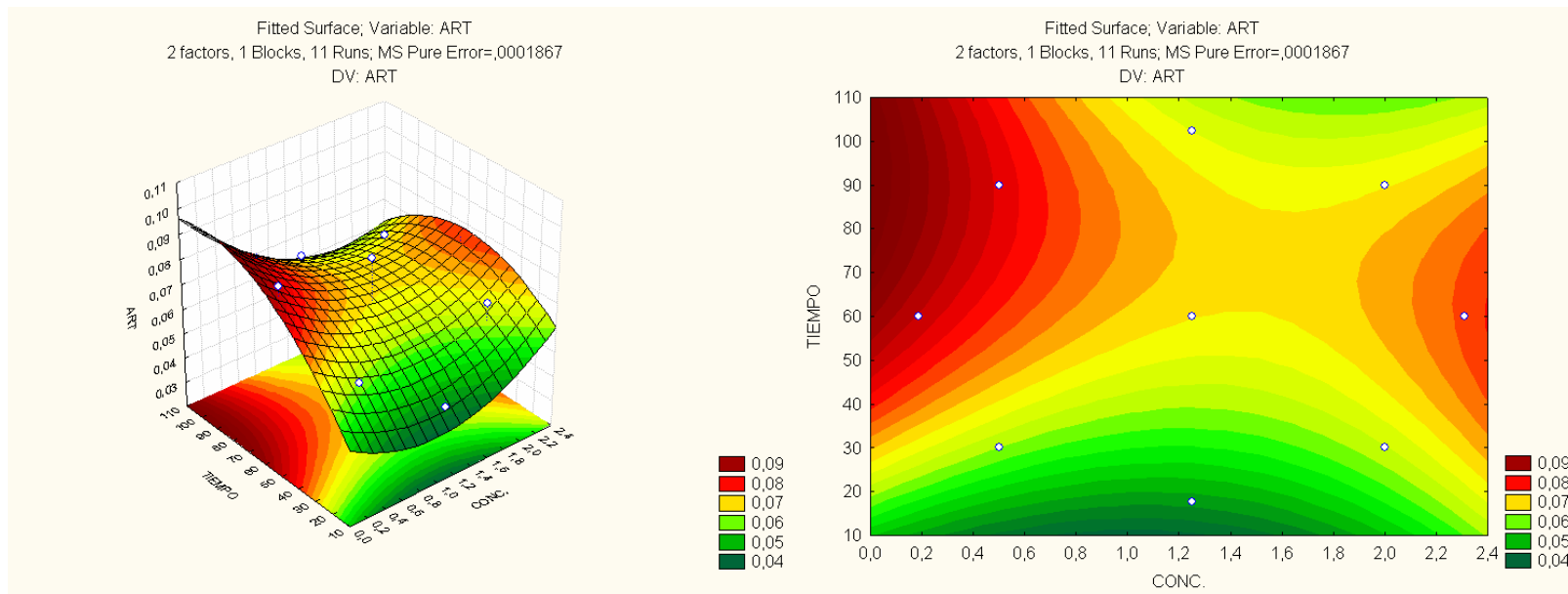


Hidrólisis Enzimática de las muestras N°9



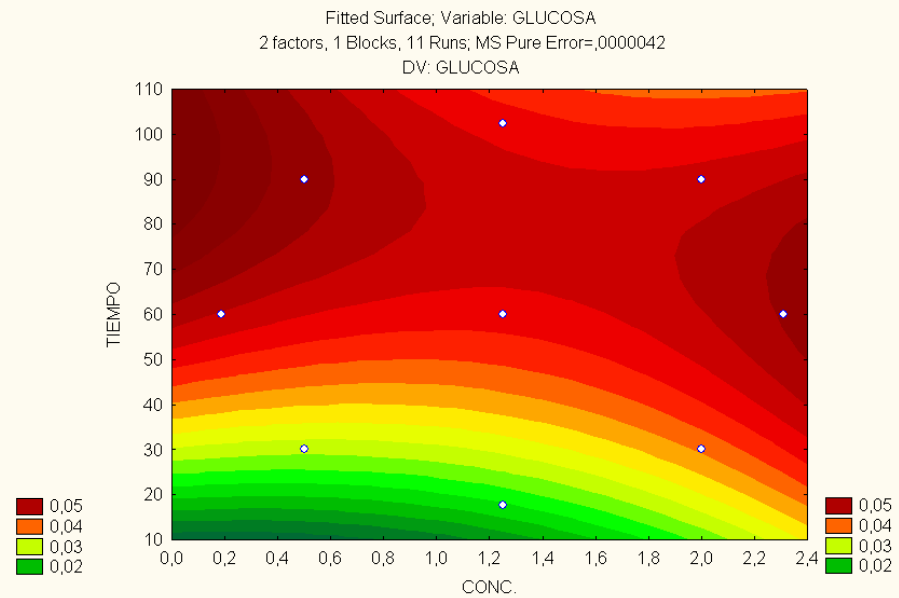
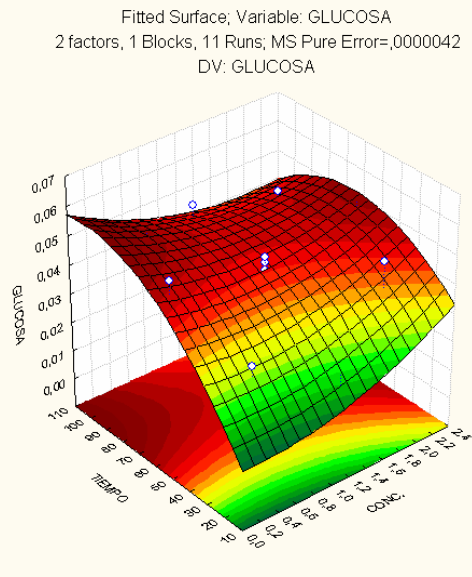
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PRIMER PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL DE COMPOSICIÓN CENTRAL DEL ÁCIDO FOSFÓRICO

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO Y DE TIEMPO DE PRE-TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE AZUCRES REDUCTORES TOTALES (ART)



Effect Estimates; Var.:ART; R-sqr=,70744; Adj: ,41489 (DATOS DEL PRIMER PLANEAMIENTO ESTRELLA D 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0001867 DV: ART										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,067656	0,007890	8,57541	0,013327	0,044619	0,090693	0,067656	0,007890	0,044619	0,090693
(1)CONC. (L)	-0,006215	0,009663	-0,64322	0,585988	-0,034430	0,022000	-0,003108	0,004831	-0,017215	0,011000
CONC. (Q)	0,012604	0,011501	1,09595	0,367453	-0,020978	0,046187	0,006302	0,005750	-0,010489	0,023093
(2)TIEMPO (L)	0,013484	0,009663	1,39552	0,297614	-0,014730	0,041699	0,006742	0,004831	-0,007365	0,020850
TIEMPO (Q)	-0,012212	0,011501	-1,06186	0,399564	-0,045795	0,021370	-0,006106	0,005750	-0,022897	0,010685
1L by 2L	-0,008464	0,013665	-0,61937	0,598828	-0,048365	0,031438	-0,004232	0,006833	-0,024183	0,015719

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO Y DE TIEMPO DE PRE-TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE GLUCOSA



Effect Estimates; Var.:GLUCOSA; R-sqr=,7947; Adj: ,65783 (DATOS DEL PRIMER PLANEAMIENTO ESTRELLA) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0000042 DV: GLUCOSA										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-90, % Cnf.Limt	+90, % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90, % Cnf.Limt	+90, % Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,043241	0,001190	36,34431	0,000756	0,039767	0,046715	0,043241	0,001190	0,039767	0,046715
CONC.(Q)	0,006081	0,001734	3,50628	0,072594	0,001017	0,011145	0,003041	0,000867	0,000508	0,005573
(2)TIEMPO (L)	0,015380	0,001457	10,55477	0,008857	0,011125	0,019635	0,007690	0,000729	0,005562	0,009817
TIEMPO (Q)	-0,010498	0,001734	-6,05289	0,026226	-0,015562	-0,005434	-0,005249	0,000867	-0,007781	-0,002717
1L by 2L	-0,006516	0,002061	-3,16206	0,087140	-0,012533	-0,000499	-0,003258	0,001030	-0,006267	-0,000249

ANEXO D

PRIMER PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL DE COMPOSICIÓN CENTRAL DEL ÁCIDO SULFÚRICO

Se inició el primer planeamiento experimental de composición central para el ácido sulfúrico con una variación de concentración entre 0,3-0,8% v/v y en un intervalo de tiempo de 30-90 min.

Muestra	Concentración de ácido (%v/v)	Tiempo (min)
1	0,3	30
2	0,3	90
3	0,8	30
4	0,8	90
5	0,2	60
6	0,9	60
7	0,55	18
8	0,55	102
9,1	0,55	60
9,2	0,55	60
9,3	0,55	60

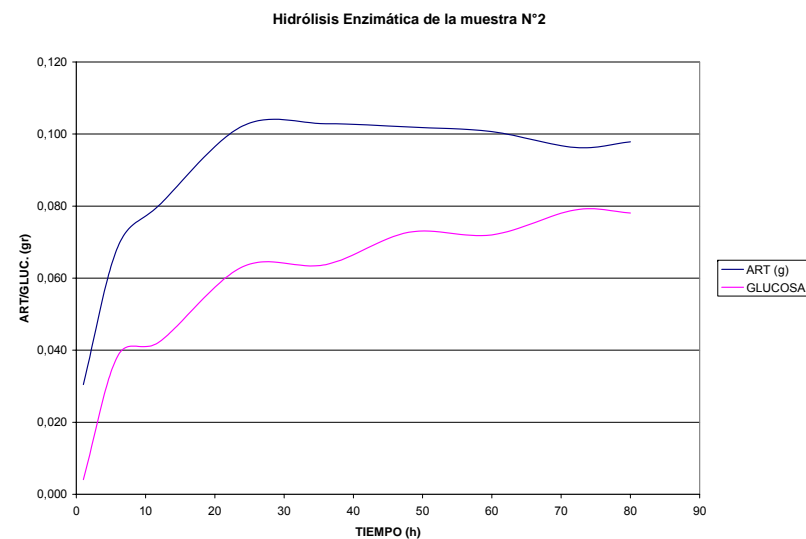
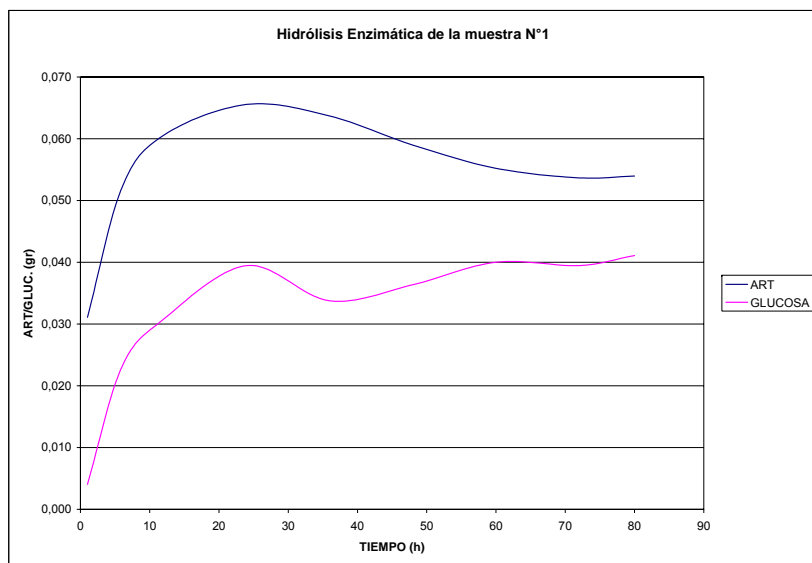
Concentración de Azúcares Reductores totales (ART) y de Glucosa en el pre-tratamiento:

Muestra	[ART] (mg/mL)	Masa ART (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa(g)
1	4,734	0,473	0,064	0,006
2	3,763	0,376	0,223	0,022
3	3,666	0,367	0,266	0,027
4	4,411	0,441	0,362	0,036
5	5,350	0,535	0,117	0,012
6	7,099	0,710	0,319	0,032
7	4,734	0,473	0,128	0,013
8	7,423	0,742	0,319	0,032
9,1	16,373	1,637	0,266	0,027
9,2	10,468	1,047	0,277	0,028
9,3	9,107	0,911	0,255	0,026

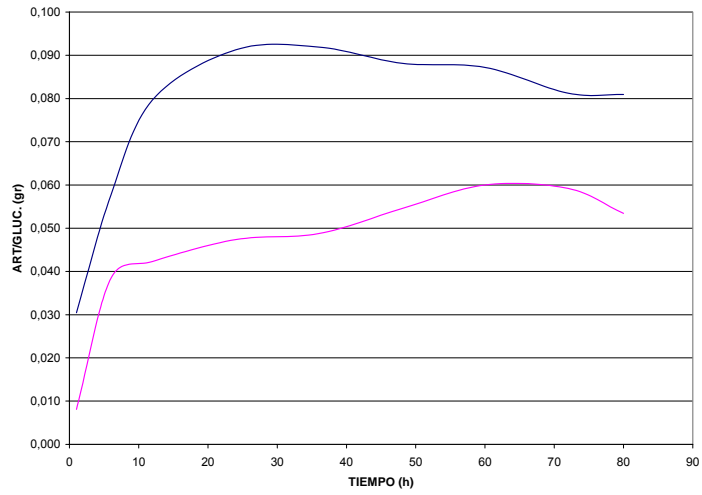
Concentración máxima de Glucosa y ART obtenido en la Hidrólisis enzimática

Muestra	[ART] (mg/mL)	Masa ART (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa(g)
1	0,180	0,054	0,137	0,041
2	0,321	0,096	0,263	0,079
3	0,291	0,087	0,200	0,060
4	0,201	0,060	0,118	0,036
5	0,201	0,060	0,151	0,045
6	0,199	0,060	0,132	0,039
7	0,306	0,092	0,184	0,055
8	0,249	0,075	0,197	0,059
9,1	0,199	0,060	0,160	0,048
9,2	0,230	0,069	0,167	0,050
9,3	0,200	0,060	0,160	0,048

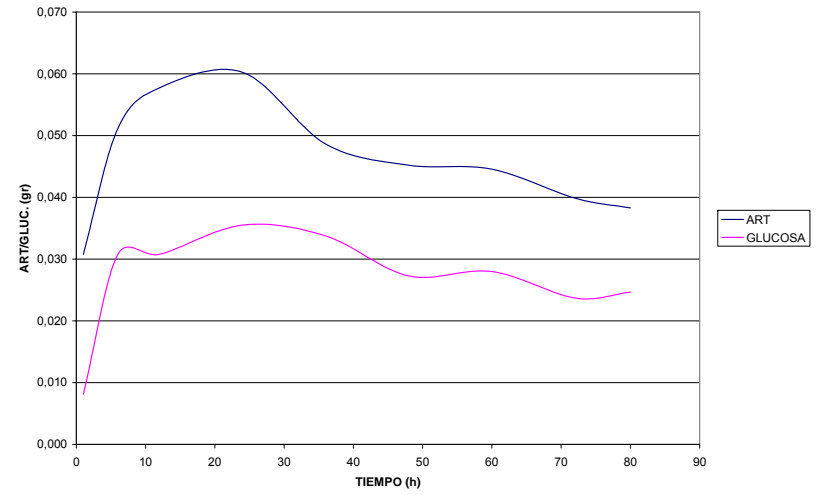
Gráficas de la variación de las concentraciones de ART y glucosa en la Hidrólisis Enzimática.



