

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO
DILUIDO EN LAS ETAPAS DE IMPREGNACIÓN Y PRETRATAMIENTO
TERMOMECÁNICO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A
PARTIR DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

DENY PAOLA ARIAS ARIAS

INGRID VIVIANA PÉREZ MALAMBO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2017

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO
DILUIDO EN LAS ETAPAS DE IMPREGNACIÓN Y PRETRATAMIENTO
TERMOMECÁNICO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A
PARTIR DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

DENY PAOLA ARIAS ARIAS

INGRID VIVIANA PÉREZ MALAMBO

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director

Ph.D. Viatcheslav Kafarov

Co-director

Ing. Neila Milena Mantilla Barbosa

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2017

DEDICATORIAS

A mi Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida.

A mi padre, Rosendo Arias que a pesar que no está conmigo desde la distancia me

fortaleció y me lleno de sabiduría para seguir adelante.

A mi madre Nelly Arias que con su amor y apoyo me guiaron por el camino

correcto.

A mis hermanos porque ellos han sido ejemplo de superación para seguir con mi

proyecto de vida.

A mi pareja Gustavo Calderón que con su paciencia, amor y su comprensión me

motivo a salir adelante en cumplimiento de un sueño trazado. Gracias a ti he

podido realizarme como persona y profesional. Aunque hemos pasado momentos

difíciles siempre ha estado brindándome su apoyo incondicional.

A mis tíos Genaro Arias, Casimiro Arias y Macario Arias que con su apoyo

económico incondicional puede culminar esta etapa.

*A mis nonitos Crisanto Arias y Hermina Villamizar, por ser grandes personas y
porque por ellos hago parte de una gran familia.*

Deny Paola Arias Arias

*A Dios, por guiar mi camino, por darme la fuerza para seguir adelante y lograr
todas mis metas.*

*A mis padres, quienes han estado pendientes de mí, quienes me han brindado
todo su amor, comprensión y apoyo incondicional, los que me han motivado a
darlo todo, porque gracias a su esfuerzo puedo culminar esta meta, les debo
todo lo que soy y espero ser; los amo.*

*A mi querida hermana, Laura, quien me ha brindado su apoyo desde el principio,
aquella amiga y confidente, la cual me ha enseñado el valor de los sentimientos
transmitidos en las palabras.*

*A mi novio, Elkin, un gran compañero en este camino, quien me ha motivado a
continuar en momentos difíciles, por su apoyo, comprensión y paciencia. Gracias
por haber estado en todo momento y brindarme tu amor.*

Ingrid Viviana Pérez Malambo

AGRADECIMIENTOS

A Dios...

A nuestras familias, las cuales contribuyeron a realizar una de las metas trazadas en nuestro proyecto de vida; gracias por el soporte, amor y comprensión brindados en el transcurso de este proceso.

Agradecemos a la Universidad Industrial de Santander, a todos sus profesores y especialmente a la escuela de ingeniería química, por brindarnos educación de calidad, por la cual podremos ser profesionales de primer nivel.

Agradecemos al Dr. Viatcheslav Kafarov por su gestión para hacer posible el desarrollo de esta investigación.

A la Ing. Neila Milena Mantilla Barbosa por acogernos y permitirnos trabajar a su lado, por la disposición y ayuda brindada con la mayor gentileza y por compartir sus conocimientos a lo largo de la realización de este proyecto.

A los técnicos de los Laboratorios de Operaciones Unitarias y Laboratorio Especializado de la Escuela de Ingeniería Química, Eduardo Carreño, Wilson Carreño y Guillermo Acero, quienes contribuyeron al buen desarrollo y desempeño del proyecto.

CONTENIDO

| | pág. |
|---|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 18 |
| 2. METODOLOGÍA | 26 |
| 2.1 ETAPA 1: IMPREGNACIÓN. | 26 |
| 2.2 ETAPA 2: CARACTERIZACION DE LA BIOMASA RECIBIDA, IMPREGNADA Y PRETRATADA. | 28 |
| 2.2.1 Caracterización de biomasa recibida, impregnada y pretratada | 28 |
| 2.2.2 Obtención y Caracterización de sólidos solubles (monómeros y oligómeros) | 30 |
| 2.3 ETAPA 3. BALANCE DE CARBONO BIOMASA IMPREGNADA | 31 |
| 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS | 33 |
| 3.1 ANÁLISIS DE LA ETAPA DE IMPREGNACIÓN | 33 |
| 3.2 ANÁLISIS DE LA ETAPA DE CARACTERIZACION DE BIOMASAM RECIBIDA, IMPREGNADA, PRETRATADA Y EL LICOR RESULTANTE. | 34 |
| 3.2.1 Caracterización de la biomasa recibida. | 36 |
| 3.2.2 Caracterización de la biomasa impregnada al 1 y 2 % p/p de ácido sulfúrico diluido. | 38 |

| | |
|--|----|
| 3.3. Análisis de la biomasa pretratada al 2% de ácido sulfúrico diluido a diferentes flujos de alimentación. | 42 |
| 4. CONCLUSIONES | 44 |
| 5. RECOMENDACIONES | 46 |
| CITAS BIBLIOGRÁFICAS | 47 |
| BIBLIOGRÁFIA | 49 |
| ANEXOS | 52 |

LISTA DE TABLAS

| | pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Datos para impregnación al 1% de ácido sulfúrico diluido. | 33 |
| Tabla 2. Tabla 1. Datos para impregnación al 1% de ácido sulfúrico diluido. | 33 |
| Tabla 3. Balance total de biomasa impregnada al 1 y 2 % ácido sulfúrico diluido. | 34 |
| Tabla 4. Caracterización y balance total de biomasa recibida. | 35 |
| Tabla 5. Caracterización de biomasa impregnada 1 y 2%. | 36 |
| Tabla 6. Caracterización de licor impregnado 1 y 2 % | 37 |
| Tabla 7. Caracterización de biomasa pretratada al 2% con diferentes flujos de alimentación. | 39 |
| Tabla 8. Balance de carbono de biomasa impregnada al 1% con ácido sulfúrico. | 42 |
| Tabla 9. Balance de carbono de biomasa impregnada al 2% con ácido sulfúrico. | 43 |

LISTA DE FIGURAS

| | pág. |
|---|-------------|
| Figura 1. Diagrama de metodología llevado a cabo en el desarrollo del proyecto | 26 |
| Figura 2. Caracterización de Sólidos Insolubles. | 30 |
| Figura 3. Caracterización de Licor de Impregnación | 31 |

LISTA DE GRÁFICAS

| | Pág. |
|--|------|
| Gráfica 1. Componentes vs % (g componentes / g sln) | 37 |
| Gráfica 2. Monómeros de licor impregnado | 38 |
| Gráfica 3. Oligómeros de licor impregnado | 38 |
| Gráfica 4. Flujo de alimentación (g/min) vs % (g componente / g sln) | 40 |
| Gráfica 5. Monómeros de caracterización de biomasa pretratada al 2%. | 41 |
| Gráfica 6. Oligómeros de caracterización de biomasa pretratada al 2%. | 41 |

LISTA DE ANEXOS

| | pág. |
|--|------|
| Anexo A. PROTOCOLO DE CARACTERIZACIÓN DE LICOR DE IMPREGNACIÓN, LICOR DE PRETRATAMIENTO | 51 |

RESUMEN

TÍTULO: Estudio del efecto de la concentración de ácido sulfúrico diluido en las etapas de impregnación y pretratamiento termomecánico del proceso de producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar*

AUTOR: Deny Paola Arias Arias, Ingrid Viviana Pérez Malambo **

PALABRAS CLAVE: Bagazo de caña de azúcar, **Impregnación**, pretratamiento, hidrólisis ácida.

DESCRIPCIÓN

El aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero ha conllevado a un interés en estudios de nuevas materias primas que nos permitan generar combustibles alternativos. Los residuos agrícolas provenientes de la producción azucarera nos dan una opción de estudio que permite obtener Bioetanol con un % de recuperación asequible para el proceso, además que no compite con las fuentes básicas de alimentación mundial. El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de utilizar dos concentraciones de ácido sulfúrico diluido del 1 y 2% en los procesos de impregnación y pretratamiento termomecánico sobre la biomasa lignocelulósica en la hidrólisis de carbohidratos fermentables, para la producción de etanol. Los sólidos insolubles y solubles son caracterizados y analizados cuantificando el contenido de celulosa y hemicelulosa por el HPLC. En el proceso se obtuvo una solubilización de glucosa del 3%, la xilosa también se hidroliza, aproximadamente en un 10 % cuando se impregna al 1% y de 27% cuando se somete a impregnación al 2%. Asimismo, hay una mayor solubilización de componentes en la impregnación al 2%, de esta forma, dependiendo lo que se haga al licor de impregnación, si se ingresa al proceso puede ser bueno solubilizar la mayor cantidad de componentes. No obstante si este no ingresa al proceso no se debe aumentar el % de ácido en la etapa de impregnación.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Viatcheslav V. Kafarov. Codirector: Neila Milena Mantilla Barbosa

ABSTRACT

TÍTULO: Study of the effect of the diluted sulfuric acid concentration in the thermomechanical impregnation and pretreatment stages of the bioethanol production process from sugarcane bagasse*

AUTOR: Deny Paola Arias Arias, Ingrid Viviana Pérez Malambo **

PALABRAS CLAVE: Sugarcane bagasse, Impregnation, pretreatment, acid hydrolysis.

DESCRIPCIÓN

The increase in greenhouse gas emissions has led to an interest in studies of new raw materials that allow us to generate alternative fuels. The agricultural residues from the sugar production give us a study option that allows to obtain Bioethanol with a % of recovery available for the process, besides that it does not compete with the basic sources of world food. The objective of this research was to study the effect of using two and a half concentrations of dilute sulfuric acid in the processes of impregnation and thermomechanical pretreatment on lignocellulosic biomass in the hydrolysis of fermentable carbohydrates for the production of ethanol. The insoluble and soluble solids are characterized and analyzed by quantifying the cellulose and hemicellulose content by HPLC. In the process glucose solubilisation of 3% was obtained, xylose is also hydrolyzed, about 10% when impregnated at 1% and 27% when subjected to 2% impregnation. Also, there is a greater solubilization of components in the 2% impregnation, in this way, depending on what is done to the impregnation liquor; if it is entered into the process, it may be good to solubilize the largest quantity of components. However, if it does not enter the process, the % of acid in the impregnation step should not be increased.

* Thesis

** Department of Chemical Engineering. Advisor: Director: Viatcheslav V. Kafarov. Codirector: Neila Milena Mantilla Barbosa

INTRODUCCIÓN

Las reservas de petróleo, el aumento de las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI) han conllevado a un interés en la producción y utilización de combustibles alternativos a los actuales combustibles fósiles [1] . La producción de biocombustibles proporciona una fuente de energía renovable y limpia, ya que no contribuyen a aumentar la cantidad de dióxido de carbono emitido a la atmósfera y no compite con las fuentes básicas de alimentación mundial. Un aumento en la producción de etanol a partir de residuos agrícolas, maderables, de desechos sólidos y de todos los materiales que contengan celulosa y hemicelulosa han permitido revalorizar los desechos de varias industrias y convertirlos en materia prima para la obtención de etanol [2] .

La producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica (desecho que se obtiene después de la producción azucarera), es una de las alternativas biotecnológicas que se han venido estudiando con el paso de los años. El material lignocelulósico está compuesto principalmente por polímeros ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina entre 75-80%, donde para la obtención de bioetanol las fracciones más importantes son la hemicelulosa con un 15-30% seco del material que puede desdoblarse a hexosas y pentosas y la celulosa con un 35-50% seco del material que se desdobla a hexosas [3] . La hemicelulosa y celulosa pese a su dificultosa degradación, es posible mediante procesos químicos, físicos y/o biológicos desdoblarlos a azúcares monosacáridos para su posterior fermentación.

Los pretratamientos tienen como objetivo desintegrar la matriz polímero celulosa-hemicelulosa-lignina de tal manera que la celulosa reduzca al máximo su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es más receptiva al posterior

ataque enzimático. Entre los métodos físicos se encuentran: pulverizado mecánico y pirolisis, pretratamientos químicos como ácidos diluidos, explosión de vapor catalizada con ácidos, agua líquida caliente, organosolv, bisulfito y alcalinos que han sido ampliamente estudiados y entre las técnicas biológicas se encuentran, principalmente la utilización de microorganismos capaces de degradar la lignina; sin embargo, son procesos muy lentos [4] .

El proceso para la obtención de Bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica consta de cuatro etapas principales: pretratamiento, hidrólisis, fermentación y una separación que generalmente se lleva a cabo por medio de un proceso de destilación. La producción de Bioetanol a partir de la biomasa lignocelulósica contenida por cadenas polisacáridas da lugar a azúcares potencialmente fermentables, este se debe someter a una etapa de hidrólisis. La obtención de azúcares después del pretratamiento puede llevarse a cabo con catalizadores ácidos (hidrólisis ácida) o con catalizadores enzimáticos (hidrólisis enzimática). La hidrólisis ácida puede realizarse mediante un ácido concentrado o un ácido diluido. Utilizar ácidos concentrados, requieren gran cantidad de ácido y ácidos diluidos requieren temperaturas relativamente altas que provocan mayor corrosión de equipos y mayor degradación de azúcares hemicelulósicos [5] . Es por ello que, los procesos de producción de etanol basados en hidrólisis enzimática (HE) son los que se muestran como opciones más prometedoras, demuestran reducir los costos y mejorar el proceso de producción.

La celulosa y hemicelulosa, deben ser hidrolizadas a azúcares simples, para luego ser fermentados a etanol. La fermentación de la glucosa hidrolizada a partir de la celulosa es un proceso establecido, sin embargo, la fermentación de las pentosas hidrolizadas, es un proceso que presenta en la actualidad algunas dificultades técnicas y económicas [5] .

Debido a que los materiales lignocelulósicos son poco susceptibles a ataques enzimáticos y microbianos, a su composición y disposición físico-química; antes del pretratamiento es necesaria una etapa de impregnación con ácido sulfúrico diluido con el fin de preparar el material lignocelulósico, donde se da una difusión de este ácido a través de las porosidades de la estructura del bagazo de caña de azúcar con el fin de que en un posterior pretratamiento, la desintegración de la matriz polímeros lignina sea más efectiva y así aumentar la eficiencia del proceso de fraccionamiento de la celulosa. De esta manera en la sacarificación las enzimas pueden acceder a la celulosa más fácilmente y la pueden degradar a monómeros de glucosa. El pre-tratamiento es crítico dentro del proceso productivo del bioetanol, ya que determina el rendimiento de las etapas posteriores y los costos del proceso [6] .

Para asegurar un aprovechamiento pleno de estos componentes a etanol, es necesario realizar antes una etapa de impregnación (a 80°C y con porcentaje de ácido sulfúrico del 1 y 2 % en peso), este estudio compara los azúcares contenidos en los residuos de bagazo de caña de azúcar y los impregnados. Por tanto en la impregnación se ha considerado el paso fundamental, de mayor impacto a los pasos posteriores (hidrolisis enzimática, fermentación), así como la integración de procesos para reducir la demanda energética y que a su vez sean económicamente y técnicamente viables, sin que se altere la producción alimenticia y el medio ambiente. [7 8] .

La impregnación es difícil realizarla en la etapa de pretratamiento ya que por lo general tiene tiempos de residencia muy cortos, menores a 20 minutos y un pretratamiento ideal maneja porcentaje de sólidos mayores a 30%, condiciones a las cuales, una adición del ácido in situ no se difunde completamente en todas las partículas de la biomasa

Algunas de las ventajas de la impregnación especialmente con ácido, es que permite cambiar la estructura de la lignocelulosa, aumentar el área superficial y la porosidad de la biomasa; modificar y eliminar la lignina, des polimerizar parcialmente y eliminar la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa y como desventajas se puede encontrar corrosión por ácido de equipos, formación de inhibidores debido al ácido y a las altas temperaturas [9] .

La impregnación de la materia prima (bagazo de caña), se ingresa a un tanque de agitado donde se somete a una temperatura de 80°C, 50 Hz y un tiempo de dos horas aproximadamente, estas condiciones establecidas a partir de estudios previos realizados por el ICP, permiten solubilizar el material lignocelulósico. Luego de ser sometido con ácido sulfúrico diluido, es transportado a un equipo diseñado por UIS-ECOPETROL de la Universidad Industrial de Santander, el cual es nombrado REACTOR DE PRETRATAMIENTO TERMOMECANICO, a cargo de Ingeniera Química Neila Mantilla, (egresada de la Universidad Industrial de Santander), quien bajo el marco de su tesis de doctorado realizó el diseño y respectiva puesta en marcha del equipo.

El pretratamiento de la biomasa se llevó a cabo en un equipo desarrollado por UIS-ECOPETROL, que combina tres métodos de pretratamiento: Pretratamiento térmico, molienda y explosión de vapor. Donde la biomasa impregnada ingresa al equipo por una zona de alimentación en esta se reducen los sólidos de la biomasa de un 25% p/p a 50-60% p/p, seguido a esto hay un sistema térmico que trabaja a una presión de 24psi con inyección de vapor a 130°C, con la finalidad de romper y solubilizar cadenas de celulosa, hemicelulosa y lignina. Y por último una zona de molienda donde se reduce el tamaño de partícula dando lugar a una alta recuperación de azúcares y a un aumento de la digestibilidad de la celulosa,

preparándola para un posterior ataque enzimático donde se hidrolizan a carbohidratos principalmente a Glucosa y Xilosa [10] .

La impregnación con ácido se realiza en un tanque de agitación conformado por seis paletas las cuales influyen en la difusividad del ácido a través del material lignocelulósico difundiéndose de manera homogénea. Para el estudio del material lignocelulósico antes de la impregnación y después, fue necesario analizar las composiciones físicas y químicas, la caracterización de la biomasa impregnada con ácido diluido, permite observar las distintas concentraciones de compuestos presentes en el material antes y después. Durante el desarrollo del presente proyecto se utilizan métodos analíticos desarrollados por el Laboratory National Energy Renewable (NREL). Estas técnicas utilizadas se acoplaron al avance del proyecto y a la comodidad de los laboratorios presentes en la escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander.

La biomasa impregnada obtenida es transportada y transformada por el reactor de pretratamiento termomecánico. La zona de alimentación permite reducir los sólidos de la biomasa de un 25% p/p a 50-60% p/p [10] . Posteriormente, en la sección de pretratamiento termoquímico constituido por una chaqueta de calentamiento alcanza temperaturas que oscilan entre 130 y 140°C, esta temperaturas se generan por medio de inyección de vapor seguido de una sección de molienda, la cual permite pretratar el bagazo caña de azúcar dando lugar a una alta recuperación de azúcares y a un aumento de la digestibilidad de la celulosa [8]. Gracias a que es un combinación de secciones continuas del equipo la etapa de pretratamiento mecánico, también es una etapa importante para el proceso, esta consiste en reducir el tamaño de la partícula, la cristalinidad de la celulosa y el grado de polimerización (DP), el diseño en esta parte del equipo consta de la

siguiente forma sinfín- molino- sinfín de manera axial que permiten el transporte del material.

Según el análisis de la bibliografía los países que más han investigado la conversión de biomasa a etanol desde los primeros años de la década del 1980 son: Estados Unidos y Brasil. Los estudios estuvieron encaminados mayormente a la producción de biomasa y conversión de energía, dando como resultados tecnologías para la conversión de celulosas y hemicelulosas en etanol usando bacterias y enzimas modificadas y tecnologías para la separación de etanol por membrana [11] .

En el estudio de la cáscara de arroz, Henri Branconnot convirtió materiales vegetales en azúcares con tratamiento ácido, centrándose en ácidos fuertes como HCl al 40-42% y H₂SO₄ al 0,5%. Durante la segunda guerra mundial se elevaron costos del etanol por lo que se empezó a explotar otras posibles soluciones que fueran fuentes de producción del mismo [11] [12] .

Estas investigaciones se dirigieron a la eliminación de la hemicelulosa antes de la hidrólisis ácida de la celulosa, para recuperar azúcares de seis carbonos. En 1943 con el proceso de Scholler, donde mezcló desechos de madera de abeto con H₂SO₄ al 0,5% durante 45 minutos a una temperatura de 120°C y el proceso de Madison donde una pre mezcla contenida de H₂SO₄ al 0,5-0,6% durante 20 minutos, seguida de un aumento de temperatura a 185°C durante un tiempo de 2-3 horas. El azúcar de madera resultante tenía rendimientos del 35-49% del teórico posible [12] .

Chen et al & Esteghlalian et al Confirman los parámetros cinéticos para la hidrólisis de xilano de H₂SO₄ diluida modelizada con hidrólisis de xilano bifásico y formación de xilo-oligómeros intermedios. Estos pretratamientos se realizaron en un reactor a una concentración de sólidos del 6% usando condiciones de temperatura de 120-150°C, concentraciones de ácido de 0,44 - 1,9%, y tiempos de residencia de 2 - 90 min. Factores que dependen de la concentración efectiva de ácido (es decir, concentración de ácido después de la neutralización por cenizas contenidas en la materia prima) para determinar las constantes de velocidad.

Una serie preliminar de experimentos reportados por Schell & Farmer confirman que el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido recuperan gran cantidad de xilano en un 90% independientemente de la temperatura de reacción. Durante las últimas décadas se han producido grandes progresos en la reducción de los costes de las tecnologías de producción de bioetanol basadas en hidrólisis enzimática. La clave de estos avances ha estado en aumentar los rendimientos, las velocidades de producción y las concentraciones de etanol mediante mejoras en la tecnología de pretratamiento, desarrollo de mejores enzimas celulolíticas y la combinación sinérgica de la hidrólisis y fermentación [8] .

En el 2007 estudios previos realizados por (Sun and Cheng, 2002; Moiser et al., 2005), reportan que una impregnación altera el tamaño a la biomasa lignocelulósica macroscópica y microscópicamente, de modo que la hidrólisis de la fracción de carbohidratos a los azúcares monoméricos se puede lograr más rápidamente y con mayores rendimientos [13] La impregnación con ácidos diluidos han demostrado que al catalizar los materiales lignocelulósico degradan la hemicelulosa en constituyentes más simples y aumentan así la facilidad de las enzimas celulolíticas hacia la hidrólisis de la fracción celulósica en material de alimentación fermentable [14] .

Otro aporte importante de alimentación-ácido-impregnada resultó en un rendimiento de azúcar hemicelulósicos soluble de 76,9% de la hidrólisis de la primera etapa y un rendimiento de glucosa soluble de 33,7% a partir de la segunda etapa de hidrólisis [15] . En este estudio los autores reportan que realizar dos procesos en continuo registra rendimientos óptimos del proceso, indicando un trabajo significativo.

El hidrolizado se incubaba adicionalmente a una temperatura inferior durante un tiempo de residencia de 2 h para hidrolizar la mayor parte de los oligosacáridos en monosacáridos, seguido de la separación de las fracciones sólidas y líquidas

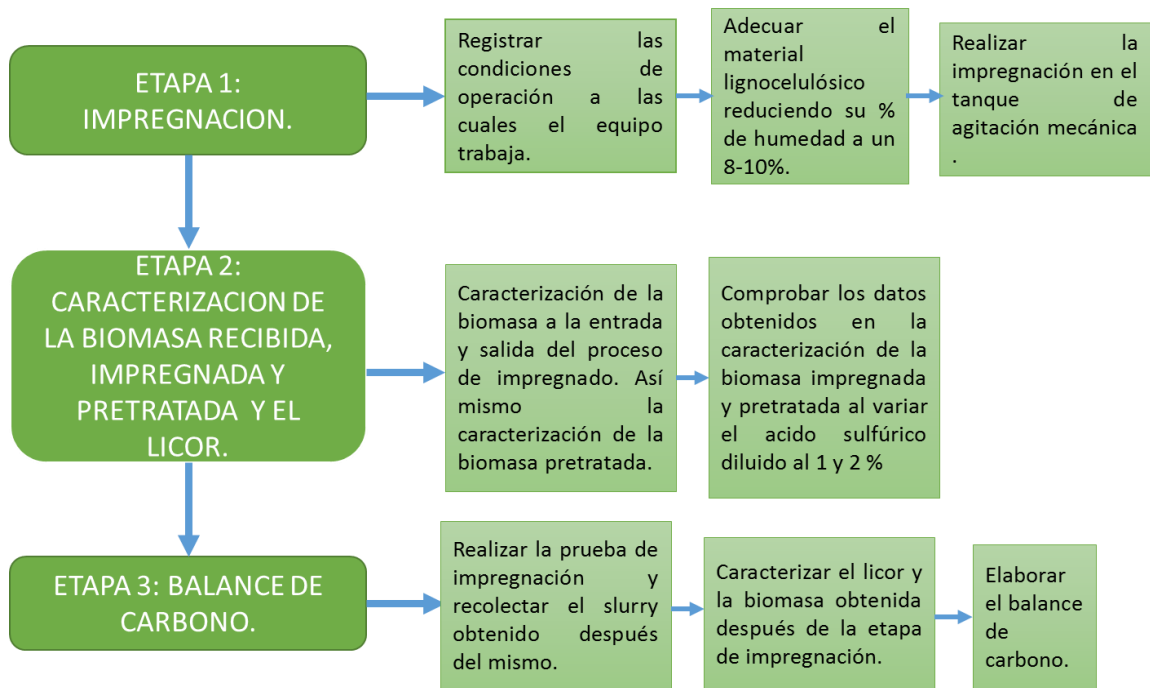
El objetivo del presente proyecto es estudiar el efecto de utilizar dos concentraciones diferentes de ácido sulfúrico diluido en el proceso de impregnación, principalmente, estudiar el efecto sobre la solubilización de componentes de la biomasa en esta etapa.

Asimismo, estudiar el efecto de la impregnación con ácido al 2% en el proceso de pretratamiento termomecánico desarrollado por UIS-ECOPETROL, utilizando tres flujos diferentes de bagazo de caña de azúcar impregnado.