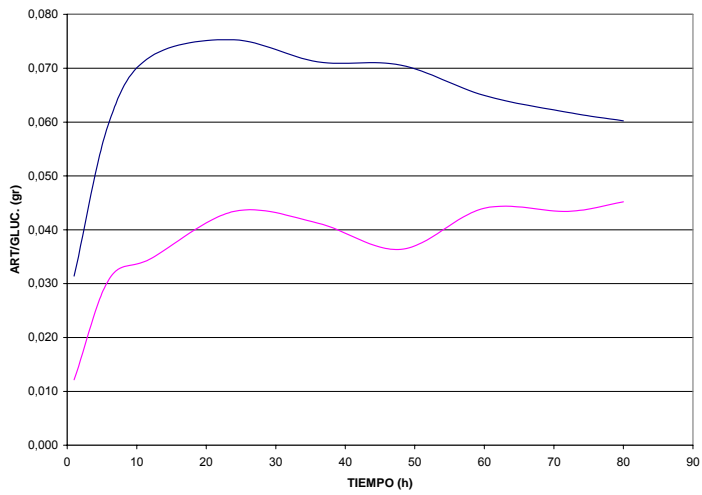
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°3



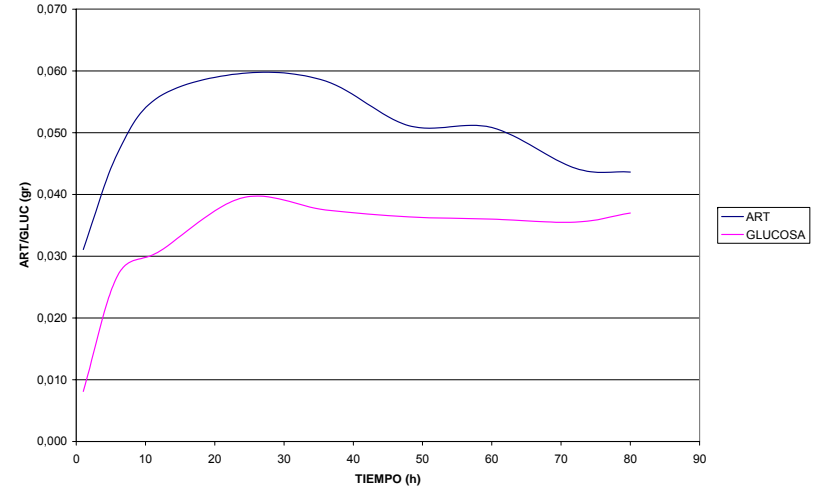
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°4



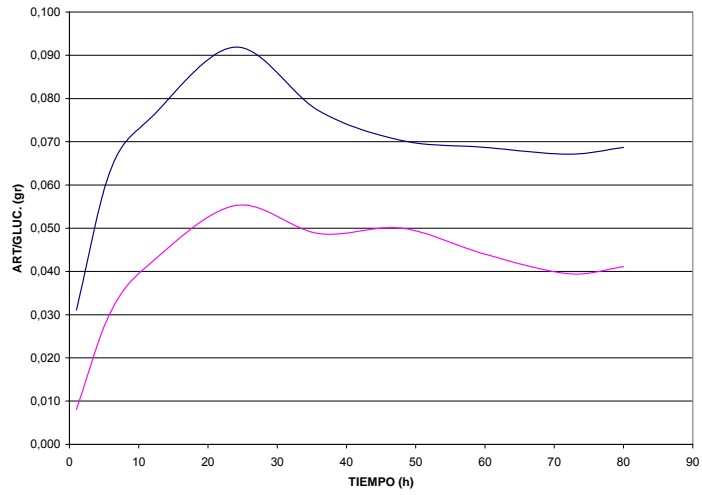
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°5



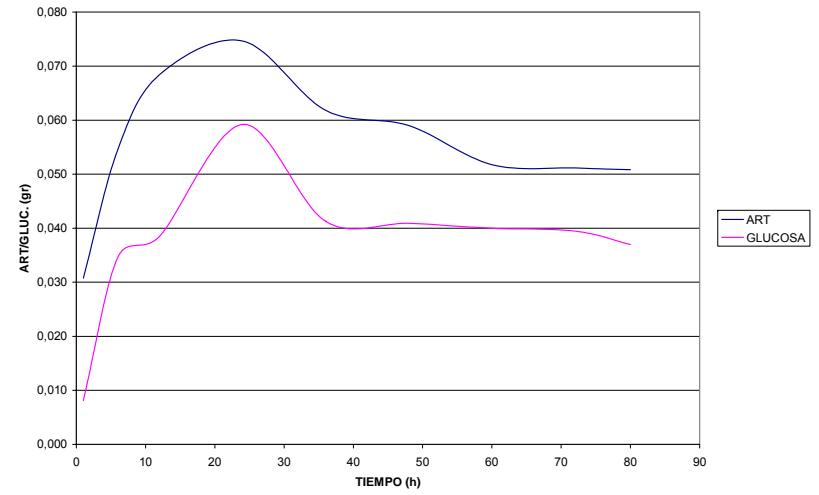
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°6



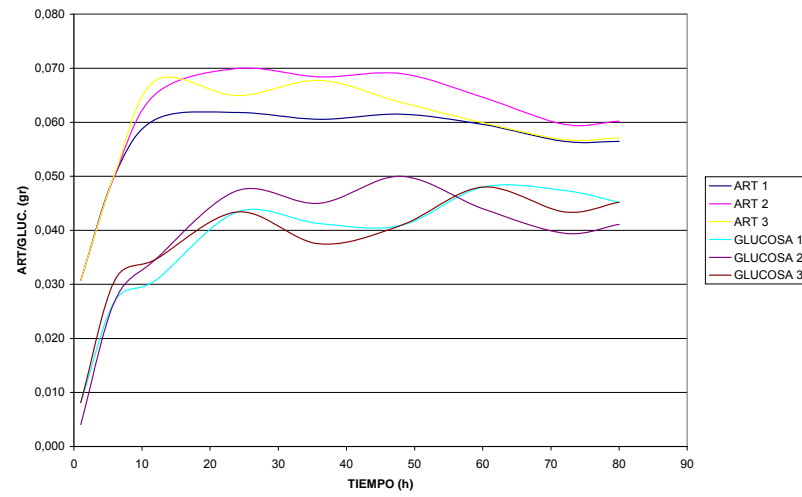
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°7



Hidrólisis Enzimática de la muestra N°8

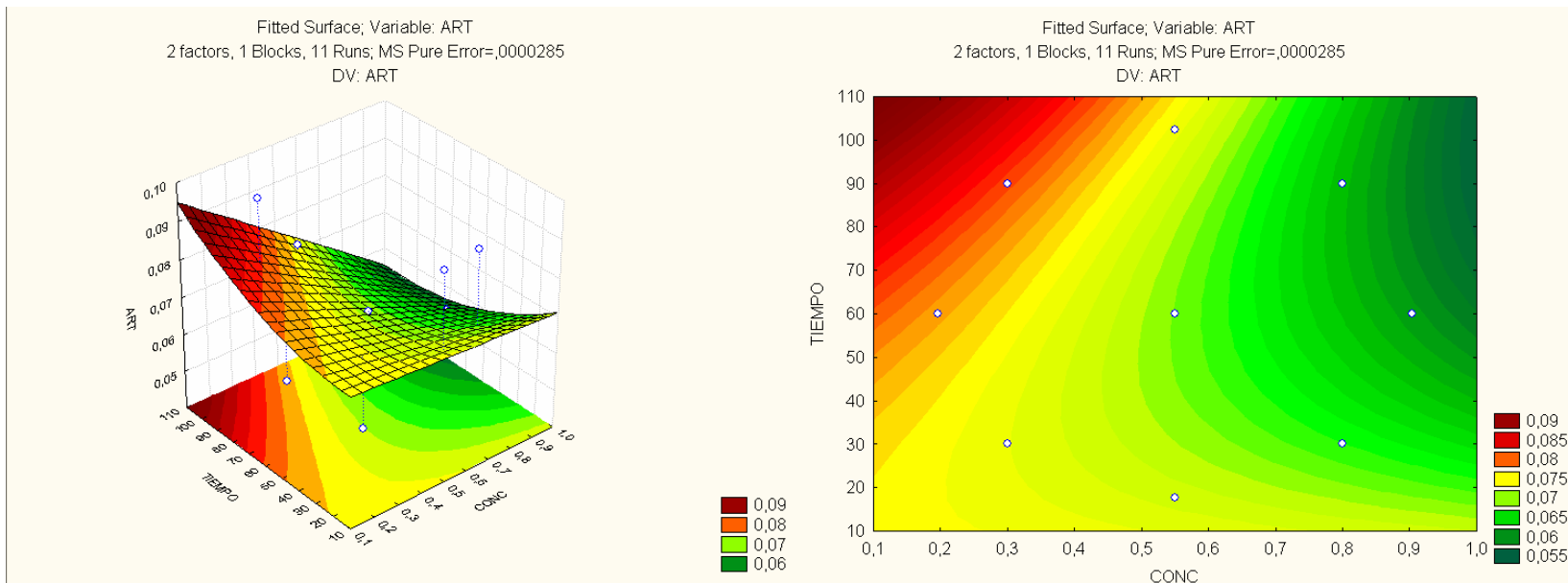


Hidrólisis Enzimática de las muestras N°9



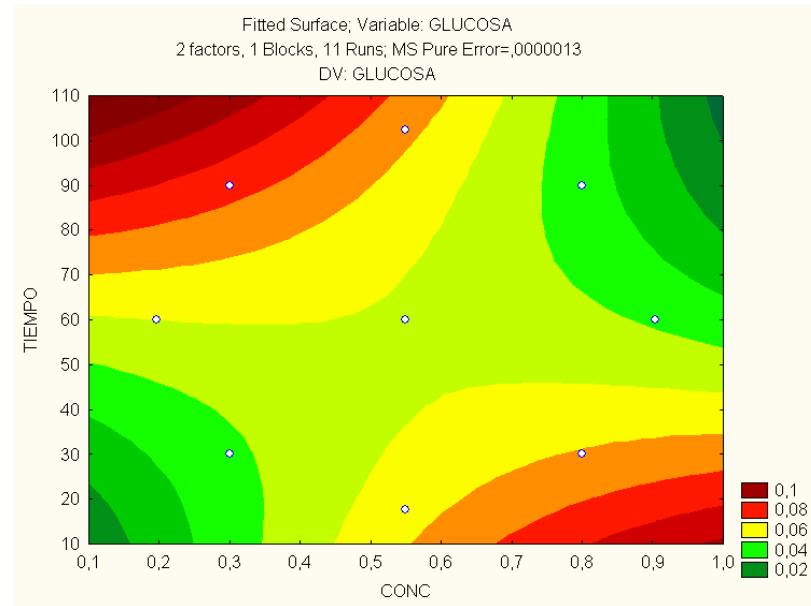
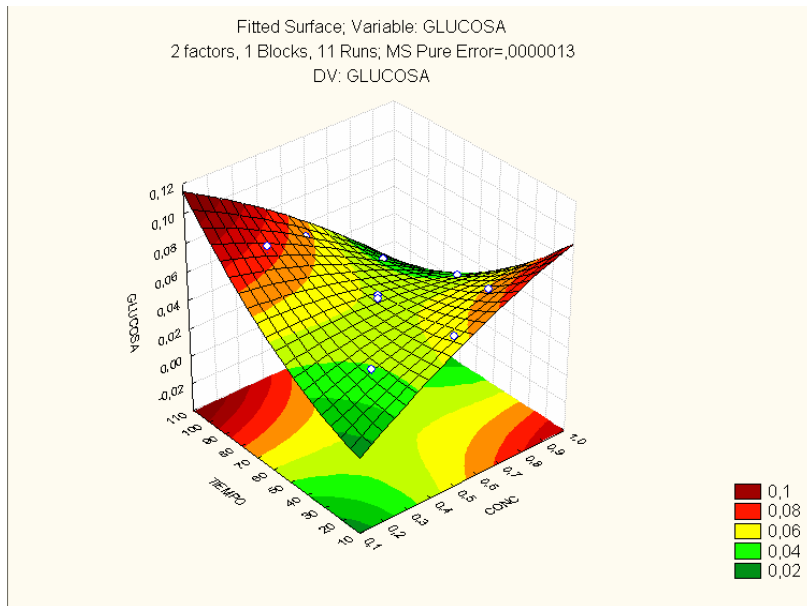
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PRIMER PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL DE COMPOSICIÓN CENTRAL DEL ÁCIDO SULFURICO

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO Y DE TIEMPO DE PRE-TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES (ART)



Effect Estimates; Var.:ART; R-sqr=,87307; Adj: ,84134 (DATOS DEL 1ER PLANEAMIENTO ESTRELLA DEL AC 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0000285 DV: ART										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-90, % Cnf.Limt	+90, % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90, % Cnf.Limt	+90, % Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,062136	0,002244	27,69265	0,001301	0,055584	0,068688	0,062136	0,002244	0,055584	0,068688
TIEMPO (Q)	0,022284	0,004297	5,18654	0,035222	0,009738	0,034830	0,011142	0,002148	0,004869	0,017415
1L by 2L	-0,034638	0,005341	-6,48506	0,022962	-0,050235	-0,019042	-0,017319	0,002671	-0,025117	-0,009521

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO Y DE TIEMPO DE PRE-TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE GLUCOSA



Effect Estimates; Var.:GLUCOSA; R-sqr=.94722; Adj:.89444 (DATOS DEL 1ER PLANEAMIENTO ESTRELLA D)										
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.0000013										
DV: GLUCOSA										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,048667	0,000667	73,0000	0,000188	0,046720	0,050613	0,048667	0,000667	0,046720	0,050613
(1)CONC (L)	-0,008156	0,000816	-9,9887	0,009874	-0,010540	-0,005772	-0,004078	0,000408	-0,005270	-0,002886
CONC (Q)	-0,004275	0,000972	-4,3989	0,047989	-0,007113	-0,001437	-0,002137	0,000486	-0,003556	-0,000719
(2)TIEMPO (L)	0,004740	0,000816	5,8054	0,028413	0,002356	0,007124	0,002370	0,000408	0,001178	0,003562
TIEMPO (Q)	0,010622	0,000972	10,9302	0,008267	0,007785	0,013460	0,005311	0,000486	0,003892	0,006730
1L by 2L	-0,031163	0,001155	-26,9876	0,001370	-0,034534	-0,027791	-0,015581	0,000577	-0,017267	-0,013895

ANEXO E

SEGUNDO PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL DE COMPOSICIÓN CENTRAL DEL ÁCIDO FOSFÓRICO

Se inició el segundo planeamiento experimental de composición central para el ácido fosfórico con una variación de concentración entre 0,3-0,8% v/v y en un intervalo de tiempo de 30-90 min.

Muestra	Concentración de ácido (%v/v)	Tiempo (min)
1	0,3	30
2	0,3	90
3	0,8	30
4	0,8	90
5	0,2	60
6	0,9	60
7	0,55	18
8	0,55	102
9,1	0,55	60
9,2	0,55	60
9,3	0,55	60

Concentración de Azúcares Reductores totales (ART) y de Glucosa en el pre-tratamiento:

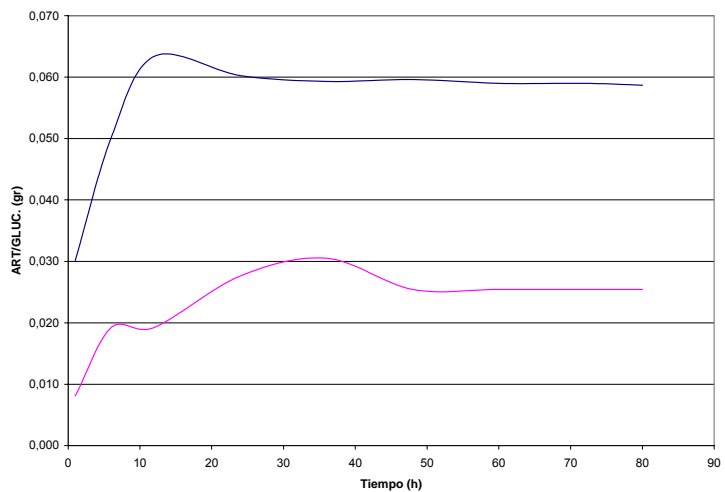
Muestra	[ART] (mg/mL)	[ART] (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Glucosa (g)
1	3,115	0,311	0,074	0,007
2	5,253	0,525	0,085	0,009
3	4,249	0,425	0,117	0,012
4	7,358	0,736	0,117	0,012
5	3,244	0,324	0,064	0,006
6	6,775	0,678	0,128	0,013
7	3,212	0,321	0,074	0,007
8	3,471	0,347	0,106	0,011
9,1	3,730	0,373	0,106	0,011
9,2	5,511	0,551	0,096	0,010
9,3	3,568	0,357	0,085	0,009

Concentración máxima de Glucosa y ART obtenido en la Hidrólisis enzimática

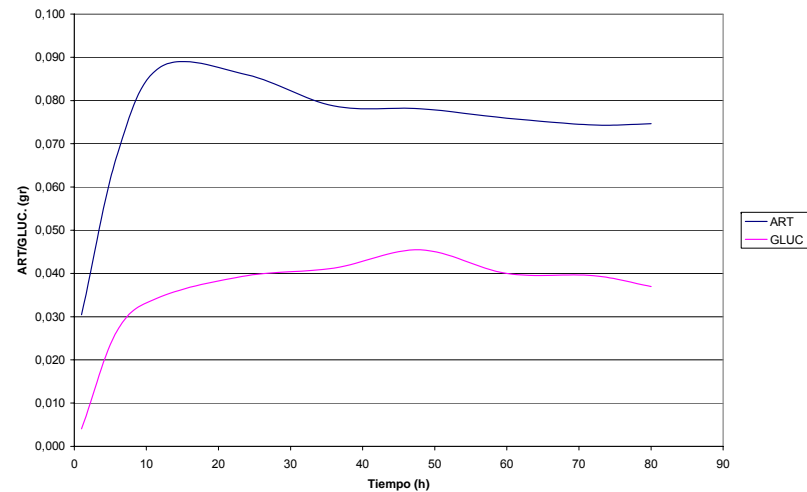
Muestra	[ART] (mg/mL)	Masa ART (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa (g)
1	0,198	0,059	0,102	0,031
2	0,260	0,078	0,152	0,045
3	0,225	0,067	0,152	0,045
4	0,231	0,069	0,158	0,047
5	0,294	0,088	0,171	0,051
6	0,237	0,071	0,150	0,045
7	0,143	0,043	0,053	0,016
8	0,222	0,067	0,158	0,047
9,1	0,278	0,083	0,145	0,043
9,2	0,199	0,060	0,137	0,041
9,3	0,200	0,060	0,151	0,045

Gráficas de la variación de las concentraciones de ART y glucosa en la Hidrólisis Enzimática.

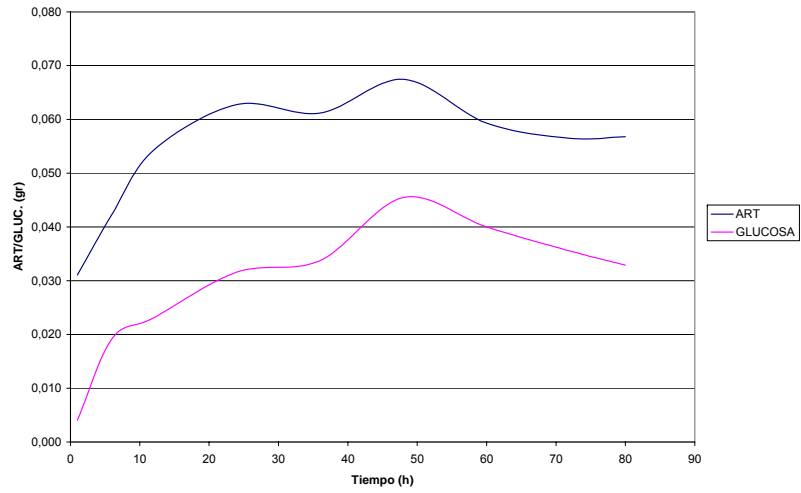
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°1



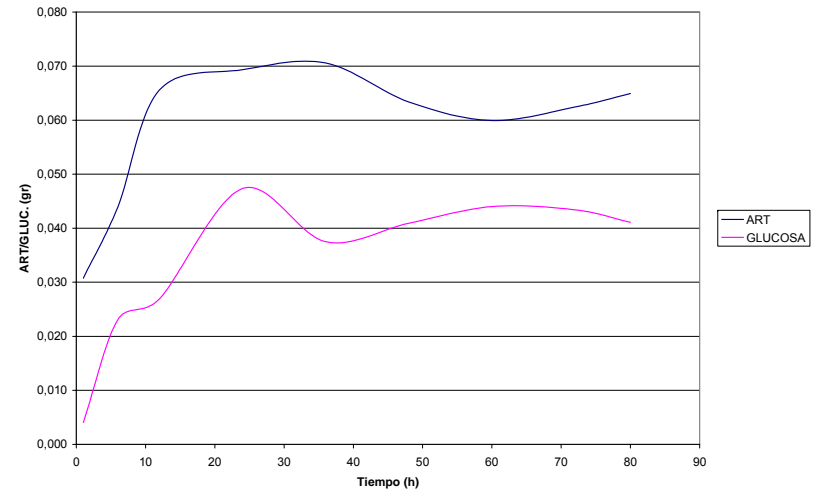
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°2



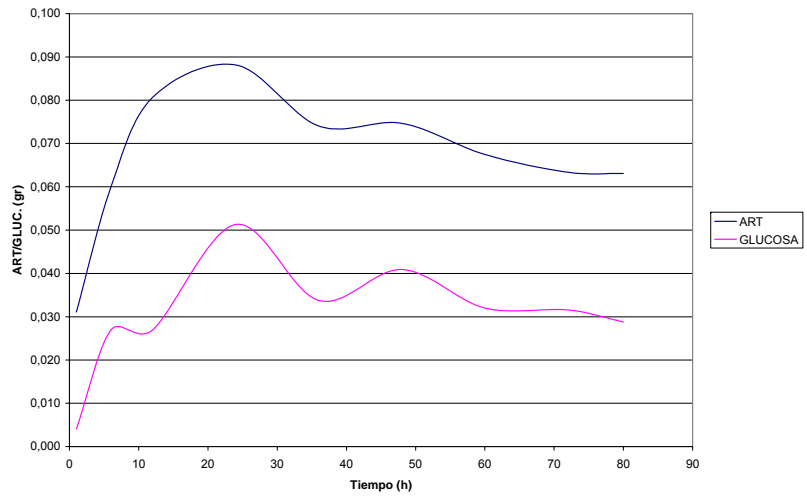
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°3



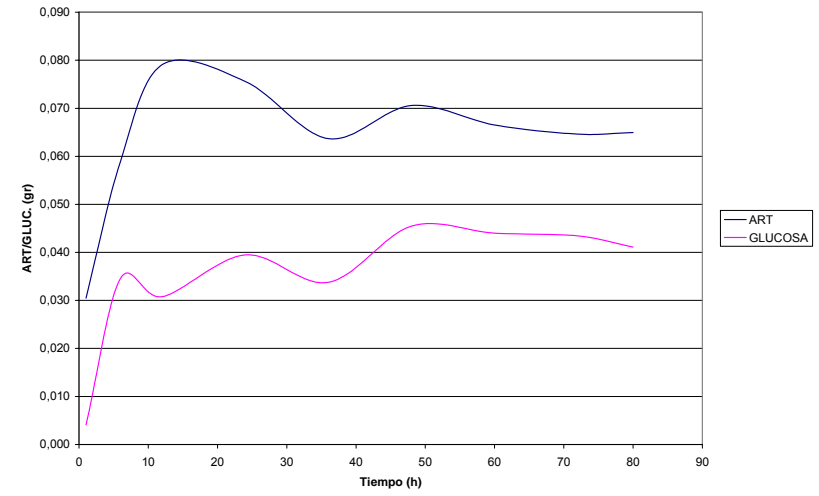
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°4



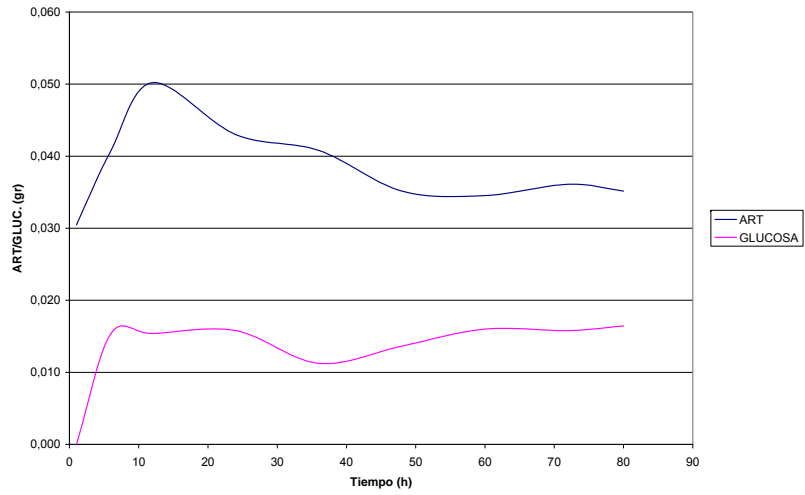
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°5



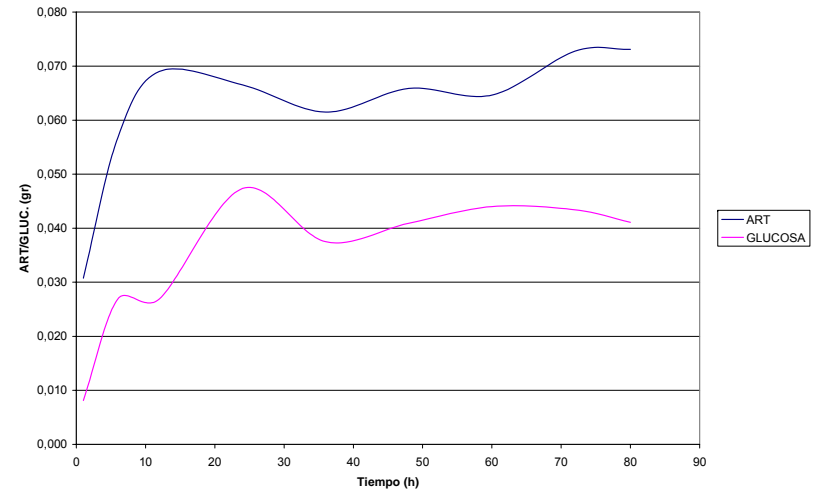
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°6



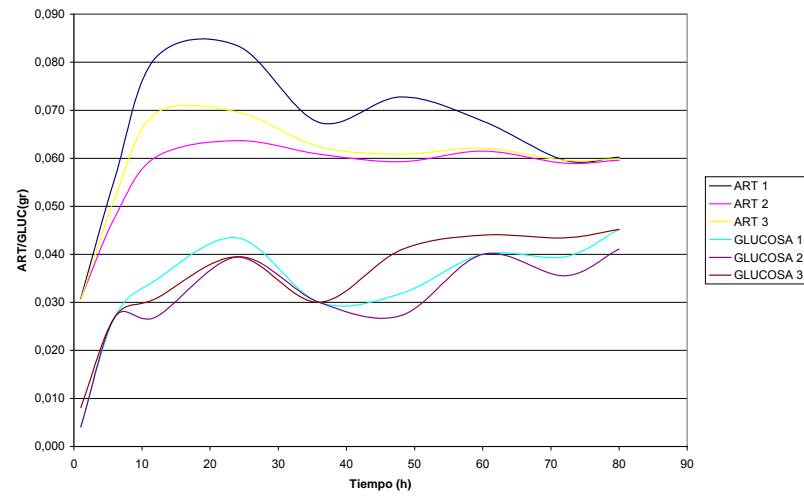
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°7