2. METODOLOGÍA

En la siguiente figura se representa el diagrama de flujo del procedimiento que se lleva a cabo para el desarrollo del presente proyecto, dividiéndose en tres etapas importantes.

FIGURA 1. Diagrama de metodología llevado a cabo en el desarrollo del proyecto.



2.1. ETAPA 1: IMPREGNACIÓN.

Para realizar la impregnación fue necesario definir las condiciones de operación presentes en esta etapa y adecuar el material lignocelulósico ya que este permite obtener un buen rendimiento en etapas posteriores.

Los rangos de operación para el desarrollo del presente proyecto se establecieron a partir de estudios previos realizados por el **ICP- Instituto Colombiano del Petróleo y el Grupo de Investigación el CIDES (Universidad Industrial de Santander)**. Las condiciones de operación seleccionadas fueron de 80°C durante 2 horas. La frecuencia de agitación fue 50 Hz.

Los valores de ácido sulfúrico diluido se toman entre 1 y 2 % en peso. Para el valor de ácido al 1% fue establecido por el ICP, y el valor 2% se estimó para realizar una comparación y así obtener un análisis de este valor de difusión, el cual represente un % de recuperación significativo para los de azúcares presentes en la biomasa. El ácido sulfúrico a estas condiciones disminuye la severidad del proceso y permiten la no formación de compuestos no deseados en el proceso de obtención de Bioetanol los cuales son Furfural y HMF (5-hidroximetilfurfural).

El material lignocelulósico (o bagazo de caña de azúcar) residuo proveniente del proceso de obtención azucarera, procedente de Incauca, se seca al aire libre y se extiende sobre una lona durante 5 horas con fin de reducir el contenido de humedad y así prevenir la degradación de las fibras por la acción de microorganismos. [10] Después del secado se almacenó el material seco en sacos plásticos sellados.

Esta adecuación y disposición del material lignocelulósico como la humedad y homogenización, son importantes ya que permiten resultados homogéneos en el proceso de pretratamiento e hidrólisis. Según la Norma Técnica Colombiana NTC 3674 [10] la biomasa se prepara de manera homogénea, este método permite que todas las composiciones se distribuyan de igual manera en toda la biomasa. Los lotes de biomasa se organizan adecuadamente en proporciones iguales para verificar ecuanimidad en toda la biomasa y así no afectar posteriores procedimientos.

La impregnación ácida se lleva a cabo en un tanque mezclador resistente a la corrosión, con agitación mecánica y calentamiento eléctrico. Para empezar, se

toman 2800 g que se estiman según la capacidad del equipo y con el porcentaje de sólidos, se determina las proporciones necesarias de ácido y agua para realizar la impregnación.

Posteriormente, se agrega el agua y ácido en el tanque, que se encuentra entre 20rpm a 50 rpm. Al llegar a una temperatura de 80°C, se agrega moderadamente la biomasa y se deja impregnar por un tiempo de 120 minutos, finalizado el proceso se apaga el equipo y se deja enfriar por 24 horas hasta llegar a temperatura ambiente, debido a la dificultad de retirar el slurry a esta temperatura.

El slurry, se retira del mezclador, para ser escurrido en cubetas plásticas mediante un prensado manual, separando la biomasa y el licor, así mismo, se cuantifica cada producto. Del licor se toma una muestra filtrada de aproximadamente 200 mL y se congela para su preservación y caracterización.

2.2. ETAPA 2. CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA RECIBIDA, IMPREGNADA, PRETRATADA Y LICOR IMPREGNADO.

2.2.1. Caracterización de biomasa recibida, impregnada y pretratada. La caracterización de la biomasa tanto impregnada como pretratada, se realiza usando como guía un protocolo de caracterización acoplado a la norma establecida por el laboratorio nacional de energía renovable [17] . Donde se lleva a cabo la determinación de sólidos insolubles, separando de esta biomasa las impurezas existentes y seguido a esto se caracteriza con hidrólisis ácida de tal modo que se hidrolice la hemicelulosa y celulosa y en los residuos quede la lignina, ver figura 3.

La biomasa es homogeneizada, permitiendo que las muestras a analizar tengan la misma composición para que los resultados sean óptimos. Se toman tres muestras, cada una de 20 g y se realiza un lavado, con el fin de caracterizar sólidos insolubles. Estos sólidos son puestos en un horno a 105°C durante 14 horas y posteriormente se calcula su porcentaje de sólidos [16] .

Asimismo, se pesan 0,7 g de biomasa en botellas de vidrio de aproximadamente 300 mL, por otra parte, se toman muestras para calcular porcentaje de sólidos totales, se realiza un procedimiento de hidrólisis ácida, siguiendo la metodología a continuación: se agregan 7 ml de H₂SO₄ al 72% a la biomasa, se sumergen las botellas de vidrio en un baño María a 30°C con agitación cada 5 minutos durante una hora, para que la mezcla de la biomasa y el ácido sea uniforme, al finalizar, se agregan 196ml de agua, obteniendo así una concentración de ácido presente en la muestra de 4% [18] . Seguidamente se pasa a la autoclave durante una hora a 15 psi.

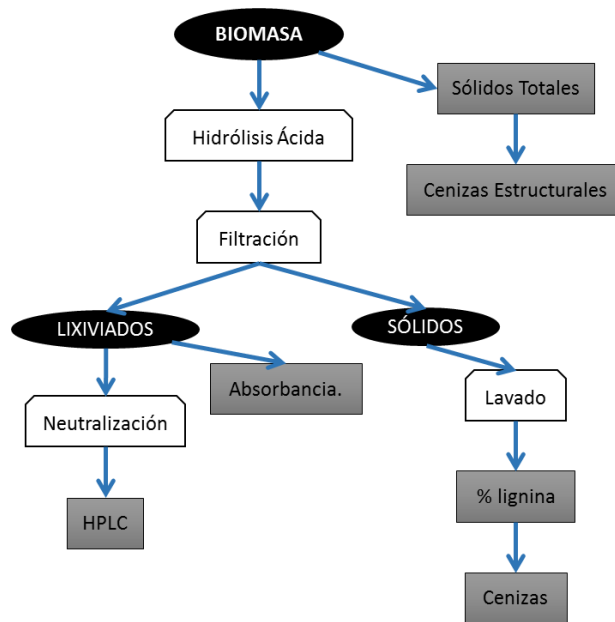
Finalizado este procedimiento se efectúa una filtración, separando así el licor de los sólidos. Ahora, mediante un lavado con agua, los sólidos lavados, son llevados hasta un pH 5. En estas condiciones son llevados a horno a 105°C y luego a mufla para determinar porcentaje de Lignina total insoluble en ácido. [19]

Los licores son analizados por medición de absorbancia, en el espectrofotómetro pharo 300 Merck, donde se determina la lignina soluble en ácido, seguidamente, para la neutralización del lixiviado, se toman alrededor de 20 mL de muestra y carbonato de calcio hasta obtener un 3-4 pH y mediante filtros de jeringa se limpian las muestras con el fin de evitar cualquier precipitado, para posteriormente ser llevados a analizar y obtener datos de concentración en HPLC (High Performance Liquid Chromatography)[19] .

2.2.2. Obtención y Caracterización de sólidos solubles (monómeros y oligómeros). Los licores filtrados del proceso de impregnación requieren realizar nuevamente filtración antes de caracterizar para eliminar finos, que no se logran separar de la muestra. Esta caracterización se realiza basándose en el protocolo acoplado a la norma establecida por el laboratorio nacional de energía renovable [18] .

En esta etapa se determina tanto el contenido de monómeros como oligómeros. Para monómeros, se realiza una neutralización con carbonato de calcio llegando a un pH 4 y estos se analizan con el HPLC para determinar la concentración de los componentes de la biomasa.

Figura 2. Caracterización de Sólidos Insolubles.

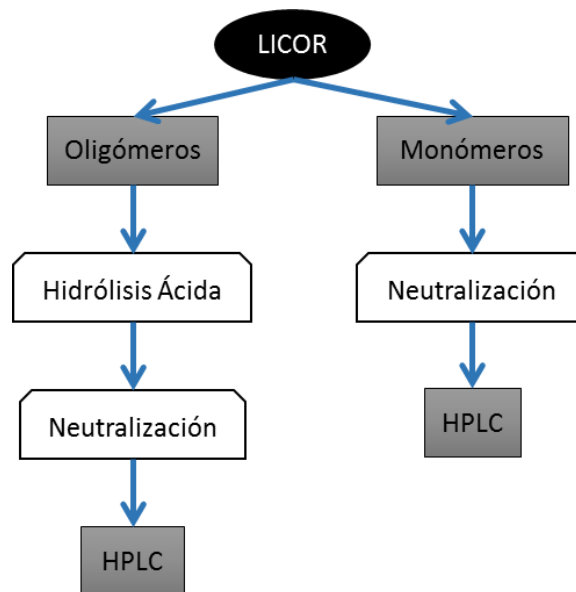


Para oligómeros se lleva a cabo una hidrólisis ácida. Se miden 20 mL de licor en botellas de vidrio, se determina el pH de la muestra y de acuerdo a esto, se agrega solución ácida de H₂SO₄ al 72%, según lo reportado en tablas de los manuales de procedimiento NREL/TP-510-48087. Ahora, se lleva a cabo el mismo

procedimiento de la hidrólisis ácida en los sólidos de la biomasa, con excepción de llevar estas botellas a agitación en baño María, se pasa directamente a la autoclave (ver figura 4).

Luego, para caracterizar monómeros del licor, se mide el pH del licor y cuando se encuentre entre valores menores a 3 pH se procede a neutralizar con CaCO_3 hasta obtener un 3-4 pH [18] , se procede a centrifugar las muestras separando el precipitado del sobrenadante, se pasan por filtro de jeringa y finalmente los licores se analizan con HPLC.

Figura 3. Caracterización de Licor de Impregnación



2.3. ETAPA 3. BALANCE DE CARBONO DE BIOMASA IMPREGNADA Y PRETRATADA.

Durante el proceso que se lleva a cabo para el desarrollo del proyecto fue necesario tener en cuenta las corrientes de entrada y salida del proceso. Realizar

un balance de masa no fue el más adecuado debido a que la cantidad másica de entrada no es igual a la que sale, esto se debe a que la biomasa gana peso por el impregnado del ácido presente en todas las partículas.

Los cálculos para el balance del material son fundamentales ya que comprueban la eficiencia y la consistencia en los datos para el análisis tanto antes y después del pretratamiento. Es por ello que se hace un balance por componentes de carbono para evitar posibles reacciones de hidratación y deshidratación presentes durante el proceso [7] . Todos los componentes principales de la biomasa hemicelulósicos, celulósicos, y las fracciones lignocelulósicos se consideraron para los datos de componentes individuales. Para el balance de carbono es necesario realizar las corridas en el tanque de mezclado, para la biomasa impregnada tanto al 1% y 2% en peso de ácido sulfúrico, se alimentan 2800 gramos de biomasa en base seca durante 2 horas, y se recolectó el licor que se obtiene después de la impregnación, cada corrida se hizo por duplicado.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS DE LA ETAPA DE IMPREGNACIÓN:

Fue necesario hallar el valor de % sólidos totales de la biomasa como es recibida con el fin de calcular la proporción de agua y ácido sulfúrico con una pureza del 95-96% a agregar. En la tabla 1 y tabla 2 se muestran los valores obtenidos para cada corrida a diferentes concentraciones de ácido sulfúrico diluido.

Tabla 2. Datos para impregnación al 1% de ácido sulfúrico diluido.

| CORRIDA 1% | CANTIDAD | UNIDADES |
|------------------------|-----------------|-----------------|
| SOLIDOS TOTALES | 92 | % |
| AGUA | 23 | Gramos |
| ÁCIDO SULFÚRICO | 124.44 | Gramos |

Tabla 3. Datos para impregnación al 1% de ácido sulfúrico diluido.

| CORRIDA 2% | CANTIDAD | UNIDADES |
|------------------------|-----------------|-----------------|
| SOLIDOS TOTALES | 91.90 | % |
| AGUA | 22.5 | Gramos |
| ÁCIDO SULFÚRICO | 246.43 | Gramos |

Durante el proceso de impregnado fue necesario medir las cantidad de biomasa ingresada al tanque de agitación mecánica con el fin de realizar un balance de masa que me permitiese cuantificar las pérdidas presentes en el equipo. Para cada impregnado tanto al 1 como al 2% se hicieron por duplicado.

Tabla 3. Balance total de biomasa impregnada al 1 y 2 % ácido sulfúrico diluido.

| BALANCE DE MASA TOTAL IMPREGNACIÓN CON H2SO4 | | | | | | | | | | |
|--|------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------|------------------|---------------|
| Nº muestra | ENTRADA | | | | | SALIDA | | | | |
| | Peso de recipiente (g) | Peso de agua agregada (g) | Peso de ácido agregado (g) | Peso de biomasa húmeda (g) | Peso total inicial (g) | Peso de recipientes (g) | Peso de solución+recipiente (g) | Peso total final (g) | Peso perdido (g) | % de pérdidas |
| IMPREGNACION 1% | 399,09 | 23026,73 | 224,71 | 2800 | 26051,44 | 3213,77 | 27816,19 | 24602,42 | 1449,02 | 5,56 |
| IMPREGNACION 2% | 399,41 | 21871,77 | 250,95 | 2800 | 24922,72 | 2375,51 | 26138,56 | 23763,05 | 1159,67 | 4,65 |

Como podemos observar en la tabla 3, las pérdidas presentes tanto al impregnado al 1 y 2% fueron aproximadamente entre el 4-5%, estas pérdidas se debieron a la evaporación de la solución del ácido sulfúrico al momento de agregar el material lignocelulósico al tanque de agitación mecánica.

3.2. ANÁLISIS DE LA ETAPA DE CARACTERIZACION DE BIOMASA RECIBIDA, IMPREGNADA, PRETRATADA Y EL LICOR RESULTANTE.

3.2.1 Caracterización De La Biomasa Recibida. En la tabla 4, se muestra la caracterización realizada a la biomasa como es recibida.

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización del material lignocelulósicos (ver tabla 4) mostraron que la proporción de glucan con 35,32% alcanzada en la

prueba con respecto a los reportados por la literatura (5) es menor, esto se puede deber a las características propias de la biomasa analizada ya que se repitió muchas veces la caracterización pero su contenido no varió.

Tabla 4. Caracterización y balance total de biomasa recibida.

| Descripción | Resultado Tesis | | Caracterización NIST-NREL8491 | |
|--------------------------|---|---------------------|---|---------------------|
| | Resultado (g componente/g sólidos insolubles) | Desviación Estándar | Resultado (g componente/g sólidos insolubles) | Desviación Estándar |
| % de Cenizas Totales | 5,24 | 0,03 | 3,84 | 0,26 |
| % de Lignina | 21,27 | 0,07 | 24,4 | 1,3 |
| % de Glucan | 35,32 | 1,61 | 40,5 | 1,4 |
| % de Xilano | 21,40 | 0,15 | 22,04 | 0,94 |
| % de Arabiano | 1,81 | 0,11 | 1,49 | 0,33 |
| % de grupos acétlicos | 4,69 | 0,27 | 3,19 | 0,81 |
| % de extractivos en agua | 4,4 | 0,04 | 4,1 | 1 |
| % extractivos en etanol | 1,36 | 0,12 | 1,79 | 0,21 |
| % Nitrógeno | | | 0,21 | 0,1 |
| Total | 95,50 | | 101,56 | |

La diferencia en los valores obtenidos de lignina en la muestra de referencia se debe a que los resultados de Lignina soluble 2,4%, Lignina Insoluble 20,9% y Lignina Total 24,4% hay cenizas que no se restaron en la muestra. En la presente tesis se sumaron los valores de Lignina Soluble 2,62% y Lignina insoluble residual restando las cenizas totales 18,55%.

Para el valor de ácido acético de Caracterización NIST-NREL8491, se puede observar que en comparación a los obtenidos en el resultado de la tesis tiene un aumento significativo debido a que la hemicelulosa convierte un 4,69% de este compuesto a lo reportado.

3.2.1. Caracterización De La Biomasa Impregnada Al 1 Y 2 % P/P De Ácido Sulfúrico Diluido.

Tabla 5. Caracterización de biomasa impregnada 1 y 2%.

| CARACTERIZACIÓN DE IMPREGNACIÓN 1 Y 2 % | | |
|--|--------------------------------------|-----------|
| COMPOSICION % (g componente / g sln) | UNIDADES (g componente/g sln) | |
| | 1% | 2% |
| Glucano | 39,38 | 39 |
| Xilano | 21 | 18 |
| Grupos Acetilo | 4,01 | 2,58 |
| %sólidos insolubles | 92,65% | 83,42% |

Se puede observar en la Tabla 5, que un aumento en el porcentaje de ácido sulfúrico diluido no genera un incremento en la composición de glucosa como se espera. La degradación de hemicelulosa da como resultado una cantidad de xilosa mayor en la biomasa impregnada al 1 % con respecto a la del 2% y genera un incremento en la arabinosa.

Adicionalmente a esto se puede observar una formación de ácido acético proveniente de los grupos acetilos presentes en la hemicelulosa, en la

impregnación al 2%, esta formación es menor ya que la concentración del ácido sulfúrico presente genera una difusión de este compuesto viéndose evidenciado en monómeros del licor (ver gráfica 3). Además al incluir esta corriente en la fermentación este puede actuar como un inhibidor del proceso, pero no podemos excluirla ya que se perderían azúcares presentes en la solución.

Gráfica 1. Componentes vs % (g componentes / g sln)

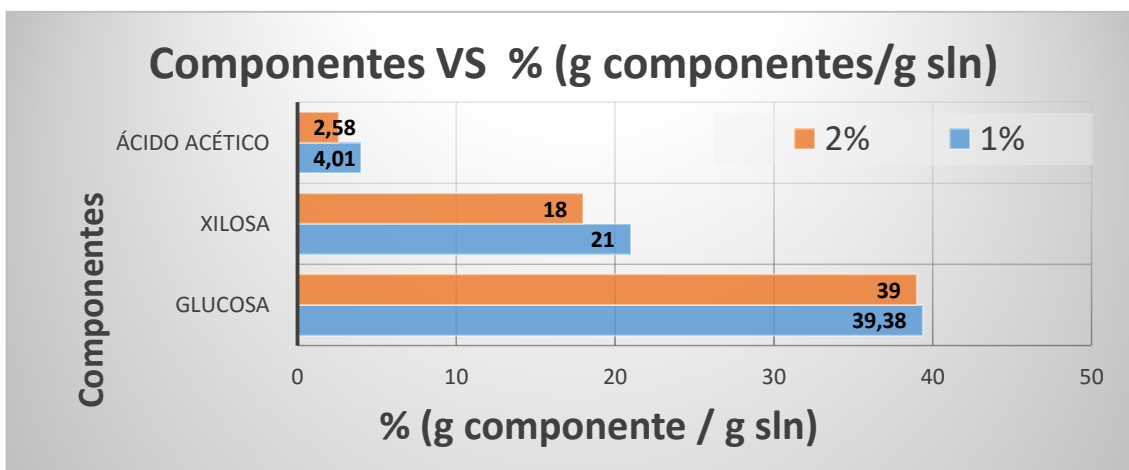
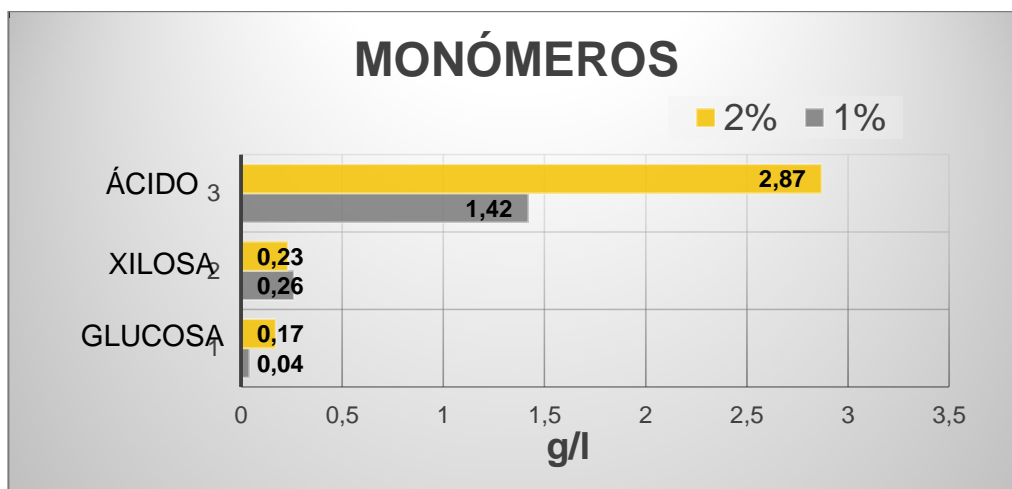


Tabla 6. Caracterización de licor impregnado 1 y 2 %

| CARACTERIZACION DE LICOR IMPREGNADO 1 Y 2 % | | IMPREGNADO 1% | IMPREGNADO 2% |
|---|---------------|---------------|---------------|
| MONÓMEROS (g/l) | Glucosa | 0,04 | 0,17 |
| | Xilosa | 0,26 | 0,23 |
| | Ácido acético | 1,42 | 2,87 |
| OLIGÓMEROS (g/l) | Glucosa | 1,73 | 1,74 |
| | Xilosa | 2,62 | 7,65 |

Gráfica 2. Monómeros de licor impregnado



Gráfica 3. Oligómeros de licor impregnado



3.2.2. Análisis de la biomasa pretratada al 2% de ácido sulfúrico diluido a diferentes flujos de alimentación.

Para el proceso de pretratamiento, el cual contó con tres condiciones de flujo de alimentación al equipo de 30, 50 y 80 g/min (tabla 7), se analizó la biomasa

obtenida de la caracterización, donde se llevó a cabo la hidrólisis de las muestras en medio ácido, a los azúcares poliméricos presentes en la biomasa insoluble obtenidos por medio del HPLC, se les realizó un ajuste anhidrido [7] (0,9 hexosas, 0,88 pentosas y 0,7 g/g polímero monómero ácido acético) para obtener así los azúcares monoméricos.

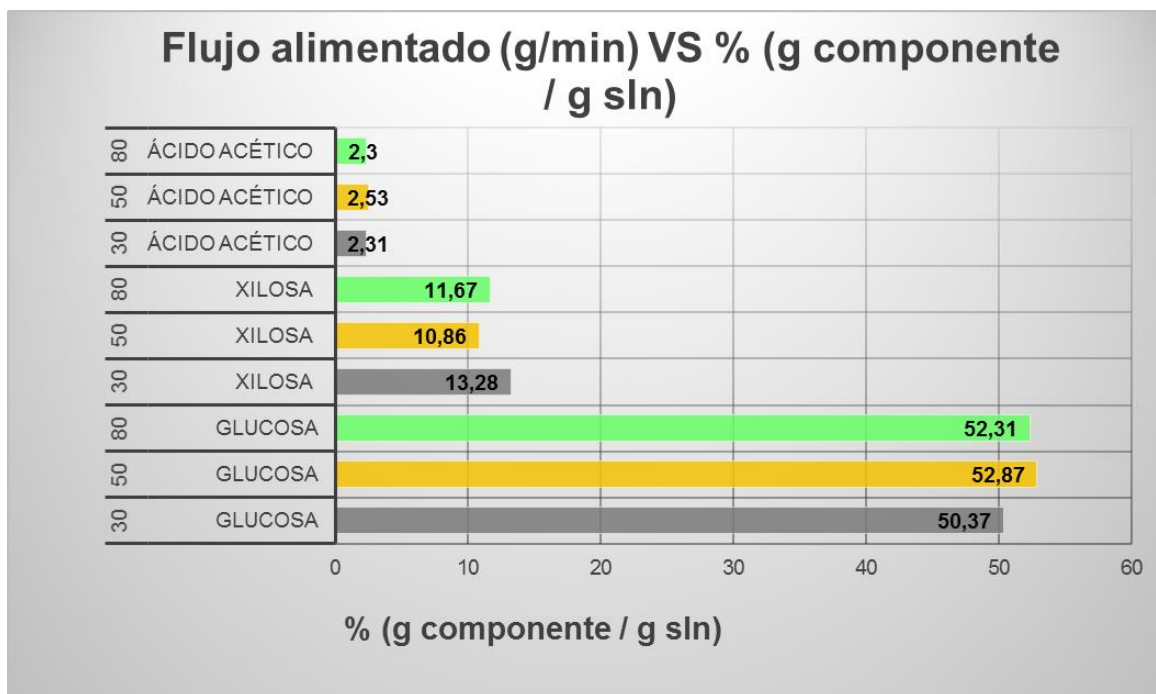
Tabla 7. Caracterización de biomasa pretratada al 2% con diferentes flujos de alimentación.

| CARACTERIZACIÓN DE BIOMASA PRETRATADA AL 2% | | |
|--|------------------|------------|
| Flujo de alimentación (g/min) | Compuesto | g/l |
| 30 | Glucosa | 50,37 |
| 50 | Glucosa | 52,87 |
| 80 | Glucosa | 52,31 |
| 30 | Xilosa | 13,28 |
| 50 | Xilosa | 10,86 |
| 80 | Xilosa | 11,67 |
| 30 | Ácido acético | 2,31 |
| 50 | Ácido acético | 2,53 |
| 80 | Ácido acético | 2,3 |

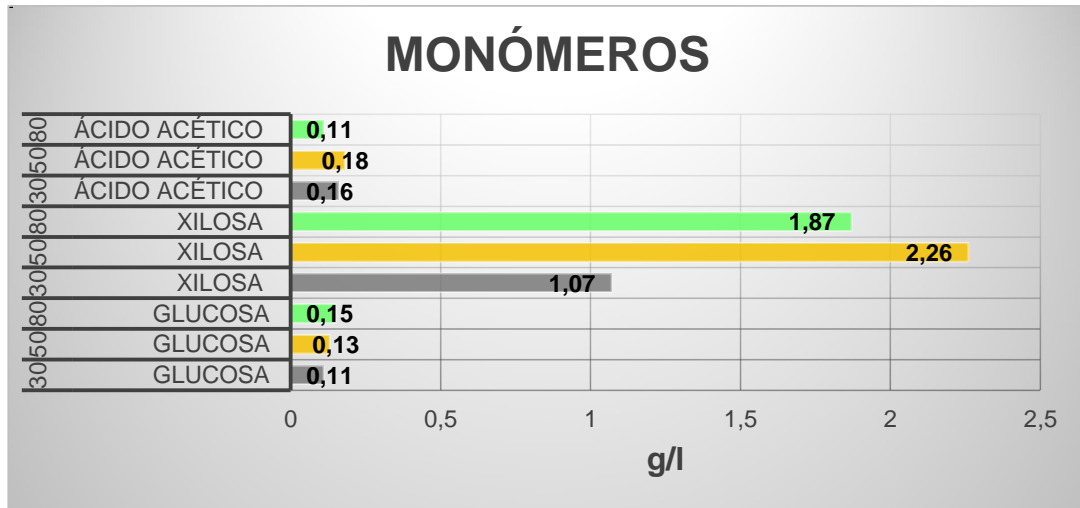
Asimismo, se registraron los azúcares obtenidos del licor, monómeros y oligómeros, (Gráfica 1 y 2). Estos últimos se llevaron a su forma monomérica los cuales se compararon con los monómeros iniciales, evidenciando una solubilización de estos compuestos presentes en el licor.