Hidrólisis Enzimática de la muestra N°8

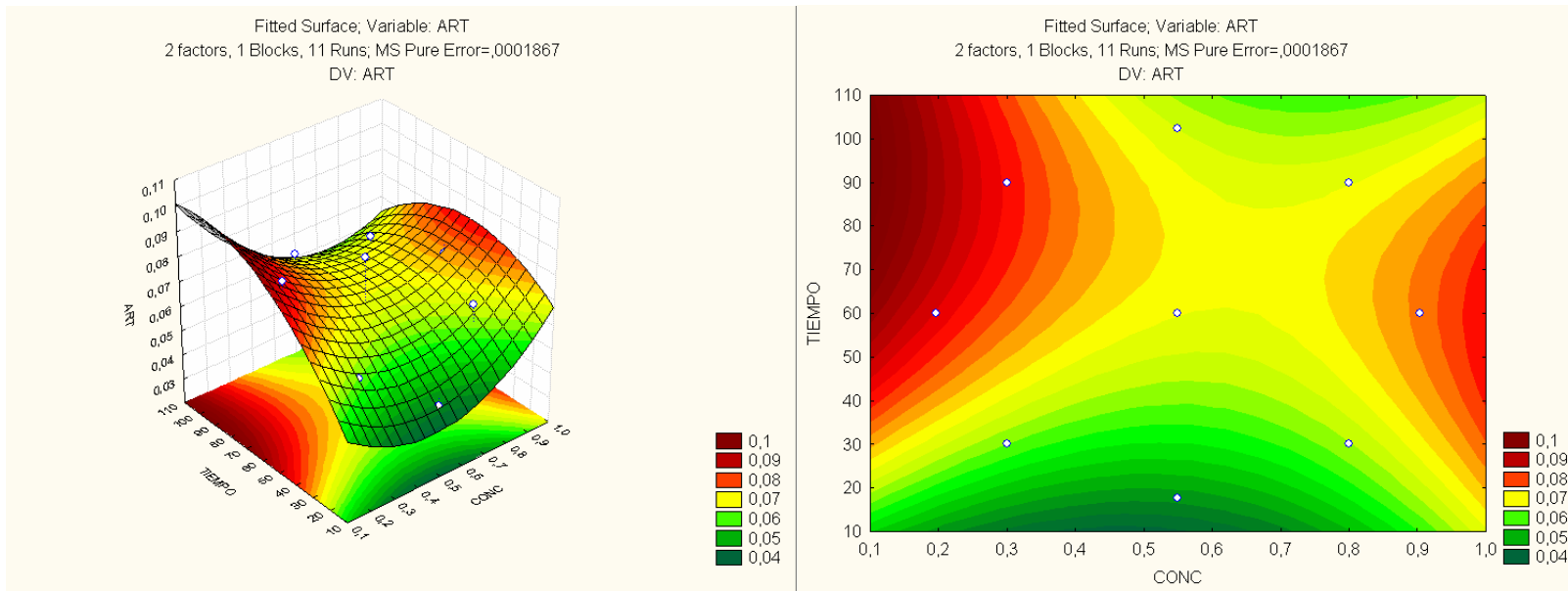


Hidrólisis Enzimática de las muestras N°9



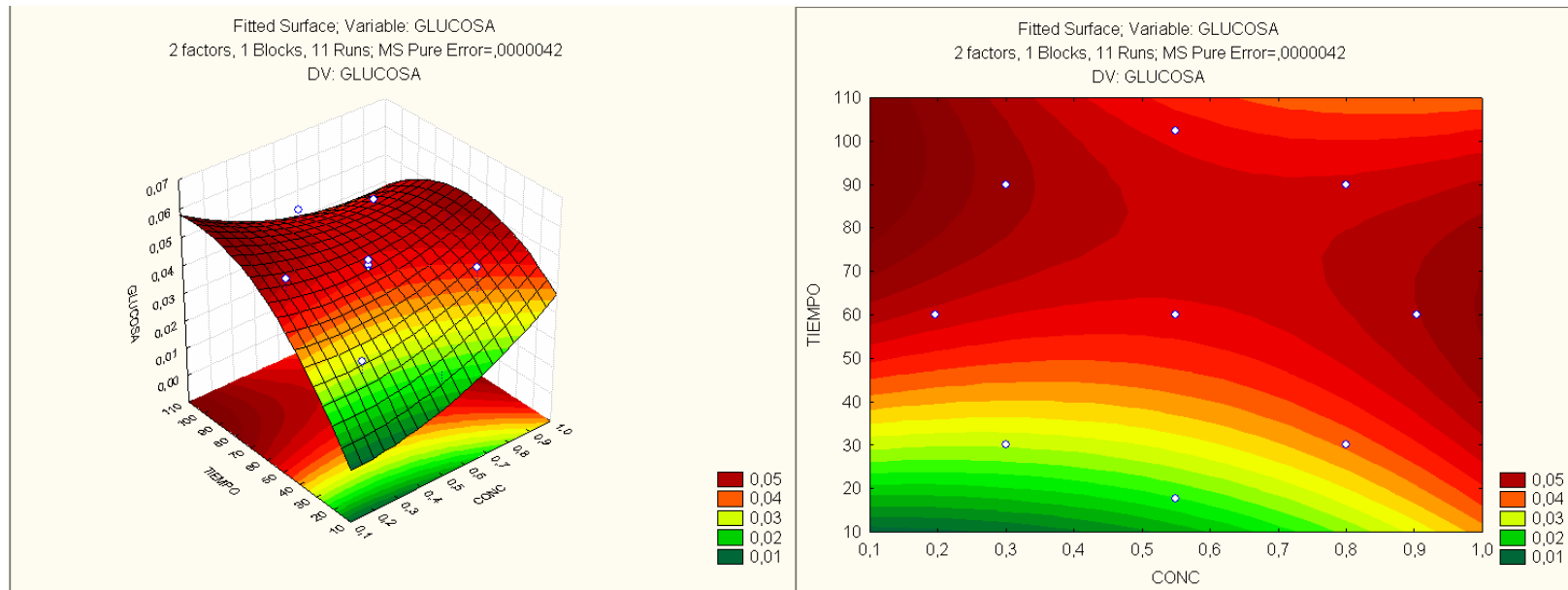
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL SEGUNDO PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL DE COMPOSICIÓN CENTRAL DEL ÁCIDO FOSFÓRICO

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO Y DE TIEMPO DE PRE-TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES



Effect Estimates; Var.:ART; R-sqr=,70744; Adj: ,41489 (DATOS DEL 2DO PLANEAMIENTO ESTRELLA DEL A 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0001867 DV: ART										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,067656	0,007890	8,57541	0,013327	0,044619	0,090693	0,067656	0,007890	0,044619	0,090693
(1)CONC (L)	-0,006215	0,009663	-0,64322	0,585988	-0,034430	0,022000	-0,003108	0,004831	-0,017215	0,011000
CONC (Q)	0,012604	0,011501	1,09595	0,387453	-0,020978	0,046187	0,006302	0,005750	-0,010489	0,023093
(2)TIEMPO (L)	0,013484	0,009663	1,39552	0,297614	-0,014730	0,041699	0,006742	0,004831	-0,007365	0,020850
TIEMPO (Q)	-0,012212	0,011501	-1,06186	0,399564	-0,045795	0,021370	-0,006106	0,005750	-0,022897	0,010685
1L by 2L	-0,008464	0,013665	-0,61937	0,598828	-0,048365	0,031438	-0,004232	0,006833	-0,024183	0,015719

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO Y DE TIEMPO DE PRE-TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE GLUCOSA



Effect Estimates; Var.:GLUCOSA; R-sqr=,7947; Adj: ,65783 (DATOS DEL 2DO PLANEAMIENTO ESTRELLA DE 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0000042 DV: GLUCOSA										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,043241	0,001190	36,34431	0,000756	0,039767	0,046715	0,043241	0,001190	0,039767	0,046715
CONC (Q)	0,006081	0,001734	3,50628	0,072594	0,001017	0,011145	0,003041	0,000867	0,000508	0,005573
(2)TIEMPO (L)	0,015380	0,001457	10,55477	0,008857	0,011125	0,019635	0,007690	0,000729	0,005562	0,009817
TIEMPO (Q)	-0,010498	0,001734	-6,05289	0,026226	-0,015562	-0,005434	-0,005249	0,000867	-0,007781	-0,002717
1L by 2L	-0,006516	0,002061	-3,16206	0,087140	-0,012533	-0,000499	-0,003258	0,001030	-0,006267	-0,000249

ANEXO F

SEGUNDO PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL DE COMPOSICIÓN CENTRAL DEL ÁCIDO SULFÚRICO

Se inició el segundo planeamiento experimental de composición central para el ácido sulfúrico con una variación de concentración entre 0,1-0,3% v/v y en un intervalo de tiempo de 90-120 min.

Muestra	Concentración de ácido (%v/v)	Tiempo (min)
1	0,10	90
2	0,10	120
3	0,30	90
4	0,30	120
5	0,06	105
6	0,34	105
7	0,20	84
8	0,20	126
9,1	0,20	105
9,2	0,20	105
9,3	0,20	105

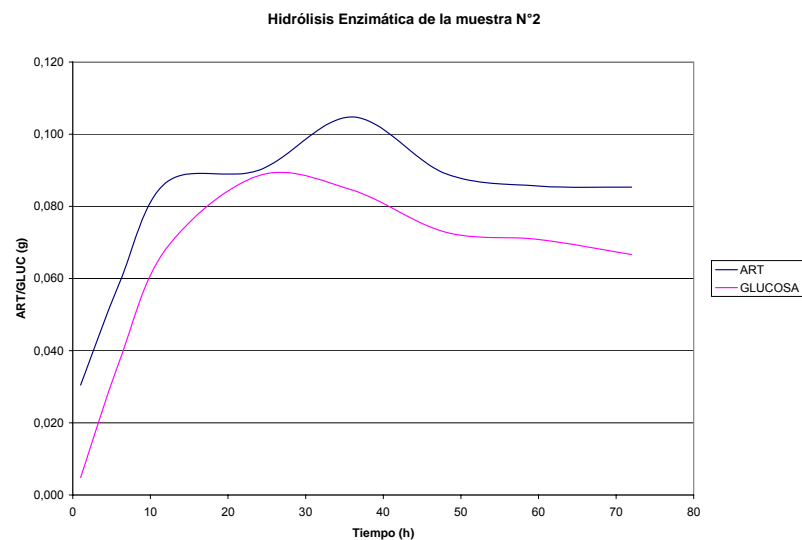
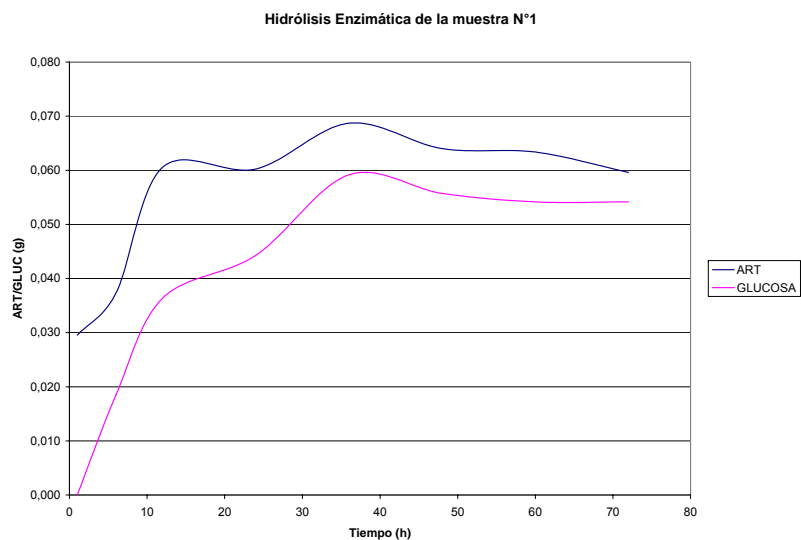
Concentración de Azúcares Reductores totales (ART) y de Glucosa en el pre-tratamiento:

Muestra	[ART] (mg/mL)	Masa ART (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa (g)
1	7,025	0,703	0,041	0,004
2	10,909	1,091	0,095	0,009
3	13,411	1,341	0,176	0,018
4	6,762	0,676	0,230	0,023
5	6,016	0,602	0,041	0,004
6	13,850	1,385	0,257	0,026
7	10,580	1,058	0,095	0,009
8	15,824	1,582	0,243	0,024
9,1	13,915	1,392	0,149	0,015
9,2	12,467	1,247	0,176	0,018
9,3	13,125	1,313	0,162	0,016

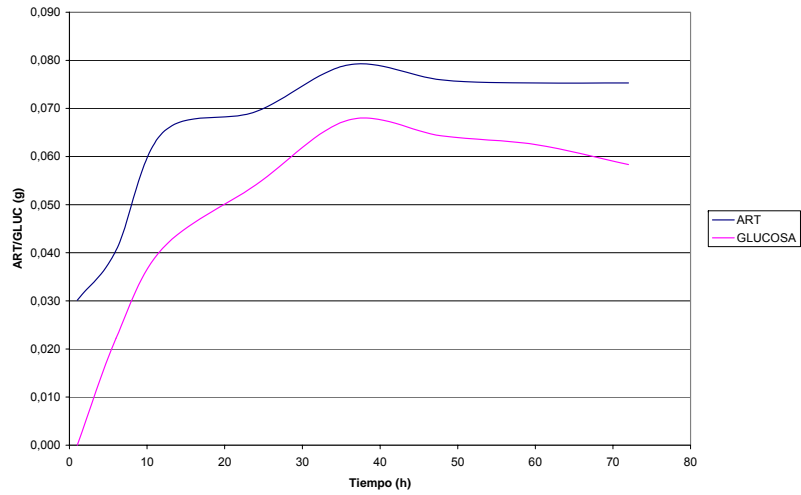
Concentración máxima de Glucosa y ART obtenido en la Hidrólisis enzimática

Muestra	[ART] (mg/mL)	Masa ART (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa (g)
1	0,229	0,069	0,197	0,059
2	0,349	0,105	0,295	0,089
3	0,263	0,079	0,225	0,068
4	0,185	0,056	0,169	0,051
5	0,173	0,052	0,113	0,034
6	0,204	0,061	0,183	0,055
7	0,197	0,059	0,183	0,055
8	0,195	0,058	0,183	0,055
9,1	0,199	0,060	0,183	0,055
9,2	0,208	0,062	0,183	0,055
9,3	0,237	0,071	0,211	0,063

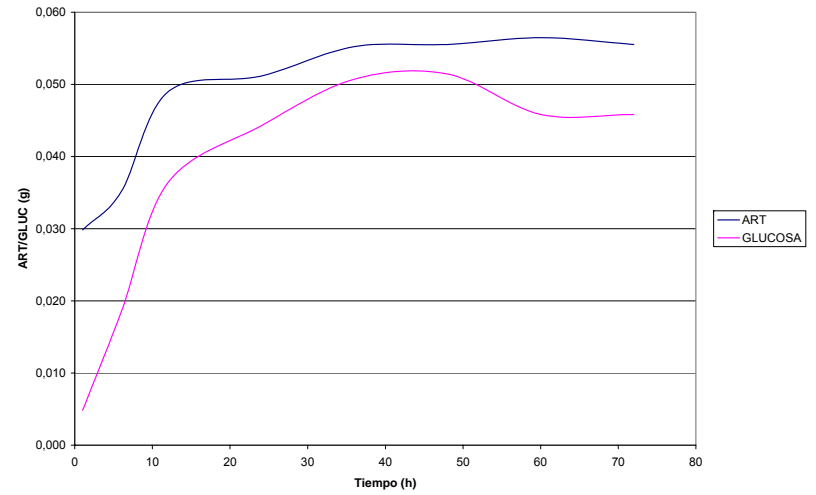
Gráficas de la variación de las concentraciones de ART y glucosa en la Hidrólisis Enzimática.