Ya que el proceso de pretratamiento es continuo, se observó que los flujos alimentados pueden tener influencia sobre la obtención de azúcares a la salida de pretratamiento viéndose reflejado en la Tabla anterior. Así mismo, parte de la glucosa se hidroliza también, principalmente en su forma oligomérica en la corriente de flujo a 30(g/min) (ver gráfica 4), pero para las demás corrientes se observa una equivalencias en los datos, en cambio para la xilosa se ve que disminuye la composición con respecto a la corriente alimentada indicando que se solubilizo parte del xilano presente en la biomasa (ver gráfica 5 y 6).

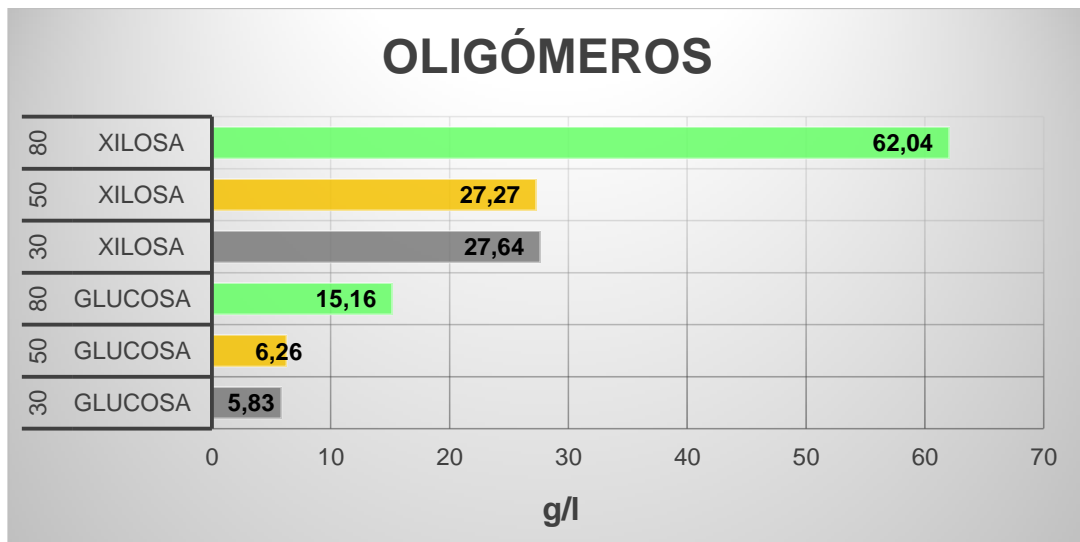
Gráfica 4. Flujo de alimentación (g/min) vs % (g componente / g sln)



Gráfica 5. Monómeros de caracterización de biomasa pretratada al 2%.



Gráfica 6. Oligómeros de caracterización de biomasa pretratada al 2%.



3.3. ANÁLISIS DE LA ETAPA DEL BALANCE DE CARBONO DE LA BIOMASA IMPREGNADA AL 1 Y 2% DE ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO.

En las Tablas 8 y 9 , se indica los balances de carbono, donde se puede observar que los resultados muestran que al realizar una impregnación previa al bagazo en su estado natural este libera la celulosa presente en esta fuerte estructura tridimensional indicándonos un mejor difusión del ácido. Esto señala que efectuar una impregnación con ácido sulfúrico diluido en este proceso es factible, ya que al comparar los resultados de la impregnación al 1 y 2% muestran que a un mayor % de ácido ayuda a soltar más la estructura del bagazo y así poder obtener % recuperación considerable de los azúcares.

Tabla 8. Balance de carbono de biomasa impregnada al 1% con ácido sulfúrico.

| BALANCE DE CARBONO BIOMASA IMPREGNADA 1% | | | | | | | |
|--|-----------|------------|-------------|---------|-------|--------------------|----------------------------|
| Compuesto | Entrada | Salida | | | | Total (C-mole) [g] | Recuperación (% C entrada) |
| | C-mol [g] | insolubles | | licores | | | |
| | | C-mol | % C entrada | C-mol | % C | | |
| Glucosa | 33,96 | 32,96 | 97,04 | 1,24 | 3,65 | 34,2 | 100,69 |
| Xilosa | 20,58 | 18,45 | 89,64 | 2,02 | 9,8 | 20,46 | 99,44 |
| Arabinosa | 1,74 | 0,39 | 22,2 | 1,01 | 57,95 | 1,39 | 80,15 |
| Acido Acético | 4,51 | 3,44 | 76,33 | 0,99 | 22,05 | 4,44 | 98,39 |
| Lignina | 24,49 | 22,97 | 93,77 | 0 | 0 | 22,97 | 93,77 |
| Total | 85,29 | 78,2 | 378,97 | 5,26 | 93,46 | 83,46 | 97,86 |

De los resultados obtenidos del balance de carbono para la biomasa impregnada al 2%, observamos una mayor solubilización de los compuestos y según lo reportado por Jiménez Mario et al, indicando que un aumento en la concentración de ácido no genera un mayor rendimiento en compuestos como glucosa y xilosa.

Tabla 9. Balance de carbono de biomasa impregnada al 2% con ácido sulfúrico.

| BALANCE DE CARBONO BIOMASA IMPREGNADA 2% | | | | | | | |
|---|-----------|------------|-------------|---------|--------|--------------------|----------------------------|
| Compuesto | Entrada | Salida | | | | Total (C-mole) [g] | Recuperación (% C entrada) |
| | C-mol [g] | Insolubles | | Licores | | | |
| | | C-mol | % C entrada | C-mol | % C | | |
| Glucosa | 33,96 | 33,48 | 98,58 | 1,33 | 3,92 | 34,81 | 102,5 |
| Xilosa | 20,58 | 15,45 | 75,09 | 5,52 | 26,82 | 20,97 | 101,91 |
| Arabinosa | 1,74 | 0,47 | 27,13 | 1,29 | 74,05 | 1,76 | 101,18 |
| Acido Acético | 4,51 | 2,22 | 49,11 | 2,01 | 44,57 | 4,23 | 93,69 |
| Lignina | 24,49 | 24,37 | 99,48 | 0 | 0 | 24,37 | 99,48 |
| Total | 85,29 | 75,99 | 349,38 | 10,15 | 149,36 | 86,14 | 101 |

4. CONCLUSIONES

A partir de los procedimientos realizados por las técnicas planteadas, realizar un debido secado al material lignocelulósico, son necesarias ya que estas evitan la degradación de las fibras por acción de los microorganismos, lo cual genera un mejor rendimiento a etapas posteriores.

Se puede concluir que hay una mayor solubilización de componentes en la impregnación al 2%, esto puede ser bueno o malo dependiendo de lo que se le haga al licor de impregnación si se ingresa al proceso puede ser bueno solubilizar la mayor cantidad de componentes, pero si este no ingresa al proceso no se debe aumentar el % de ácido en la etapa de impregnación.

Para el balance de carbono de la impregnación al 1% y 2%, se puede apreciar una solubilización de glucosa del 3%, indicando que un aumento del ácido sulfúrico diluido no genera cambios notables. A comparación de la xilosa que hidroliza, aproximadamente en un 10 % cuando se impregna al 1% y de 27% cuando se somete a impregnación al 2%.

Para la biomasa pretratada el flujo de 80 g/min indica que el aumento de la concentración genera una mayor solubilización de xilosa de 62,04 (g componente/g sln). Para la glucosa y ácido acético las composiciones no variaron según diferencias de flujos utilizados.

Con respecto al ácido acético presente en la biomasa caracterizada se evidencio una cantidad no tan significativa de este compuesto tanto en la biomasa impregnada al 1 y 2%. Este compuesto es un inhibidor del proceso de fermentación, pero contiene azúcares para el proceso, por lo cual no es debido retirarlo del proceso, ya que causaría perdidas.

5. RECOMENDACIONES

Estudiar un rango de concentración entre 1 y 2% que permita establecer el límite de la difusión del ácido en el material lignocelulósico, con el fin de obtener mayor alta recuperación de azúcares aumentando la digestibilidad de la celulosa y preparándola para un posterior ataque enzimático, donde se hidrolizan carbohidratos, principalmente glucosa y xilosa.

Estudiar el efecto de la agitación mecánica, para establecer mayor difusión del ácido en bagazo de caña de azúcar.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DÍAZ, J.O., Herrera, F. Producción de etanol combustible a partir de lignocelulosas. Popayán, Colombia. Universidad del Cauca. 2006, p. 1-24.
- [2] VIÑALS-VERDE, M., BELL-GARCÍA, A., MICHELENA-ÁLVAREZ, G. & RAMIL-MESA, M. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. En: ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Ciudad de La Habana, Cuba, enero-abril, 2012. vol. 46. no. p. 7-16.
- [3] SÁNCHEZ RIAÑO, A. M., GUTIERREZ MORALES, A. I., MUÑOZ HERNÁNDEZ, J. A. & RIVERA BARRERO, C. A. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. En: Tumbaga. 2010. vol. 5. no. p. 61-91.
- [4] CHEN, H. & F., XIAOGUO. OP. CIT., p.469
- [5] ABRIL GONZÁLEZ, J.A., NAVARRO, E. A. Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. En: Aleta Ediciones: GRÁFICAS SOL- Écija. 2012. 101 p.
- [6] TOMÁS PEJÓ, M. E. Bioetanol de paja de trigo: Estrategias de integración de las etapas del proceso. Trabajo de grado Doctor en Microbiología. Departamento de microbiología. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2009. 135 p.
- [7] HATZIS, C., RILEY, C. & PHILLIPIDIS, G. P. Detailed material balance and ethanol yield calculations for the biomass to ethanol conversion process. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. 1996. vol. 57/58. no. p. 443-459.
- [8] SCHELL, D. J., FARMER, J., NEWMAN, M. & MCMILLAM, J. D. Applied Biochemistry and Biotechnology: Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot scale reactor. *In*: Humana press Inc. 2003. vol. 105. no. p. 70-85.
- [9] MANTILLA TORRES, M. J. Hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar y paja de trigo con una posterior fermentación alcohólica para obtención de etanol. Quito, Ecuador. Universidad central de Ecuador. 2012. no. p. 69.
- [10] CARDENAS SALAZAR, M. J. & MORANTES CHAPARRO, C. L. Elaboración de una metodología para el desarrollo de los procesos de tamizado, impregnación(ácido sulfúrico diluido) y pretratamiento con el reactor piloto

termomecánico para la producción de etanol a partir de biomasa. Bucaramanga, Colombia. Universidad Industrial de Santander. 2016.

[11] HEATHER, L. TRAJANO, C. E. W. Fundamentals of Biomass Pretreatment at Low pH. Primera. Vancouver, Canada. 2013. no. p. 105-128.

[12] WYMAN, C. E. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. En: BioEnergy Science Center. 1996.

[13] CHANDEL, A. K., RAVINDER RUDRAVARAM, M., LAKSHMI NARASU, L., VENKATESWAR RAO & POGAKU, R. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. En: Biotechnology and Molecular Biology. Febrero 2007. vol. 2 (1). no. p. pp. 014-032.

[14] ANUJ, K., CHANDEL, F. A., VAZ DE ARRUDA, P., THAIS S. S. MILESSI, SILVIO S. & GRAÇAS DE ALMEIDA, M. Dilute Acid Hydrolysis of Agro-Residues for the Depolymerization of Hemicellulose: State-of-the-Art. University of São Paulo. 2012.