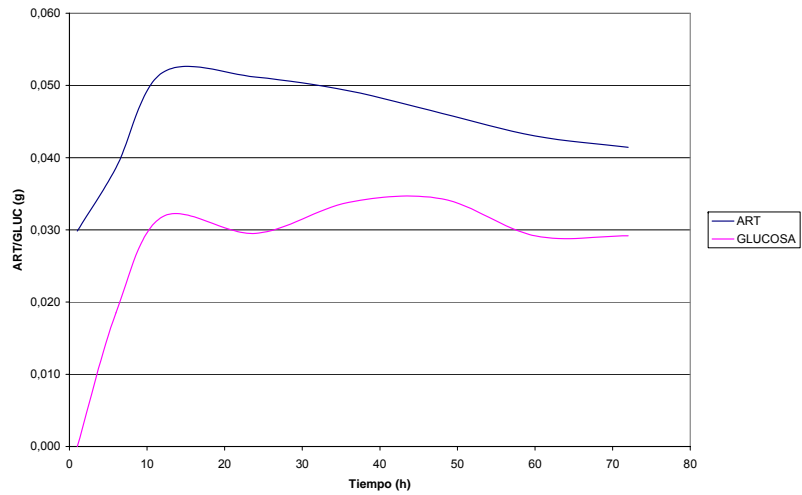
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°3



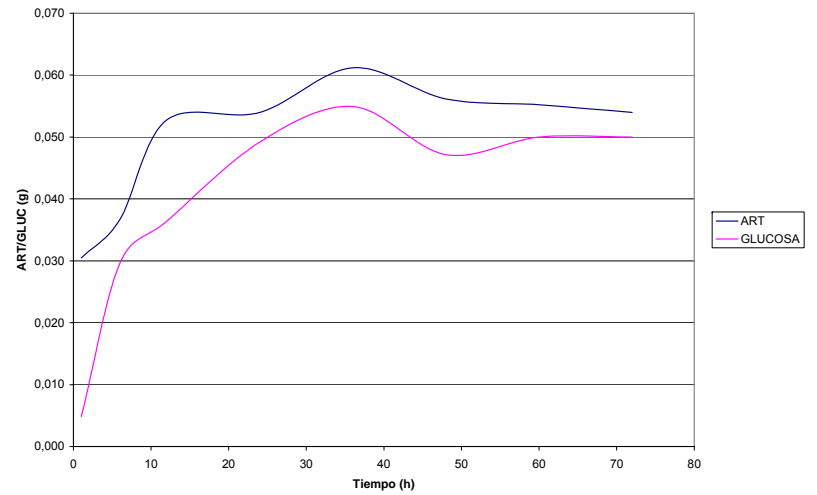
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°4



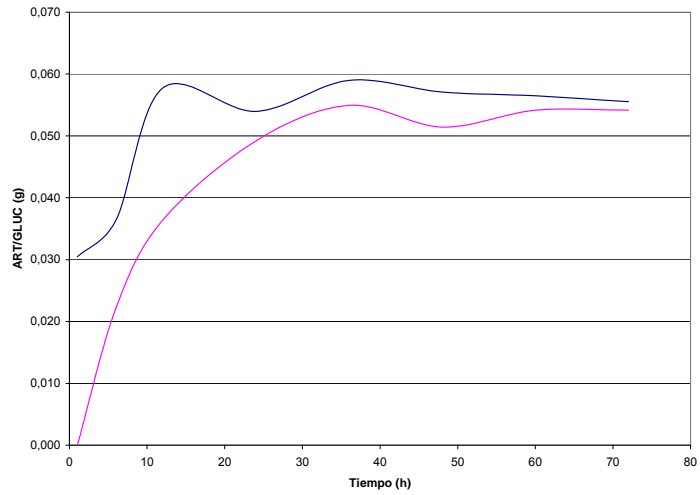
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°5



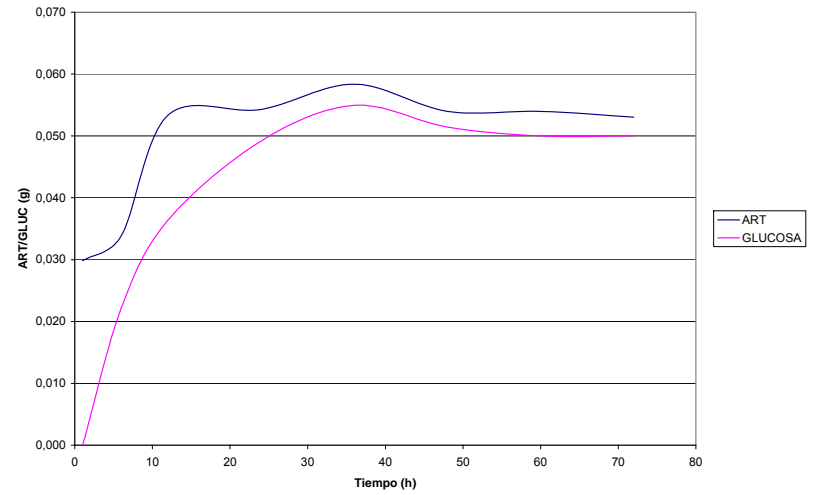
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°6



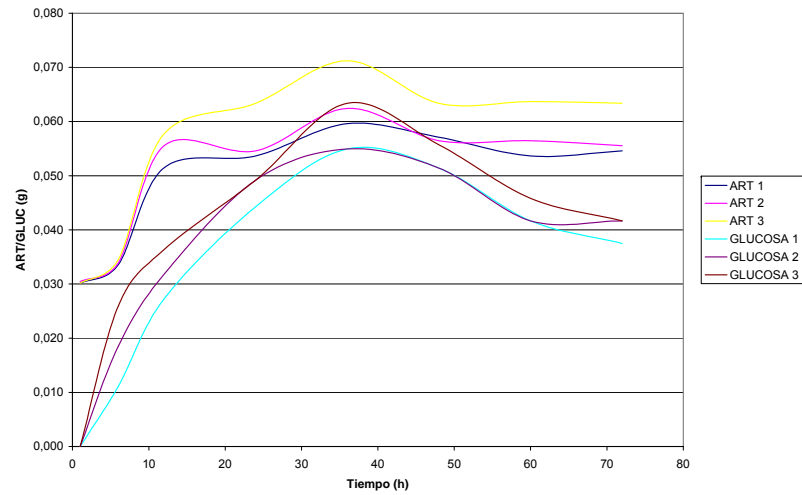
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°7



Hidrólisis Enzimática de la muestra N°8

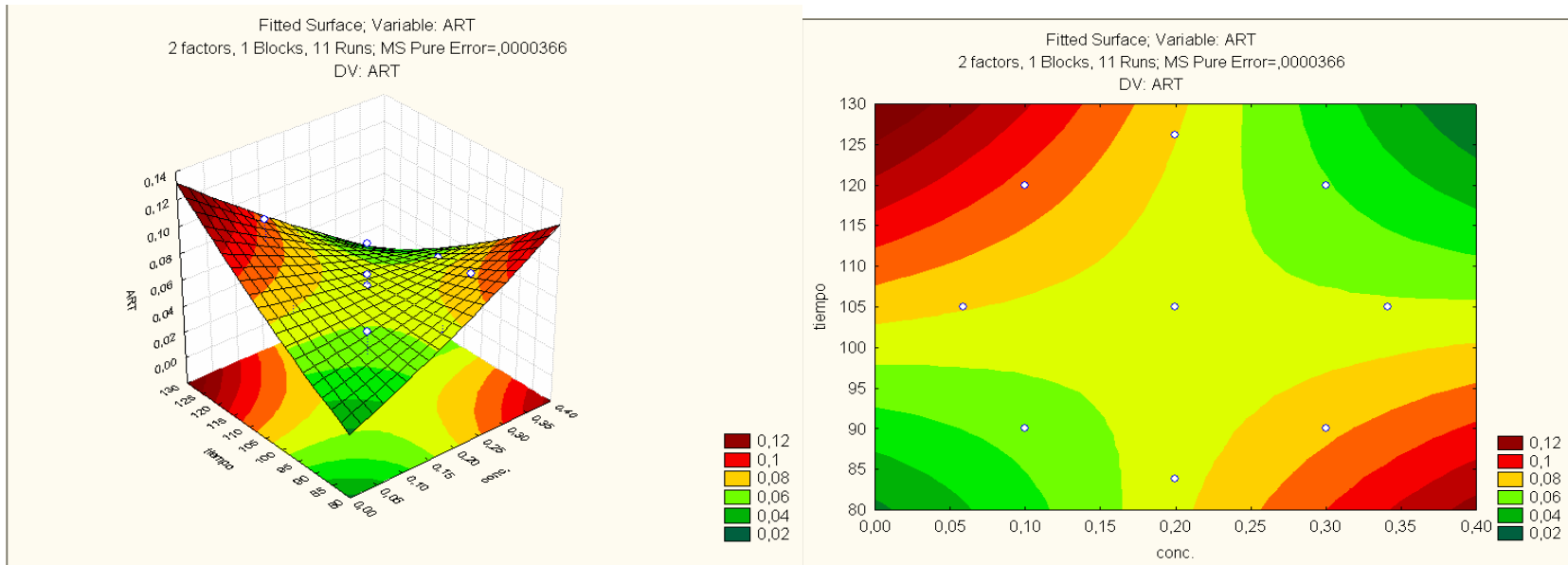


Hidrólisis Enzimática de la muestra N°9



ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL SEGUNDO PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL DE COMPOSICIÓN CENTRAL DEL ÁCIDO SULFÚRICO

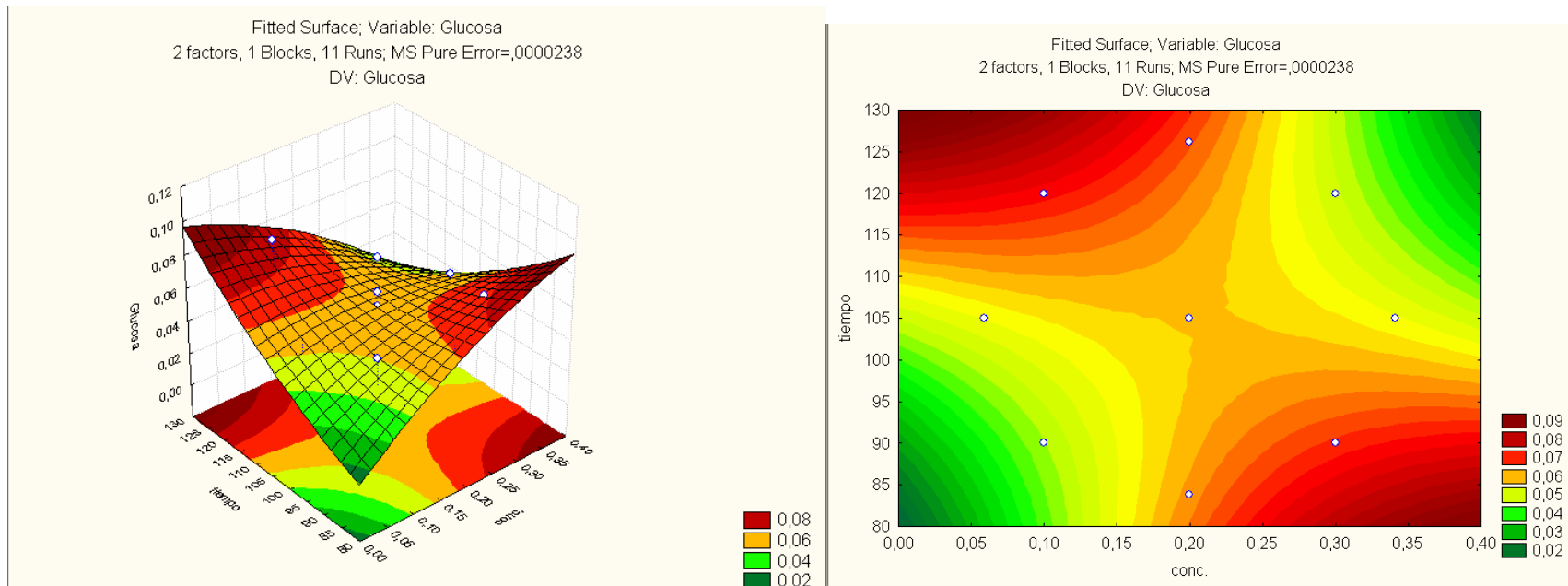
ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO Y DE TIEMPO DE PRE-TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES



Effect Estimates; Var.:ART; R-sqr=,4584; Adj:0, (datos del tercer plan. sulfurico)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0000366
DV: ART

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-90, % Cnf.Limt	+90, % Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90, % Cnf.Limt	+90, % Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,064417	0,003492	18,44576	0,002926	0,054219	0,074614	0,064417	0,003492	0,054219	0,074614
(1)conc. (L)	-0,006393	0,004277	-1,49465	0,273619	-0,018882	0,006096	-0,003196	0,002139	-0,009441	0,003048
conc. (Q)	0,001776	0,005091	0,34893	0,760450	-0,013089	0,016641	0,000888	0,002545	-0,006544	0,008321
(2)tiempo (L)	0,002913	0,004277	0,68108	0,566099	-0,009576	0,015402	0,001457	0,002139	-0,004788	0,007701
tiempo (Q)	0,003971	0,005091	0,77997	0,517059	-0,010894	0,018836	0,001985	0,002545	-0,005447	0,009418
1L by 2L	-0,029780	0,006049	-4,92332	0,038866	-0,047442	-0,012118	-0,014890	0,003024	-0,023721	-0,006059

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO Y DE TIEMPO DE PRE-TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE GLUCOSA



Effect Estimates; Var.:Glucosa; R-sqr=,38303; Adj:0, (datos del tercer plan. sulfurico)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0000238
DV: Glucosa

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,057746	0,002817	20,50000	0,002371	0,049521	0,065972	0,057746	0,002817	0,049521	0,065972
(1)conc. (L)	0,000127	0,003450	0,03682	0,973974	-0,009947	0,010201	0,000064	0,001725	-0,004973	0,005100
conc. (Q)	-0,004956	0,004106	-1,20682	0,350874	-0,016946	0,007035	-0,002478	0,002053	-0,008473	0,003517
(2)tiempo (L)	0,003117	0,003450	0,90350	0,461621	-0,006957	0,013191	0,001559	0,001725	-0,003478	0,006595
tiempo (Q)	0,005608	0,004106	1,36566	0,305349	-0,006383	0,017598	0,002804	0,002053	-0,003191	0,008799
1L by 2L	-0,023136	0,004879	-4,74184	0,041711	-0,037382	-0,008889	-0,011568	0,002440	-0,018691	-0,004444

ANEXO G

TERCER PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL DE COMPOSICIÓN CENTRAL DEL ÁCIDO FOSFÓRICO

Se inició el tercer planeamiento experimental de composición central para el ácido fosfórico con una variación de concentración entre 0,1-0,3% v/v y en un intervalo de tiempo de 90-120 min.

Muestra	Concentración de ácido (%v/v)	Tiempo (min)
1	0,10	90
2	0,10	120
3	0,30	90
4	0,30	120
5	0,06	105
6	0,34	105
7	0,20	84
8	0,20	126
9,1	0,20	105
9,2	0,20	105
9,3	0,20	105

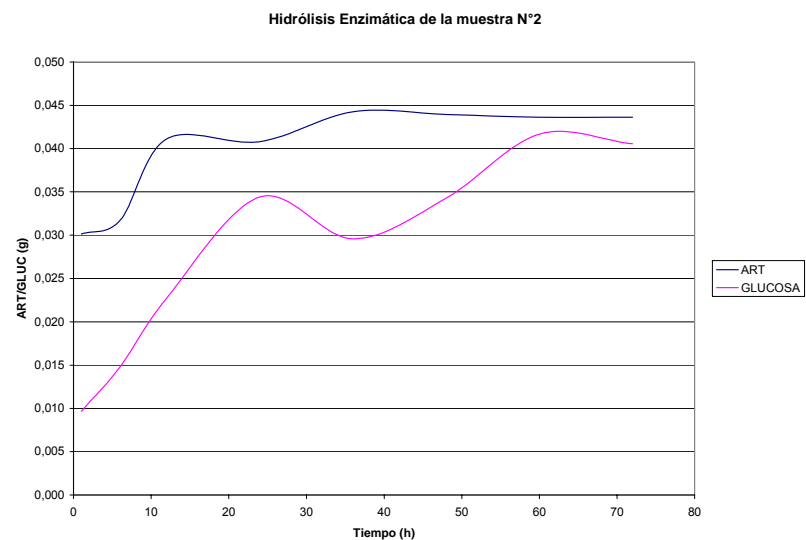
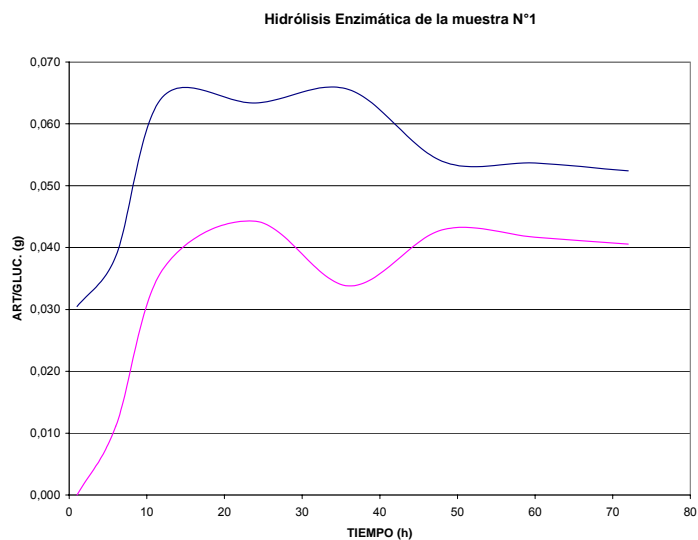
Concentración de Azúcares Reductores totales (ART) y de Glucosa en el pre-tratamiento:

Muestra	[ART] (mg/mL)	MasaART (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa (g)
1	2,768	0,277	0,000	0,000
2	3,756	0,376	0,000	0,000
3	5,358	0,536	0,044	0,004
4	3,668	0,367	0,029	0,003
5	2,330	0,233	0,000	0,000
6	5,270	0,527	0,015	0,001
7	4,129	0,413	0,015	0,001
8	6,345	0,635	0,015	0,001
9,1	3,054	0,305	0,015	0,001
9,2	3,931	0,393	0,015	0,001
9,3	3,844	0,384	0,015	0,001

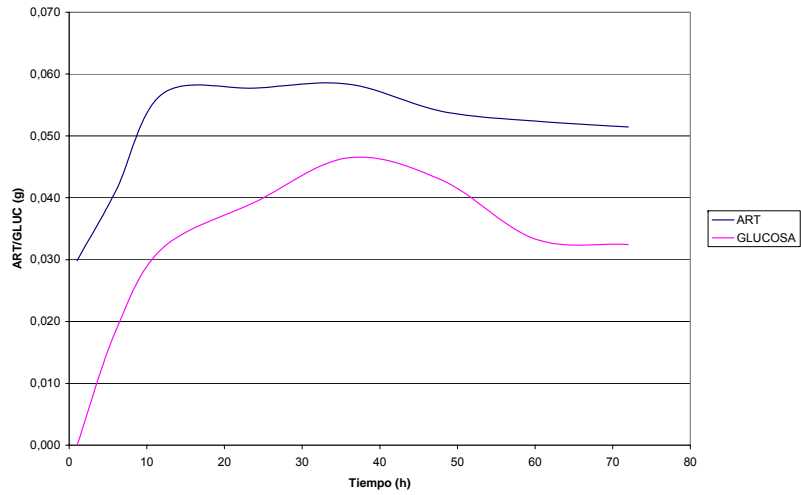
Concentración máxima de Glucosa y ART obtenido en la Hidrólisis enzimática

Muestra	[ART] (mg/mL)	Masa ART (g)	[Glucosa] (mg/mL)	Masa Glucosa (g)
1	0,219	0,066	0,148	0,044
2	0,148	0,044	0,146	0,044
3	0,195	0,058	0,155	0,046
4	0,169	0,051	0,155	0,046
5	0,176	0,053	0,127	0,038
6	0,158	0,047	0,129	0,039
7	0,179	0,054	0,148	0,044
8	0,255	0,077	0,225	0,068
9,1	0,206	0,062	0,169	0,051
9,2	0,207	0,062	0,183	0,055
9,3	0,188	0,056	0,127	0,038

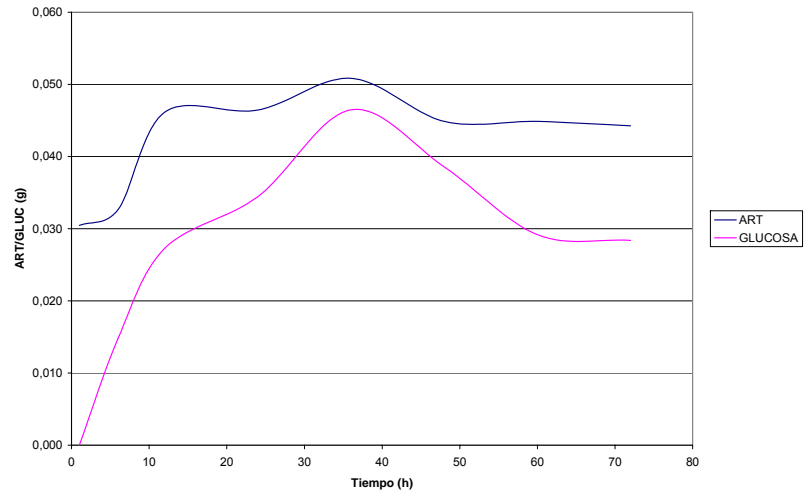
Gráficas de la variación de las concentraciones de ART y glucosa en la Hidrólisis Enzimática.



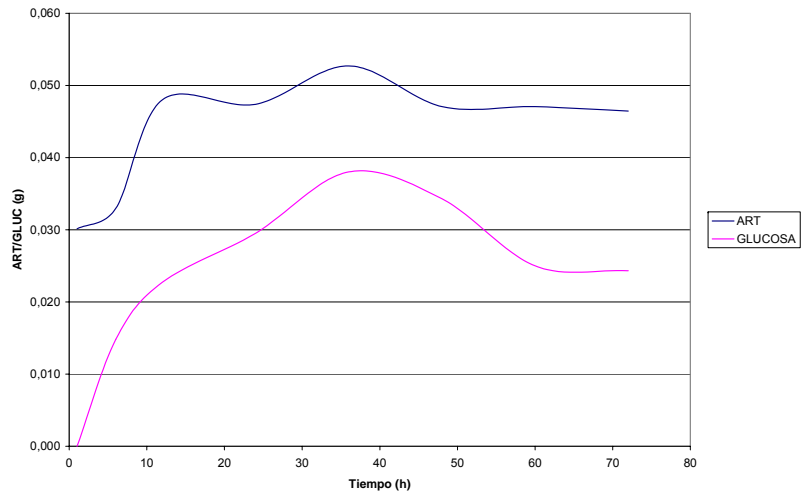
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°3



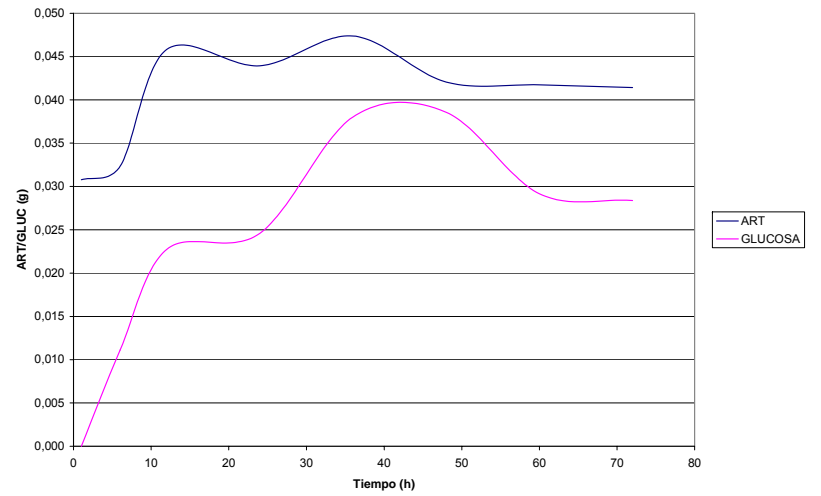
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°4



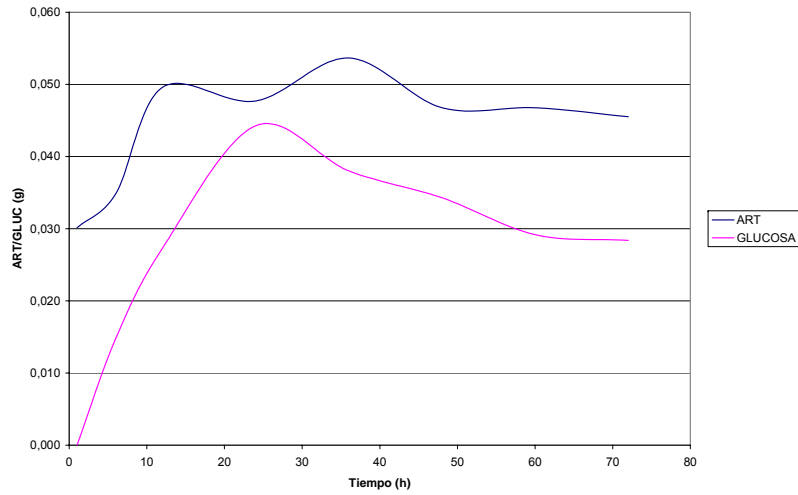
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°5