[15] KIM KH, T. M. & NGUYEN Q.A. Effects of pressing lignocellulosic biomass on sugar yield in two-stage dilute-acid hydrolysis process. En: Biotechnology for Fuels and Chemicals Division, National Renewable Energy Laboratory,. Golden, Colorado, USA. Mayo 2002.

[16] NATIONAL LABORATORY RENEWABLE ENERGY. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. Golden, Colorado. NREL/TP-510-42621. 2008. p. 1-6.

[17] NATIONAL LABORATORY RENEWABLE ENERGY. Determination of insoluble solids in pretreated biomass material. Golden, Colorado. NREL/TP-510-42627. 2008.

[18] NATIONAL LABORATORY RENEWABLE ENERGY. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. Golden, Colorado. NREL/TP-510-42623. 2008.

[19] NATIONAL LABORATORY RENEWABLE ENERGY. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Golden, Colorado. NREL/TP-510-42618. 2012.

[20] A, S. & B, H., ET AL. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. En: National Renewable Energy Laboratory. 2008. vol. no. p. 11.

BIBLIOGRAFÍA

ABRIL GONZÁLEZ, J.A., NAVARRO, E. A. Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. En: Aleta Ediciones: GRÁFICAS SOL- Écija. 2012. 101 p.

ANUJ, K., CHANDEL, F. A., VAZ DE ARRUDA, P., THAIS S. S. MILESSI, SILVIO S. & GRAÇAS DE ALMEIDA, M. Dilute Acid Hydrolysis of Agro-Residues for the Depolymerization of Hemicellulose: State-of-the-Art. University of São Paulo. 2012.

A, S. & B, H., ET AL. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. En: National Renewable Energy Laboratory. 2008. vol. no. p. 11.

CARDENAS SALAZAR, M. J. & MORANTES CHAPARRO, C. L. Elaboración de una metodología para el desarrollo de los procesos de tamizado, impregnación(ácido sulfúrico diluido) y pretratamiento con el reactor piloto termomecánico para la producción de etanol a partir de biomasa. Bucaramanga, Colombia. Universidad Industrial de Santander. 2016.

CHANDEL, A. K., RAVINDER RUDRAVARAM, M., LAKSHMI NARASU, L., VENKATESWAR RAO & POGAKU, R. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. En: Biotechnology and Molecular Biology. Febrero 2007. vol. 2 (1). no. p. pp. 014-032.

CHEN, H. & F., XIAOGUO. OP. CIT., p.469

DÍAZ, J.O., Herrera, F. Producción de etanol combustible a partir de lignocelulosas. Popayán, Colombia. Universidad del Cauca. 2006, p. 1-24.

HATZIS, C., RILEY, C. & PHILLIPIDIS, G. P. Detailed material balance and ethanol yield calculations for the biomass to ethanol conversion process. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. 1996. vol. 57/58. no. p. 443-459.

HEATHER, L. TRAJANO, C. E. W. Fundamentals of Biomass Pretreatment at Low pH. Primera. Vancouver, Canada. 2013. no. p. 105-128.

JIMÉNEZ C, Mario. Determinación de la accesibilidad enzimática en biomasa lignocelulósica pretratada térmica y mecánicamente con ácido sulfúrico diluido por

medio de hidrólisis enzimática. Tesis de pregrado en ingeniería química. Colombia. Mayo 2017.

KIM KH, T. M. & NGUYEN Q.A. Effects of pressing lignocellulosic biomass on sugar yield in two-stage dilute-acid hydrolysis process. En: Biotechnology for Fuels and Chemicals Division, National Renewable Energy Laboratory,. Golden, Colorado, USA. Mayo 2002.

NATIONAL LABORATORY RENEWABLE ENERGY. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. Golden, Colorado. NREL/TP-510-42621. 2008. p. 1-6.

NATIONAL LABORATORY RENEWABLE ENERGY. Determination of insoluble solids in pretreated biomass material. Golden, Colorado. NREL/TP-510-42627. 2008.

NATIONAL LABORATORY RENEWABLE ENERGY. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. Golden, Colorado. NREL/TP-510-42623. 2008.

NATIONAL LABORATORY RENEWABLE ENERGY. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Golden, Colorado. NREL/TP-510-42618. 2012.

NATIONAL LABORATORY RENEWABLE ENERGY. Preparation of Samples for Compositional Analysis Technical Report. Golden, Colorado. NREL/TP-510-42620. 2008.

MANTILLA TORRES, M. J. Hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar y paja de trigo con una posterior fermentación alcohólica para obtención de etanol. Quito, Ecuador. Universidad central de Ecuador. 2012. no. p. 69.

SÁNCHEZ RIAÑO, A. M., GUTIERREZ MORALES, A. I., MUÑOZ HERNÁNDEZ, J. A. & RIVERA BARRERO, C. A. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. En: Tumbaga. 2010. vol. 5. no. p. 61-91.

SCHELL, D. J., FARMER, J., NEWMAN, M. & MCMILLAM, J. D. Applied Biochemistry and Biotechnology: Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot scale reactor. *In*: Humana press Inc. 2003. vol. 105. no. p. 70-85.

TOMÁS PEJÓ, M. E. Bioetanol de paja de trigo: Estrategias de integración de las etapas del proceso. Trabajo de grado Doctor en Microbiología. Departamento de microbiología. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2009. 135 p.

VIÑALS-VERDE, M., BELL-GARCÍA, A., MICHELENA-ÁLVAREZ, G. & RAMIL-MESA, M. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. En: ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Ciudad de La Habana, Cuba, enero-abril, 2012. vol. 46. no. p. 7-16.

WYMAN, C. E. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. En: BioEnergy Science Center. 1996.

ANEXOS

Anexo A. PROTOCOLO DE CARACTERIZACIÓN DE LICOR DE IMPREGNACIÓN, LICOR DE PRETRATAMIENTO

Laboratorio de Transformación de Biomasa

Escuela de Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

La biomasa utilizada para el pretratamiento contiene cantidades de carbohidratos que pueden ser aprovechados, que están constituidas por subunidades monoméricas como glucosa, xilosa, arabinosa, manosa y galactosa. En el proceso de impregnación una parte de los azúcares presentes son liberados en la fracción líquida. El NREL tiene un método analítico que permite cuantificar la cantidad de carbohidratos (monosacáridos y oligosacáridos) encontrándose suelto en la solución, de igual manera los azúcares monoméricos libres en la solución.

El licor obtenido es analizado por el HPLC (High Performance Liquid Chromatography), detectando los azúcares solubles presentes en la fracción líquida con detección de índice de refracción. Ahora si los azúcares presentes en la fracción líquida se encuentran en forma oligomérica, es necesario realizar una hidrólisis ácida que se transforman en cadenas monoméricas antes de ser analizados por el HPLC. Otros subproductos presentes que pueden ser degradados de los carbohidratos son los HFM y el Furfural, así como otros componentes de interés como ácidos orgánicos y polialcoholes.

El método analítico previo al análisis del presente proyecto permite estudiar los productos y subproductos.

La caracterización del licor llevada a cabo por la impregnación y por el licor pretratado, fue necesario seguir un procedimiento previo.

1. Toma de muestras:

1.1. Licor de impregnación.

Materiales

- ✓ 3 envase de 50 ml (recolectar el licor obtenido después de escurrir la biomasa)
- ✓ Colador
- ✓ Embudo
- ✓ Licor de la biomasa impregnada

1.1.1. Disponer y mezclar la solución obtenida al prensado manual de la biomasa impregnada y la solución residual que se obtiene en el tanque de mezclado.

1.1.2. Colar el licor obtenido de la impregnación en el embudo de Buchner. La cantidad de licor resultante después del prensado manual es de 50 ml de cada envase (solución total: 150ml).

1.1.3. Si el licor no se caracteriza inmediatamente se debe congelar.

1.2. Licor de pretratamiento.

Materiales

- ✓ 12 tubos falcón de 50 ml
- ✓ Biomasa pretratada
- ✓ Agua destilada (30 ml)
- ✓ Centrifuga y balanza

1.2.1. Se adiciona en los tubos falcón 6 gramos de biomasa pretratada, estos se hace por cuadruplicado.

1.2.2. Luego una cantidad de 30 ml el agua destilada para poder hacer la dilución y poder obtener el licor de la biomasa pretratada.

1.2.3. Después de hacer la dilución de la biomasa pretratada, este se lleva a una centrifuga para poder retirar el licor obtenido.

1.2.4. Luego de la centrifugación el licor resultante del mismo se transvasa a un nuevo falcón.

1.2.5. Si el licor no se caracteriza inmediatamente este se debe de congelar.

2. Separar los líquidos/ solidos (Filtración): confirmar que la solución se encuentre libre de sólidos.

Materiales

- ✓ Dos mangueras
- ✓ Papeles filtro

- ✓ Una bomba de vacío
- ✓ Un condensador
- ✓ Un soporte universal con pinzas
- ✓ Un Erlenmeyer de salida lateral
- ✓ Embudo de porcelana
- ✓ Agua destilada
- ✓ Frasco lavador

El proceso de caracterización del licor es importante realizar una filtración que permite separar sólidos presentes en el, con el fin de poder obtener los sólidos solubles presentes en el.

- 2.1. Se realiza el montaje como se muestra en la Figura X: Se conecta la bomba de vacío a la salida inferior del condensador y la salida superior del condensador con la salida lateral del Erlenmeyer. Luego de asegurarnos que estén bien conectadas las mangueras con la bomba, se debe acondicionar el embudo Buchner de porcelana en la parte superior del Erlenmeyer garantizando que los instrumentos formen un sello y creen el vacío.
- 2.2. El papel filtro se humedece con el fin de adherirlo al embudo Buchner, y así poder evitar que los sólidos pasen a través de las paredes.

- 2.3. Se homogeniza el licor que se pretende filtrar, y se agrega poco a poco (para poder purgar el Erlenmeyer) para que la solución no sobrepase el papel. El licor que se purga y se desecha.
- 2.4. Se filtra la cantidad de licor que se desea utilizar.
- 2.5. La solución de licor filtrada se debe adiciona a un recipiente previamente purgado.
- 2.6. El licor previamente filtrado si se utiliza al día siguiente se refrigera, de lo contrario debe ser congelada.

NOTA: Las muestras recolectadas no deben mantenerse almacenadas más de 15 días ya que pierden propiedades que varían y se pierde la fiabilidad de los resultados.

3. Toma y registro de pH para los licores filtrados.

Materiales

- ✓ pH- metro digital
- ✓ Agua destilada
- ✓ Vaso precipitado de 50 ml
- ✓ 3 Tubos falcón
- ✓ Solución para guardar el electrodo

- 3.1. Se realiza el respectivo montaje como se observa en la Figura X, asegurándose que las partes del pH-metro digital estén bien.
- 3.2. Luego de haber realizado el ítem 3.1, se procede a seguir las instrucciones encontradas en la base del pH-metro digital.
- 3.3. Se toman las muestras de licor a las cuales se les realizara caracterización. En tubos falcón de 50 ml se adiciona 20 ml de licor previamente filtrado y libre de sólidos, se introduce el electrodo dentro del tubo falcón para tomar la mediciones y se registran cuando el pH- metro digital estabilice el valor. Como se tomaron muestras por cuadruplicado a cada una se realiza el mismo procedimiento teniendo en cuenta la limpieza del electrodo con la solución de (HI 7061).

4. Preparación de estándares de azúcar (EA)

Materiales

- ✓ Balones aforados de 25 ml
- ✓ Pinzas
- ✓ Balanza electrónica
- ✓ Azucares estándares (glucosa, arabinosa y xilosa)
- ✓ Frasco lavador
- ✓ Ultrasonido

- 4.1. Se calculan las cantidades de Arabinosa, Glucosa y Xilosa correspondientes a los estándares (ERA) de la siguiente manera:
Azúcar requerido: $0,5 \text{ (g/L)} * V_b$
 V_b : volumen del balón aforado
- 4.2. Se pesan las cantidades de los estándares (ERA), en los balones aforados de 25 ml donde se registran los valores que registran la balanza electrónica.
- 4.3. Se agrega agua destilada hasta el aforo del balón, de tal forma que quede limpias el cuello y las paredes del balón hasta homogenizar.
- 4.4. Después de agregar agua destilada el balón aforado se coloca en el ultrasonido por 15 minutos.
- 4.5. Se toma una alícuota de 5 ml y disponerlo en un vial para ser analizado por HPLC.
- 4.6. Se toman 20 ml de la solución preparada por los estándares (ERA), para hidrolisis que se realiza en dos procesos en paralelo.

Proceso

1. Hidrolisis de los licores y estándares (ERA).

- 1.1. Toma de oligómeros y adición de ácido sulfúrico al 72%

Materiales

- ✓ Botellas de Mr Tea
- ✓ Pipeta
- ✓ Puntas de pipetas
- ✓ Plancha magnética

- ✓ Agitadores magnéticos
- ✓ Ácido sulfúrico al 72%
- ✓ Tubos falcón

En la etapa de las hidrolisis es necesario que la solución de licor tenga una concentración de 4%, es por eso que se le adiciona ácido sulfúrico al 72% y este depende de la cantidad de licor agregado.

Se miden 20 ml de licor pretratado e impregnado y se mide el pH previamente determinado en el paso 4, se lee el valor de la Tabla 1 y se dispone a adicionar a la cantidad de ácido de la siguiente manera:

Por ejemplo:

Se mide el pH este registra un valor de 1,14 y la muestra tomada es de 20 ml. Nos dirigimos a la Tabla 1 y leemos el valor en este caso sería 637 μ l.

Appendix 1

| Volume of 72% H2SO4 (in μ L) required to bring liquor acid concentration to 4% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------|-------|-------|---------------------|-------|-------|---------------------|-------|-------|---------------------|-------|-------|---------------------|-------|-------|---------------------|-------|-------|---------------------|-------|-------|---------------------|-------|-------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| pH | Vol. of liquor (ml) | | | Vol. of liquor (ml) | | | Vol. of liquor (ml) | | | Vol. of liquor (ml) | | | Vol. of liquor (ml) | | | Vol. of liquor (ml) | | | Vol. of liquor (ml) | | | Vol. of liquor (ml) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 5.00 | 10.00 | 20.00 | 5.00 | 10.00 | 20.00 | 5.00 | 10.00 | 20.00 | 5.00 | 10.00 | 20.00 | 5.00 | 10.00 | 20.00 | 5.00 | 10.00 | 20.00 | 5.00 | 10.00 | 20.00 | 5.00 | 10.00 | 20.00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.01 | .. | .. | .. | 0.50 | 108 | 217 | 433 | 1.0 | 163 | 307 | 614 | 1.50 | 168 | 336 | 671 | 2.0 | 172 | 344 | 689 | 2.50 | 174 | 347 | 694 | 3.0 | 174 | 348 | 696 | 3.50 | 174 | 348 | 697 | 4.0 | 174 | 349 | 697 | 4.50 | 174 | 349 | 697 |
| 0.02 | .. | .. | .. | 0.51 | 110 | 220 | 439 | 1.01 | 164 | 308 | 616 | 1.51 | 168 | 336 | 671 | 2.01 | 172 | 344 | 689 | 2.51 | 174 | 347 | 695 | 3.01 | 174 | 348 | 696 | 3.51 | 174 | 348 | 697 | 4.01 | 174 | 349 | 697 | 4.51 | 174 | 349 | 697 |
| 0.03 | .. | .. | .. | 0.52 | 111 | 223 | 445 | 1.02 | 164 | 309 | 617 | 1.52 | 168 | 336 | 672 | 2.02 | 172 | 345 | 689 | 2.52 | 174 | 347 | 695 | 3.02 | 174 | 348 | 696 | 3.52 | 174 | 348 | 697 | 4.02 | 174 | 349 | 697 | 4.52 | 174 | 349 | 697 |
| 0.04 | .. | .. | .. | 0.53 | 113 | 226 | 451 | 1.03 | 165 | 310 | 619 | 1.53 | 168 | 336 | 672 | 2.03 | 172 | 345 | 689 | 2.53 | 174 | 347 | 695 | 3.03 | 174 | 348 | 696 | 3.53 | 174 | 348 | 697 | 4.03 | 174 | 349 | 697 | 4.53 | 174 | 349 | 697 |
| 0.05 | .. | .. | .. | 0.54 | 114 | 228 | 457 | 1.04 | 165 | 311 | 621 | 1.54 | 168 | 337 | 673 | 2.04 | 172 | 345 | 689 | 2.54 | 174 | 347 | 695 | 3.04 | 174 | 348 | 696 | 3.54 | 174 | 348 | 697 | 4.04 | 174 | 349 | 697 | 4.54 | 174 | 349 | 697 |
| 0.06 | .. | .. | .. | 0.55 | 116 | 231 | 462 | 1.05 | 166 | 311 | 623 | 1.55 | 168 | 337 | 674 | 2.05 | 172 | 345 | 690 | 2.55 | 174 | 347 | 695 | 3.05 | 174 | 348 | 696 | 3.55 | 174 | 348 | 697 | 4.05 | 174 | 349 | 697 | 4.55 | 174 | 349 | 697 |
| 0.07 | .. | .. | .. | 0.56 | 117 | 234 | 467 | 1.06 | 166 | 312 | 624 | 1.56 | 169 | 337 | 674 | 2.06 | 172 | 345 | 690 | 2.56 | 174 | 347 | 695 | 3.06 | 174 | 348 | 696 | 3.56 | 174 | 348 | 697 | 4.06 | 174 | 349 | 697 | 4.56 | 174 | 349 | 697 |
| 0.08 | 1 | 2 | 4 | 0.57 | 118 | 236 | 473 | 1.07 | 167 | 313 | 626 | 1.57 | 169 | 337 | 675 | 2.07 | 173 | 345 | 690 | 2.57 | 174 | 347 | 695 | 3.07 | 174 | 348 | 696 | 3.57 | 174 | 348 | 697 | 4.07 | 174 | 349 | 697 | 4.57 | 174 | 349 | 697 |
| 0.09 | 5 | 10 | 19 | 0.58 | 119 | 239 | 478 | 1.08 | 167 | 314 | 628 | 1.58 | 169 | 338 | 675 | 2.08 | 173 | 345 | 690 | 2.58 | 174 | 347 | 695 | 3.08 | 174 | 348 | 696 | 3.58 | 174 | 348 | 697 | 4.08 | 174 | 349 | 697 | 4.58 | 174 | 349 | 697 |
| 0.10 | 9 | 17 | 35 | 0.60 | 122 | 244 | 488 | 1.10 | 168 | 315 | 631 | 1.60 | 169 | 338 | 676 | 2.10 | 173 | 345 | 690 | 2.60 | 174 | 347 | 695 | 3.10 | 174 | 348 | 696 | 3.60 | 174 | 348 | 697 | 4.10 | 174 | 349 | 697 | 4.60 | 174 | 349 | 697 |
| 0.11 | 12 | 25 | 50 | 0.61 | 123 | 246 | 492 | 1.11 | 168 | 316 | 632 | 1.61 | 169 | 338 | 677 | 2.11 | 173 | 345 | 691 | 2.61 | 174 | 347 | 695 | 3.11 | 174 | 348 | 696 | 3.61 | 174 | 348 | 697 | 4.11 | 174 | 349 | 697 | 4.61 | 174 | 349 | 697 |
| 0.12 | 16 | 32 | 65 | 0.62 | 124 | 249 | 497 | 1.12 | 168 | 317 | 634 | 1.62 | 169 | 339 | 677 | 2.12 | 173 | 345 | 691 | 2.62 | 174 | 347 | 695 | 3.12 | 174 | 348 | 696 | 3.62 | 174 | 348 | 697 | 4.12 | 174 | 349 | 697 | 4.62 | 174 | 349 | 697 |
| 0.13 | 20 | 39 | 79 | 0.63 | 125 | 251 | 502 | 1.13 | 169 | 318 | 635 | 1.63 | 169 | 339 | 678 | 2.13 | 173 | 345 | 691 | 2.63 | 174 | 347 | 695 | 3.13 | 174 | 348 | 696 | 3.63 | 174 | 348 | 697 | 4.13 | 174 | 349 | 697 | 4.63 | 174 | 349 | 697 |
| 0.14 | 23 | 47 | 93 | 0.64 | 127 | 253 | 506 | 1.14 | 169 | 318 | 637 | 1.64 | 169 | 339 | 678 | 2.14 | 173 | 345 | 691 | 2.64 | 174 | 347 | 695 | 3.14 | 174 | 348 | 696 | 3.64 | 174 | 348 | 697 | 4.14 | 174 | 349 | 697 | 4.64 | 174 | 349 | 697 |
| 0.15 | 27 | 53 | 107 | 0.65 | 128 | 255 | 510 | 1.15 | 169 | 319 | 638 | 1.65 | 170 | 339 | 678 | 2.15 | 173 | 345 | 691 | 2.65 | 174 | 347 | 695 | 3.15 | 174 | 348 | 696 | 3.65 | 174 | 348 | 697 | 4.15 | 174 | 349 | 697 | 4.65 | 174 | 349 | 697 |
| 0.16 | 30 | 60 | 120 | 0.66 | 129 | 257 | 515 | 1.16 | 169 | 320 | 639 | 1.66 | 170 | 339 | 679 | 2.16 | 173 | 346 | 691 | 2.66 | 174 | 347 | 695 | 3.16 | 174 | 348 | 696 | 3.66 | 174 | 348 | 697 | 4.16 | 174 | 349 | 697 | 4.66 | 174 | 349 | 697 |
| 0.17 | 33 | 67 | 133 | 0.67 | 130 | 259 | 519 | 1.17 | 169 | 320 | 641 | 1.67 | 170 | 340 | 679 | 2.17 | 173 | 346 | 691 | 2.67 | 174 | 347 | 695 | 3.17 | 174 | 348 | 696 | 3.67 | 174 | 348 | 697 | 4.17 | 174 | 349 | 697 | 4.67 | 174 | 349 | 697 |
| 0.18 | 37 | 73 | 146 | 0.68 | 131 | 261 | 523 | 1.18 | 169 | 321 | 642 | 1.68 | 170 | 340 | 680 | 2.18 | 173 | 346 | 692 | 2.68 | 174 | 347 | 695 | 3.18 | 174 | 348 | 696 | 3.68 | 174 | 348 | 697 | 4.18 | 174 | 349 | 697 | 4.68 | 174 | 349 | 697 |
| 0.19 | 40 | 79 | 159 | 0.69 | 132 | 263 | 527 | 1.19 | 169 | 322 | 643 | 1.69 | 170 | 340 | 680 | 2.19 | 173 | 346 | 692 | 2.69 | 174 | 347 | 695 | 3.19 | 174 | 348 | 696 | 3.69 | 174 | 348 | 697 | 4.19 | 174 | 349 | 697 | 4.69 | 174 | 349 | 697 |
| 0.20 | 43 | 86 | 171 | 0.70 | 133 | 265 | 531 | 1.20 | 169 | 322 | 644 | 1.70 | 170 | 340 | 680 | 2.20 | 173 | 346 | 692 | 2.70 | 174 | 347 | 695 | 3.20 | 174 | 348 | 696 | 3.70 | 174 | 348 | 697 | 4.20 | 174 | 349 | 697 | 4.70 | 174 | 349 | 697 |
| 0.21 | 46 | 91 | 183 | 0.71 | 134 | 267 | 535 | 1.21 | 169 | 323 | 646 | 1.71 | 170 | 340 | 681 | 2.21 | 173 | 346 | 692 | 2.71 | 174 | 347 | 695 | 3.21 | 174 | 348 | 696 | 3.71 | 174 | 348 | 697 | 4.21 | 174 | 349 | 697 | 4.71 | 174 | 349 | 697 |
| 0.22 | 49 | 97 | 195 | 0.72 | 135 | 269 | 538 | 1.22 | 169 | 323 | 647 | 1.72 | 170 | 341 | 681 | 2.22 | 173 | 346 | 692 | 2.72 | 174 | 347 | 695 | 3.22 | 174 | 348 | 696 | 3.72 | 174 | 348 | 697 | 4.22 | 174 | 349 | 697 | 4.72 | 174 | 349 | 697 |
| 0.23 | 52 | 103 | 206 | 0.73 | 135 | 271 | 542 | 1.23 | 169 | 324 | 648 | 1.73 | 170 | 341 | 682 | 2.23 | 173 | 346 | 692 | 2.73 | 174 | 347 | 695 | 3.23 | 174 | 348 | 696 | 3.73 | 174 | 348 | 697 | 4.23 | 174 | 349 | 697 | 4.73 | 174 | 349 | 697 |
| 0.24 | 54 | 109 | 217 | 0.74 | 136 | 273 | 545 | 1.24 | 169 | 325 | 649 | 1.74 | 170 | 341 | 682 | 2.24 | 173 | 346 | 692 | 2.74 | 174 | 347 | 695 | 3.24 | 174 | 348 | 696 | 3.74 | 174 | 348 | 697 | 4.24 | 174 | 349 | 697 | 4.74 | 174 | 349 | 697 |
| 0.25 | 57 | 114 | 228 | 0.75 | 137 | 274 | 548 | 1.25 | 169 | 325 | 650 | 1.75 | 171 | 341 | 682 | 2.25 | 173 | 346 | 692 | 2.75 | 174 | 347 | 695 | 3.25 | 174 | 348 | 696 | 3.75 | 174 | 348 | 697 | 4.25 | 174 | 349 | 697 | 4.75 | 174 | 349 | 697 |
| 0.26 | 60 | 119 | 239 | 0.76 | 138 | 276 | 552 | 1.26 | 169 | 326 | 651 | 1.76 | 171 | 341 | 683 | 2.26 | 173 | 346 | 693 | 2.76 | 174 | 347 | 695 | 3.26 | 174 | 348 | 696 | 3.76 | 174 | 348 | 697 | 4.26 | 174 | 349 | 697 | 4.76 | 174 | 349 | 697 |
| 0.27 | 62 | 125 | 249 | 0.77 | 139 | 278 | 556 | 1.27 | 169 | 326 | 652 | 1.77 | 171 | 341 | 683 | 2.27 | 173 | 346 | 693 | 2.77 | 174 | 347 | 695 | 3.27 | 174 | 348 | 696 | 3.77 | 174 | 348 | 697 | 4.27 | 174 | 349 | 697 | 4.77 | 174 | 349 | 697 |
| 0.28 | 65 | 130 | 260 | 0.78 | 140 | 279 | 559 | 1.28 | 169 | 327 | 653 | 1.78 | 171 | 342 | 683 | 2.28 | 173 | 346 | 693 | 2.78 | 174 | 347 | 695 | 3.28 | 174 | 348 | 696 | 3.78 | 174 | 348 | 697 | 4.28 | 174 | 349 | 697 | 4.78 | 174 | 349 | 697 |
| 0.29 | 67 | 135 | 269 | 0.79 | 140 | 281 | 562 | 1.29 | 169 | 327 | 654 | 1.79 | 171 | 342 | 684 | 2.29 | 173 | 346 | 693 | 2.79 | 174 | 347 | 695 | 3.29 | 174 | 348 | 696 | 3.79 | 174 | 348 | 697 | 4.29 | 174 | 349 | 697 | 4.79 | 174 | 349 | 697 |
| 0.30 | 70 | 140 | 279 | 0.80 | 141 | 282 | 565 | 1.30 | 169 | 328 | 655 | 1.80 | 171 | 342 | 684 | 2.30 | 173 | 346 | 693 | 2.80 | 174 | 347 | 695 | 3.30 | 174 | 348 | 696 | 3.80 | 174 | 348 | 697 | 4.30 | 174 | 349 | 697 | 4.80 | 174 | 349 | 697 |
| 0.31 | 72 | 144 | 289 | 0.81 | 142 | 284 | 568 | 1.31 | 169 | 328 | 656 | 1.81 | 171 | 342 | 684 | 2.31 | 173 | 347 | 693 | 2.81 | 174 | 347 | 695 | 3.31 | 174 | 348 | 696 | 3.81 | 174 | 348 | 697 | 4.31 | 174 | 349 | 697 | 4.81 | 174 | 349 | 697 |
| 0.32 | 75 | 149 | 299 | 0.82 | 143 | 285 | 571 | 1.32 | 169 | 329 | 657 | 1.82 | 171 | 342 | 684 | 2.32 | 173 | 347 | 693 | 2.82 | 174 | 347 | 695 | 3.32 | 174 | 348 | 696 | 3.82 | 174 | 348 | 697 | 4.32 | 174 | 349 | 697 | 4.82 | 174 | 349 | 697 |
| 0.33 | 77 | 154 | 307 | 0.83 | 143 | 287 | 574 | 1.33 | 169 | 329 | 658 | 1.83 | 171 | 342 | 685 | 2.33 | 173 | 347 | 693 | 2.83 | 174 | 347 | 695 | 3.33 | 174 | 348 | 696 | 3.83 | 174 | 348 | 697 | 4.33 | 174 | 349 | 697 | 4.83 | 174 | 349 | 697 |
| 0.34 | 79 | 158 | 316 | 0.84 | 144 | 288 | 577 | 1.34 | 169 | 329 | 659 | 1.84 | 171 | 343 | 685 | 2.34 | 173 | 347 | 693 | 2.84 | 174 | 347 | 695 | 3.34 | 174 | 348 | 696 | 3.84 | 174 | 348 | 697 | 4.34 | 174 | 349 | 697 | 4.84 | 174 | 349 | 697 |
| 0.35 | 81 | 162 | 325 | 0.85 | 145 | 290 | 579 | 1.35 | 169 | 330 | 660 | 1.85 | 171 | 343 | 685 | 2.35 | 173 | 347 | 693 | 2.85 | 174 | 347 | 695 | 3.35 | 174 | 348 | 696 | 3.85 | 174 | 348 | 697 | 4.35 | 174 | 349 | 697 | 4.85 | 174 | 349 | 697 |
| 0.36 | 83 | 167 | 333 | 0.86 | 145 | 291 | 582 | 1.36 | 169 | 330 | 661 | 1.86 | 171 | 343 | 686 | 2.36 | 173 | 347 | 693 | 2.86 | 174 | 347 | 695 | 3.36 | 174 | 348 | | | | | | | | | | | | | |