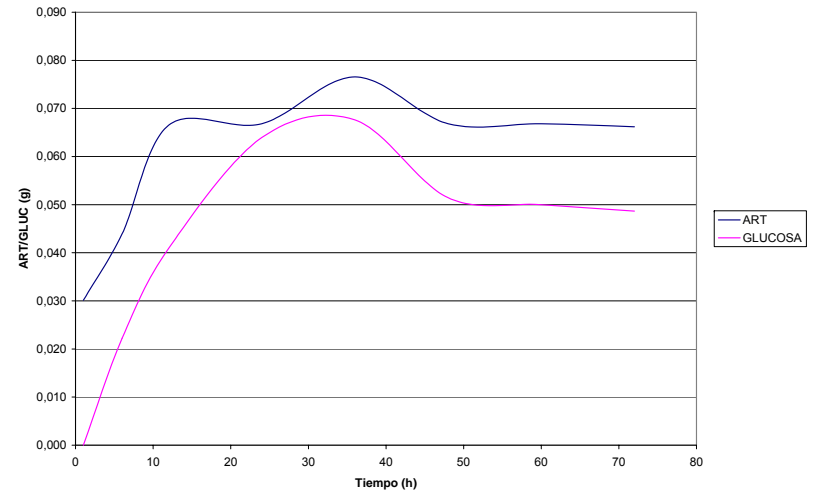
hidrólisis Enzimática de la muestra N°6



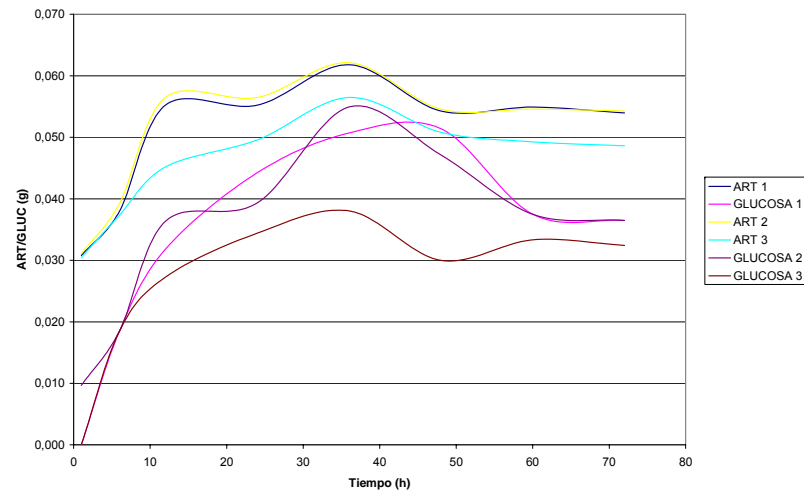
Hidrólisis Enzimática de la muestra N°7



Hidrólisis Enzimática de la muestra N°8

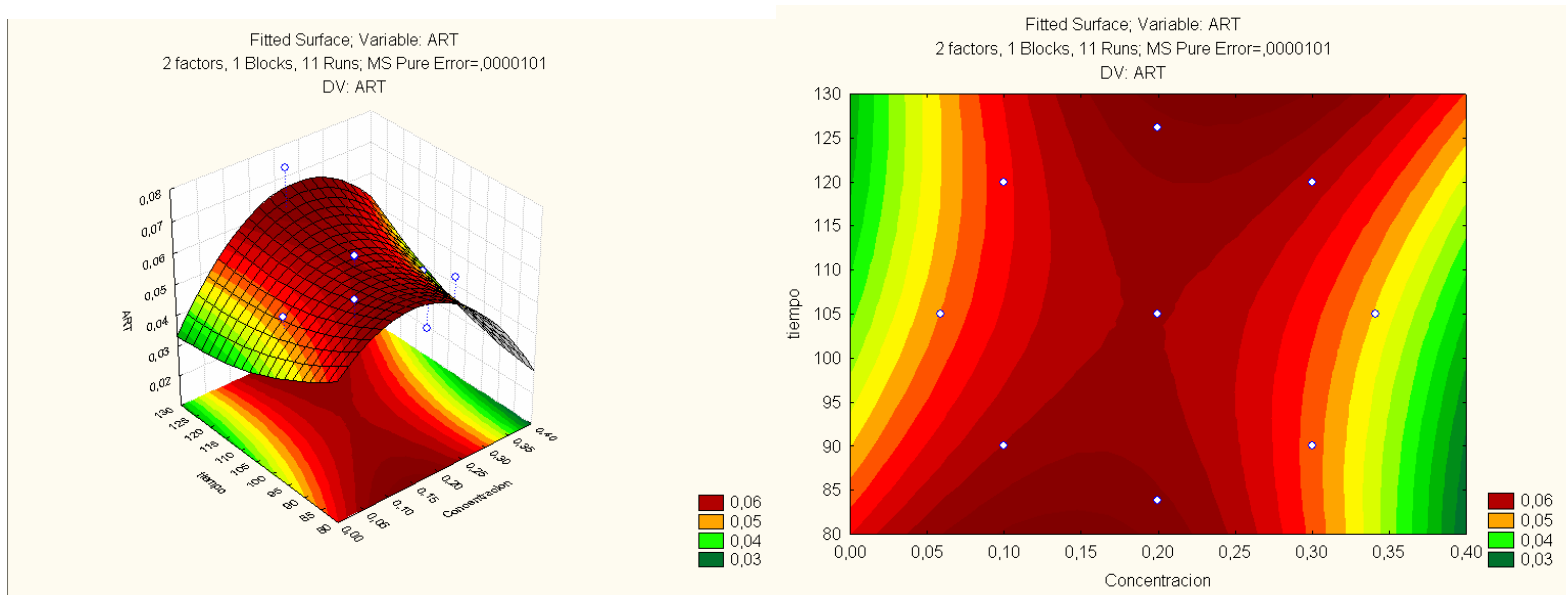


Hidrólisis Enzimática de la muestra N°9



ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL TERCER PLANEAMIENTO EXPERIMENTAL DE COMPOSICIÓN CENTRAL DEL ÁCIDO FOSFÓRICO

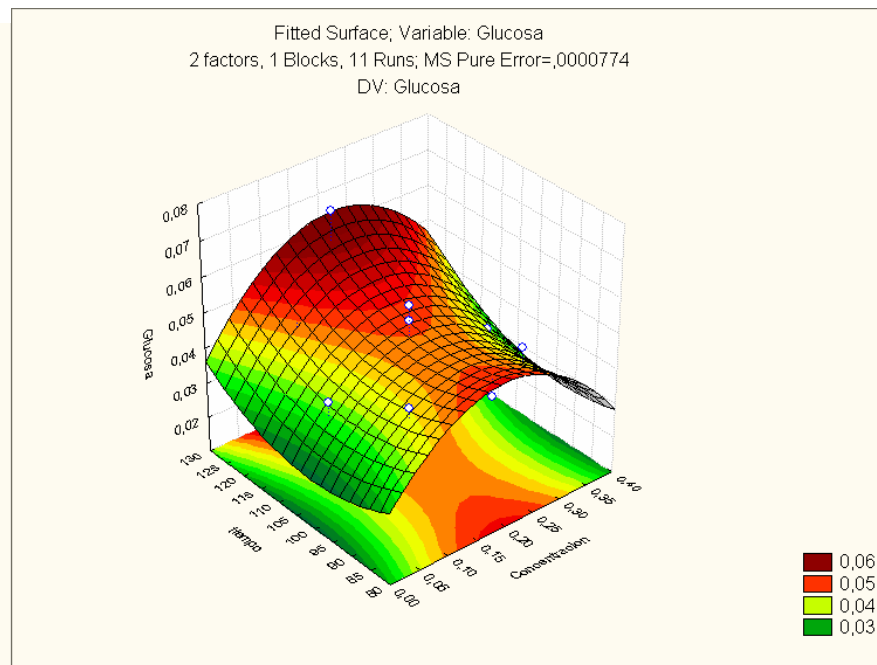
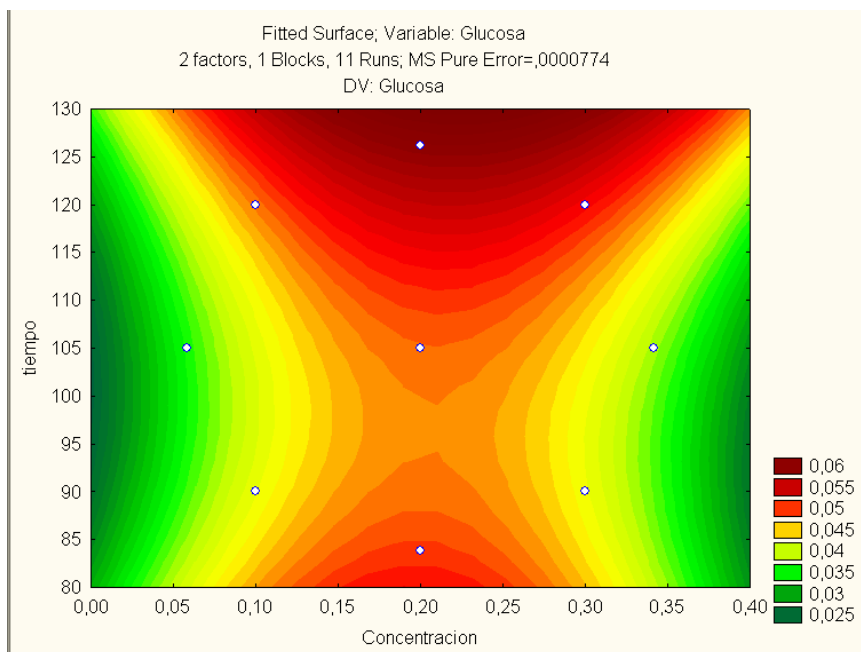
ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO Y DE TIEMPO DE PRE-TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES



Effect Estimates; Var.:ART; R-sqr=,38414; Adj:0, (datos del 3er plan del fosforico)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0000101
DV: ART

Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,060133	0,001831	32,84471	0,000926	0,054787	0,065478	0,060133	0,001831	0,054787	0,065478
(1)Concentracion(L)	-0,002041	0,002242	-0,91015	0,458815	-0,008588	0,004507	-0,001020	0,001121	-0,004294	0,002253
Concentracion(Q)	-0,011494	0,002669	-4,30669	0,049913	-0,019287	-0,003701	-0,005747	0,001334	-0,009643	-0,001850
(2)tiempo (L)	0,000881	0,002242	0,39275	0,732409	-0,005667	0,007428	0,000440	0,001121	-0,002833	0,003714
tiempo (Q)	0,003553	0,002669	1,33116	0,314598	-0,004240	0,011346	0,001776	0,001334	-0,002120	0,005673
1L by 2L	0,006896	0,003171	2,17477	0,161664	-0,002363	0,016156	0,003448	0,001586	-0,001182	0,008078

ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO Y DE TIEMPO DE PRE-TRATAMIENTO CON RESPECTO A LA CANTIDAD DE GLUCOSA



Effect Estimates; Var.:Glucosa; R-sqr=,56157; Adj: ,12313 (datos del 3er plan del fosforico) 2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=,0000774 DV: Glucosa										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-90,% Cnf.Limt	+90,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,047887	0,005078	9,42990	0,011059	0,033059	0,062716	0,047887	0,005078	0,033059	0,062716
(1)Concentracion(L)	0,002231	0,006220	0,35868	0,754162	-0,015930	0,020392	0,001115	0,003110	-0,007965	0,010196
Concentracion(Q)	-0,010926	0,007403	-1,47592	0,277959	-0,032542	0,010690	-0,005463	0,003701	-0,016271	0,005345
(2)tiempo (L)	0,007323	0,006220	1,17736	0,360183	-0,010838	0,025484	0,003661	0,003110	-0,005419	0,012742
tiempo (Q)	0,006708	0,007403	0,90619	0,460486	-0,014908	0,028324	0,003354	0,003701	-0,007454	0,014162
1L by 2L	0,001861	0,008796	0,21156	0,852047	-0,023823	0,027544	0,000930	0,004398	-0,011911	0,013772

ANEXO H

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DEL PRETRATAMIENTO ÁCIDO

Se pesan 4g de bagazo de caña *in-natura* o tamizado de acuerdo a la prueba que se desee realizar en un erlenmeyer de 500 ml

Se preparan las soluciones de ácido fosfórico y de ácido sulfúrico (%v/v) de acuerdo al rango de concentraciones que el análisis de variables mediante el programa estadístico indique.

Antes de mezclar las soluciones de ácido con el bagazo de caña se debe precalentar el autoclave para ello se deben seguir los siguientes pasos para el uso del autoclave:

- Abrir la tapa del autoclave y colocar agua dentro del mismo hasta cubrir el descanso de la cesta.
- Abrir el registro de vapor C (Figura xx), y poner la perilla de control de calor en máximo y esperar a que el agua hierva.

Cuando el autoclave este listo, se mezcla el bagazo de caña con las soluciones de ácido.

Se debe tener en cuenta que los erlenmeyer deben estar tapados en la parte superior como se indica en la Figura H1 para que no se presenten pérdidas de la solución en el erlenmeyer

Figura H1. Erlenmeyer antes del pretratamiento.



- Cuando el agua este hirviendo, introducir el material a ser esterilizado y a continuación cerrar las perillas de seguridad B.
- Esperar la salida de vapor en el registro E y cerrarlo inmediatamente mediante la perilla C.
- Cuando se alcance la presión deseada en el registro A, la cual debe ser ajustada moviéndose el contrapeso D. Hacia delante menor presión o para atrás mayor presión, cambiar la perilla de control de calor a medio para mantener la presión que se desea.
- Terminado el tiempo de esterilización ubicar la perilla de control de calor en (DESL), abrir el registro de vapor (C), esperar a que el manómetro llegue a cero y enseguida abrir la tapa.

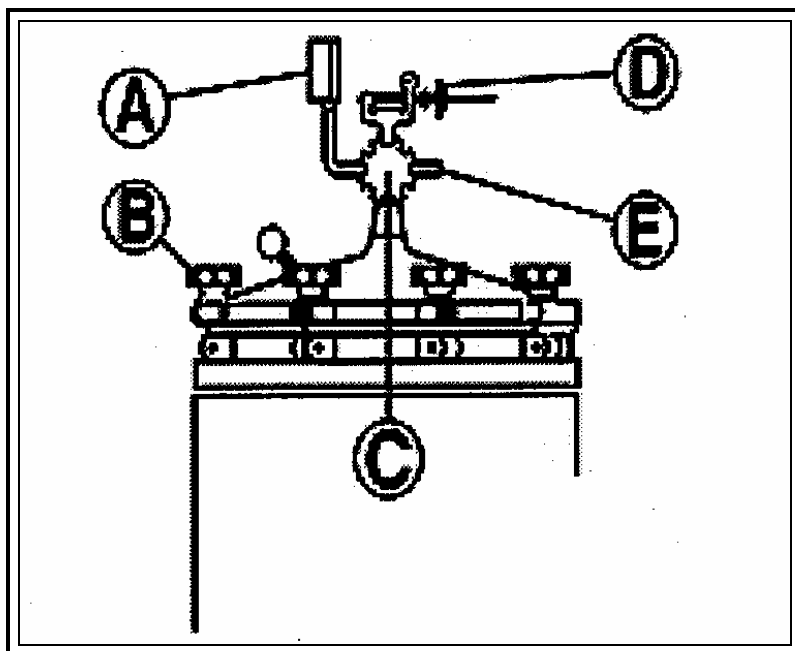


Figura H2. Autoclave

Después que las muestras se retiran del autoclave de deben enfriar inmediatamente para de esta manera parar la reacción entre la solución ácida y el material lignocelulosico

A continuación se filtran las muestras, teniendo la precaución de devolver el bagazo que queda en el papel filtro al erlenmeyer

El bagazo que queda en el erlenmeyer después de la filtración se lava en la centrifuga para ser posteriormente secado en la estufa.

La muestra seca se guarda y se etiqueta con el respectivo número de muestra.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Se pesa 1g de bagazo de caña pretratado en un erlenmeyer de 500ml para cada una de las muestras.

Se adicionan 300 ml de agua destilada y se ajusta el pH de la mezcla a 4,8 para que cuando se adicionen las enzimas se encuentren en condiciones óptimas.

Se ajustan las condiciones de la incubadora: 50°C, 100 rpm y un tiempo de 90h.

Para comenzar la hidrólisis enzimática se adiciona primero 1 ml de β - glicosidaza y después se adiciona 1 ml de la celulasa a cada uno de los erlenmeyer. En el momento que se adiciona la enzima celulasa comienza la acción de las enzimas.

Las muestras se tapan en la parte superior como se indicó en el pre- tratamiento y se introducen en la incubadora.

A partir del momento en que se introducen las muestras en la incubadora se toman muestras cada 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h. Para la toma de las alícuotas se deben tener listos tubos de ensayo con tapa etiquetados con el tipo de procedimiento que se está realizando, el número de muestra y la hora a la que fue tomada la muestra.

Una vez que se toman las muestras en cada tiempo, estas se deben mantener en la estufa por un periodo de 10 min a una temperatura mayor a 70°C, esto se realiza con el fin de desactivar las enzimas.

A continuación cuando las muestras se encuentren a temperatura ambiente se realizan las lecturas de azúcares reductores totales (ART) y de glucosa.

Una vez que se han tomado las muestras para cada uno de los tiempos en el intervalo entre 1 y 72 horas los erlenmeyer se sacan de la incubadora y se realiza el mismo procedimiento para desactivar las enzimas que se realizó con cada una de las alícuotas.

A continuación se lava el bagazo hidrolizado en la centrifuga, se seca en la estufa y se registra el peso seco del mismo.

ANEXO I

PREPARACION DE LOS REACTIVOS Y CURVA PATRON DE DNS

MÉTODO DEL DNS

La concentración de azúcares reductores totales se determinó de acuerdo con el método del ácido dinitro-3,5 salicílico descrito por Miller (1959). El método DNS se basa en la reducción del ácido dinitro-3,5-salicílico a ácido 3-amino-5 nitrosalicílico al mismo tiempo en el que el grupo aldehído del azúcar es oxidado a el grupo carboxílico (Miller, 1959) con el desenvolvimiento de la coloración rojiza leída espectrofotométricamente a 540 nm.

El reagente DNS inicialmente consistía de una solución conteniendo 1416 mL de agua destilada, 10,6 gr de ácido dinitro -3,5 salicílico, 19,8 gr de Hidróxido de sodio, 306 gr de tartárate de sodio, 7,6 mL de fenol disueltos a 50°C y 8,3 gr de metabisulfito de sodio. El reagente sufre degradación por algun periodo, por eso se almacena en un frasco oscuro.

Así, el reagente DNS puede ser preparado según VILOCHE BAZÁN (1993) disolviendose 5,3 gr de ácido-dintro 3,5 salicílico en 708 mL. Se adiciona a esta mezcla 3,8 mL de Fenol fundido a 50 °C mas 4,15 gr de meta-bisulfito de sodio guardando el reagente en un frasco ámbar para protegerlo de la luz. Paralelamente se prepara una solución de tartárate de sodio 15,1 g/L y se guarda en otro frasco.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE CITRATO

Para preparar el tampón de citrato 0,05 M en pH 4,8 se pesa 10,5 gr de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 37,5 mL de H_2O , 2,5 gr de NaOH hasta pH 4,3. Diluir para 50 mL y chequear el pH. Es necesario adicionar NaOH hasta pH 4,5. Así tenemos el tampón de citrato a pH 4,8 y 1 M.

PREPARACIÓN DEL ESTABILIZANTE

15,1 gr de Tartálato de sodio, se adiciona agua y se pone en un baño caliente a una temperatura arbitraria solo para disolver los gránulos del tartálato. Se transfiere luego a un balón de 1 L y se afora con agua.

PREPARACION DE LA ENZIMA PARA LA HIDRÓLISIS

Preparación de la *Cellulasa Tricoderma reesie* ATCC 26921

Con la debida actividad enzimática de cada enzima se calcula la cantidad de enzima necesaria para realizar la hidrólisis.

De acuerdo al procedimiento experimental se trabajo con una actividad enzimática de 3,94 FPU por gramo de Biomasa.

$FPU = 0,37 / \text{Conc. Enzima}$

FPU [=] Unidades de papel filtro.

Entonces se necesitan 3,8071 mL de enzima para 50 mL con solución tampón de citrato de sodio.

Preparación de la β -glicosidasa (Novozyme 188)

Para esta enzima se trabajo una actividad enzimática de 28,4 CBU por gramo de Biomasa.

$CBU = 0,0926 / \text{Conc. Enzima}$

CBU [=] unidades de celobiasa

Entonces se necesitan 0,163 mL de enzima para 50 mL con solución tampón de citrato de sodio.

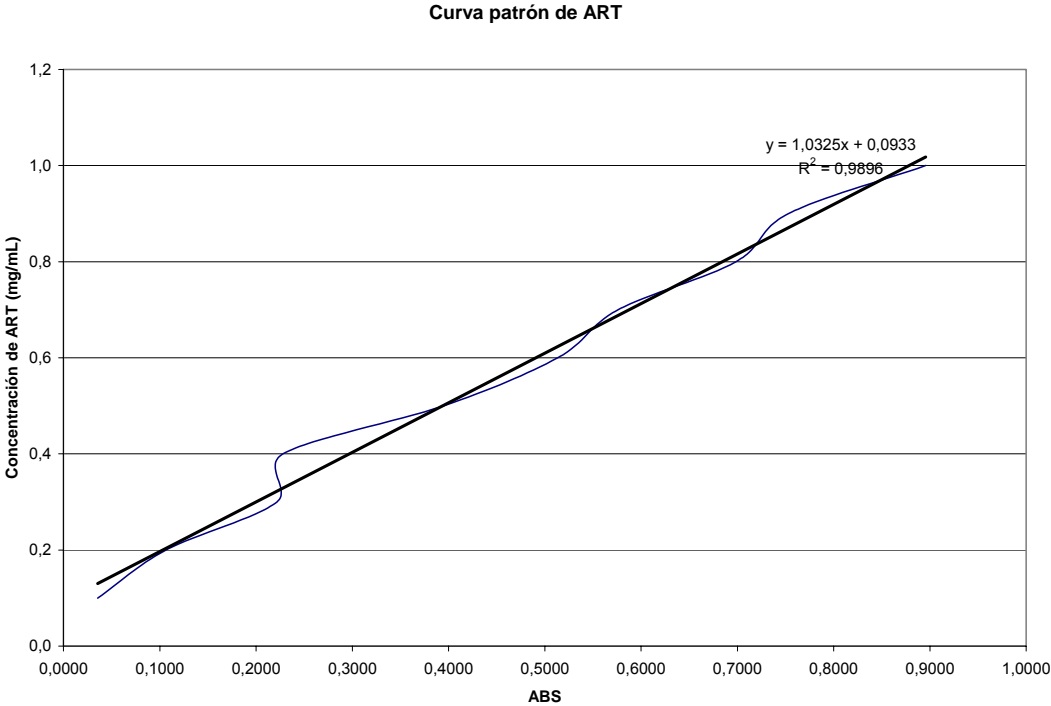
Curva patrón de Azúcares reductores Totales

Se prepararon soluciones de glucosa con concentraciones en la franja de 0,1 a 1 g/L de Azúcares reductores.

Tomando 0,5 mL de estas soluciones de concentraciones conocidas y adicionalmente 0,5 mL de reagente DNS, llevando en un baño termostático en ebullición por 5 minutos enfriándose instantáneamente por la inmersión de los tubos en baño de hielo fundiente y adicionando posteriormente 3,5 mL de solución de Tartátrato de sodio y potasio a 15,1 g/L para estabilizar la reacción.

Se agitan los tubos para homogenizar y se hace la lectura de absorbancia a 540 nm en el fotospectrómetro. El blanco fue hecho con las muestras sustituyendo la solución de azúcar reductor por 0,5 mL de agua destilada. Después de obtener las lecturas de absorbancia se construye la curva patrón de tipo

Conc ART (mg/mL)=f(ABS)



ANEXO J

MANUALES DEL LABORATORIO

CENTRIFUGA MICROPROCESADA NT 810

Marca: Nova Técnica

Especificaciones Técnicas

Velocidad	3300 rpm
Fuerza Centrifuga Máxima	2300 xg
Capacidad Máxima	16 x 15 ml en el rotor Horizontal
Peso	30 kg
Largo	440 mm
Profundidad	530 mm
Altura	270 mm
Red	220 / 127V, 60 Hz
Control de Velocidad	Electrónico microprocesado
Lectura de Velocidad	Indicador digital con 5 dígitos
Sistema de Freno	Electrodinámico

Tabla orientada para la protección eléctrica

Potencia del Motor (cv)	Tensión de Red (V)	Corriente del Motor (A)	Fusible (A)
1,5	110	4,0	6
	220	3,5	6

INCUBADORA REFRIGERAD CON AGITACION MODELO MA-832

Marca: Marconi

Especificaciones Técnicas

Tensión de Alimentación	220 vac \pm 10%
Corriente de Alimentación de la resistencia	05 Amperios
Corriente de Alimentación del sistema de refrigeración	02 Amperios
Consumo máximo de potencia de la resistencia	1000 watts
Consumo máximo de potencia del sistema de refrigeración	250 watts
Volumen útil total de la cámara	60 litros
Consumo máximo de potencia total	1250 watts
Dimensiones externas	L=870 x P=670 x A=840 mm
Dimensiones internas de la incubadora	L=500 x P=300 x A=400 mm

BAÑO TERMOSTATIZADO MODELO MA-184 MA-184/6

Marca: Marconi

Especificaciones Técnicas del MA-184

Tensión de Alimentación	220 vac \pm 10 %
Corriente de alimentación de la resistencia	07 amperios
Corriente de Alimentación del sistema de refrigeración	02 amperios
Consumo máxima de potencia de la resistencia	1500 watts
Consumo máximo de potencia del sistema de refrigeración	300 watts
Consumo máximo de potencia total	1800 watts
Volumen útil total	18 litros
Dimensiones externas	L=320 x P=510 x A=500 mm
Dimensiones internas	L=250 x P=380 x A=190 mm

Especificaciones Técnicas del MA-184/6

Tensión de Alimentación	220 vac \pm 10 %
Corriente de alimentación de la resistencia	4,5 amperios
Corriente de Alimentación del sistema de refrigeración	1,5 amperios
Consumo máxima de potencia de la resistencia	1250 watts
Consumo máximo de potencia del sistema de refrigeración	250 watts
Consumo máximo de potencia total	1500 watts
Volumen útil total	6 litros
Dimensiones externas	L=290 x P=410 x A=400 mm
Dimensiones internas	L=145 x P=295 x A=150 mm

ESPECTROFOTOMETRO 600S

Marca: FEMTO

Especificaciones Técnicas

Franja espectral	325 a 1100 nm
Largo de banda	10 nm
Display 16 caracteres	2 líneas LCD
Teclado tipo membrana	15 teclas
Ajuste de 100,00 %	,000 Abs automático
Regresión lineal simple programable	
Almacenamiento de 5 curvas	9 puntos de calibración
Compartimiento de muestra	Percusor óptico de 0,1 a 100 nm con soporte de para 1 cubeta cuadrada de 10 nm.
Comunicación	Serial RS232C
Alimentación	Conmutación automática de voltaje con fuente 117 a 220 V ($\pm 10\%$)
Monocromador	Con red de difracción 1200 líneas/mm
Filtros de 2° Orden	05 filtros con cambio automático
Comprimiendo de onda	Contador digital resolución 1 nm Reproducibilidad 0,5 nm
Lámpara de Tungsteno-halógeno	Vida útil ~2000 horas
Franja Fotométrica	Transmitancia 0-200,0 % Absorbancia -0,1 a 2,5

	Concentración 0 a 1999
Exactitud fotométrica	0,003 Abs de 0,000 a 0,300 Abs
Ruido fotométrico	0,001 Abs a 0,000 Abs
Desvío fotométrico	0,003 Abs./hora
Luz	0,1 %T a 340 nm (NaNO ₂)
Consumo	80 VA
Dimensiones	330 mm x 320 mm x 180 mm (L x C x H)
Peso líquido	7,5 kg

ESTUFA DE SECADO ESPECIAL MODELO MA-035/2

Marca: Marconi

Especificaciones técnicas

Tensión de alimentación	220 vac ± 10 %
Corriente de alimentación	16 amperios
Corriente máxima de potencia	2250 watts
Volumen útil total	150 litros
Dimensiones externas	710 x 540 x 1010 mm (L x P x A)
Dimensiones internas	440 x 460 x 450 mm (L x P x A)

AUTOCLAVE VERTICAL LINEA- AV 50

Marca: Phoenix

Especificaciones Técnicas

Voltaje	220 V
Tensión de alimentación y potencia	
Frecuencia	50/60 Hz
Potencia	3000 watts
Corriente	14 A
Dimensiones	
Internas	35 x 50 cm.
Externas	45 x 45 x 80 cm.
Capacidad	50 litros
Peso	
Peso líquido	54 Kg.
Peso Embalado	72 Kg.
Resistencias	
Potencia	1500 W
Tensión	220 V
Referencia	00061
Categoría del vaso	
MPTA (máx. presión de trabajo)	1,6 Kgf/cm ²
Presión de Operación	1 a 1,5 Kgf/cm ²
Presión Hidrostática	3 Kgf/cm ²

MEDIDOR DE pH INDUSTRIAL MPI 2000

Marca: MS TECNOPON

Especificaciones técnicas

Indicador: Alfanumérico 2 líneas por 16 caracteres

Franja de medición	Resolución	Exactitud de lectura	Incertidumbre de la lectura
pH			
0 a 14	0,01	2 % fondo de escala	± 5 % fondo de escala
Temp. 5-60°C	0,1°C	±0,3 °C	±0,3 °C
Compensación de Temp. Automática	5 a 50°C		
Referencia de Temperatura	pH expreso en el display es 25°C		
Soluciones patrones	Tampón pH 7, 4, 10		
Temperatura ambiente	5 a 40°C		
Humedad Relativa	15 a 80 %		
Tensión de Alimentación	220 Volts (60 Hz)		

PIPETAS LM 1000 Y LM 50

Marca: LAB MATE⁺

Especificaciones Tecnicas

Modelo	Referencia	Volumen [μ l]	Exactitud [%]	Precisión [%]	Punta	Color del Cuerpo
LM 50	4607	Min 0,5	+/-2,5	+/- 2,0	200 μ l	Amarillo
		25	+/-1,0	+/- 0,6		
		Max 50	+/-0,8	+/- 0,4		
LM 1000	4606	Min 100	+/- 1,6	+/- 0,40	1000 μ l	Azul
		500	+/- 0,7	+/- 0,20		
		Max 1000	+/- 0,6	+/- 0,15		