Donde:

V72% es el volumen de ácido a agregar al 72%, en mL

Vs es el volumen de la alícuota, en mL

C4% es la concentración de H₂SO₄ al 4%, 41.0 g/L

C72% es la concentración de H₂SO₄ al 72%, 1176.3 g/L

[H+] es la concentración de iones de hidrógeno, en moles/L

- 1.2. La muestra se transvasa a la botella de Mr Tea.
- 1.3. Se introduce el agitador magnético en la botella de Mr Tea.
- 1.4. Luego de haber realizado el paso 1.3, se coloca la botella de Mr Tea en la plancha magnética para homogenizar por 30 segundos.
- 1.5. Se mide adecuadamente el ácido al 72% con la ayuda de una pipeta, y se agrega de manera lentamente mientras se homogeniza.

2. Sellado de botellas.

Materiales

- ✓ Papel vinipel
- ✓ Botellas de Mr Tea

- 2.1. Para el sellado adecuado de las botellas se deben alistar el papel vinipel. Una de las cosas que se debe tener en cuenta es evitar que se rompa el papel transparente. Se envuelve y se ajusta la tapa de Mr Tea.

2.2. Se marca la botella de Mr Tea en la parte superior de la tapa de la siguiente manera:

LI: licor impregnado

LP: licor pretratado

2.3. Se marca el nivel de la solución.

3. Adecuación de muestras para hidrolisis de oligómeros.

Materiales

✓ Autoclave

✓ Agua potable

3.1. Se inspecciona que el contenido del agua en el autoclave se encuentre en el nivel superior a la rejilla.

3.2. Se enciende el autoclave una media hora antes de ingresar las botellas de Mr Tea.

3.3. Se ingresan las botellas de Mr Tea que se encuentran previamente selladas.

3.4. Tapamos la autoclave y nos cercioramos que se ajusten los sellos en pares, es decir, uno el opuesto del otro.

3.5. Una vez realizado el ítem 3.4, esperamos a que el autoclave suba la presión a 15 psi este valor es monitoreado por una perilla durante una hora.

4. Enfriamiento de botellas.

Materiales

- ✓ Cartones
- ✓ Autoclave
- ✓ Guantes térmicos
- ✓ Agua potable
- ✓ Toallas o telas

- 4.1. Por seguridad, es necesario que al momento de abrir el autoclave la presión marcada por el manómetro sea de 0 psi. Para esto se agrega agua por el exterior de la autoclave exprimiendo las toallas o telas que han sido previamente humedecidas.
- 4.2. Cuando ya se encuentra la presión en 0 abrimos la llave de alivio para terminar de despresurizar la autoclave. Previamente abierto el equipo sacamos las botellas Mr Tea.
- 4.3. Dejamos enfriar las botellas de Mr Tea por una hora.

5. Neutralización

Materiales

- ✓ Carbonato de Calcio
- ✓ Tubos falcón con tapa
- ✓ Papel indicador
- ✓ Espátula

- ✓ Varilla de agitación de vidrio
- ✓ Soporte para tubos
- ✓ Tijera

5.1. Se cortan los papeles indicadores en tiras.

5.2. Se transvasa el licor previamente frío a tubos falcón.

5.3. Se mide el pH con las tiras indicadoras de pH.

Se agrega Carbonato de Calcio hasta que llegue a un pH de 3 0 4. Esto se hace agregando cantidades pequeñas de Carbonato de Calcio y agitando con las varillas de vidrio.

5.4. Se centrifuga las muestras 2 veces para que el Carbonato de Calcio se precipite.

5.5. El sobrenadante se transvasa a otro tubo falcón, y se toma 2 ml una muestra con una jeringa.

5.6. Se pasa la alícuota tomada por la jeringa y se utiliza un filtro 0,2 μm , y se transvasa al vial.

5.7. La solución resultante se guarda en el congelador.

6. Rotulación de las muestras

Materiales

- ✓ Cinta
- ✓ Tijeras
- ✓ Papel

✓ Viales

✓ Muestras

6.1. Tener disponible los viales limpios para cada tubo falcón.

6.2. Se cortan pequeñas tiras de papel de tal forma que se puedan colocar en los viales.

6.3. Se describe la nomenclatura de cada muestra en el papel de la siguiente manera:

LP-O: licor de pretratamiento

LI-O: licor de impregnación

SRS para los estándares de recuperación de azúcares, por sus siglas en inglés.

2. Muestra para determinación de monómeros.

Materiales

✓ Tubos falcón

2.1. Se toman 20 ml de licor previamente filtrado y libre de sólidos presentes.

3. Neutralización.

Materiales

✓ Carbonato de Calcio

✓ Tubos falcón con tapa

✓ Papel indicador

- ✓ Espátula
- ✓ Varilla de agitación de vidrio
- ✓ Soporte para tubos
- ✓ Tijera

3.1. Repetir el inciso 5 del proceso 1.

4. Rotulación de viales.

Materiales

- ✓ Cinta
- ✓ Tijeras
- ✓ Papel
- ✓ Viales
- ✓ Muestras

- 4.1. Tener disponible los viales limpios para cada tubo falcón.
- 4.2. Se cortan pequeñas tiras de papel de tal forma que se puedan colocar en los viales.
- 4.3. Se describe la nomenclatura de cada muestra en el papel de la siguiente manera:

LP-M: licor de pretratamiento

LI-M: licor de impregnación

SRS para los estándares de recuperación de azúcares, por sus siglas en ingles.

5. Pasar muestras al HPLC.

- Preparación de fase móvil

Materiales

- ✓ Agua tipo 1
- ✓ Ácido sulfúrico
- ✓ 1 Pipeta y puntas
- ✓ Balón aforado de 1 L
- ✓ Ultrasonido

- 5.1. Disponer de balón aforado de 1 litro, limpio y purgado con agua tipo 1.
- 5.2. En un balón aforado se agrega agua tipo 1 y seguidamente se agrega 278 µl de ácido sulfúrico puro (de 95% de pureza) con una pipeta y se afora.
- 5.3. Después de haber aforado la fase móvil se pasa al ultrasonido para homogenizarla durante 15 minutos.
- 5.4. Transvasar la fase móvil previamente homogenizada al recipiente que se encuentran en el equipo de HPLC, rotulado como "5 mM de H₂SO₄".

Nota: La cantidad de solución preparada depende del flujo con el que se trabaje, teniendo en cuenta que el nivel de la solución nunca debe estar por

debajo del filtro contenido en el recipiente “5 mM de H₂SO₄”, con el fin de evitar que éste quede en contacto con el aire.

6. Encendido del equipo HPLC.

Materiales

✓ Equipo de HPLC

- 6.1. Encender el computador
- 6.2. Encender el estabilizador del equipo de HPLC.
- 6.3. Encender el equipo de HPLC en forma de “U”, empezando por la unidad DGU-20A3 y terminando en la unidad RID-10A.
- 6.4. Abrir el programa “LC Solution”, oprimir en “1Cpu” y dar clic en “Ok”.
- 6.5. Abrir la válvula “DRAIN”, poner un flujo de 1 mL/min y dar clic en “Instrument on/off”, teniendo en cuenta que la temperatura se encuentre a 25°C. Esperar 10 min y verificar que no haya burbujas en los capilares.
 - Para poner el flujo requerido, se procede a realizar los siguientes pasos:
 1. Dar clic en “Simple settings”
 2. Escribir el flujo deseado en el recuadro “Pumb”.
 3. Dar clic en “Download”.
- 6.6. Bajar el flujo a 0 mL/min y cerrar la válvula “DRAIN”.
- 6.7. Dar clic en “RID (Dector A) Flow on/off” para permitir que el flujo pase por la columna.

- 6.8. Subir el flujo a 0,1 mL/min y esperar 5 min. Registrar condiciones en la hoja de Excel (Tabla muestras HPLC).
- 6.9. Aumentar el flujo a 0,2 mL/min y la temperatura a 65°C y esperar una hora. Registrar condiciones en la hoja de Excel (Tabla muestras HPLC).
- 6.10. Aumentar el flujo de a 0,1 mL/min cada 15 min hasta llegar a un flujo de 0,6 mL/min. Registrar condiciones en la hoja de Excel (Tabla muestras HPLC).

7. Adecuación de las muestras en el equipo para su análisis

Materiales

- ✓ Equipo de HPLC
 - ✓ Viales con muestras a procesar
- 7.1. Modificar el tiempo final del proceso en consecuencia al análisis deseado en el módulo de control (ventana de Data Acquisition).
El tiempo de duración para cada sustancia son los siguientes:

Muestras con furfural: 50 min

Muestras para degradación de azúcares: 35 min

Muestra para regeneración de azúcares: 25 min

Muestras con ácidos: 25 min
 - 7.2. Dar clic en archivo, guardar método como y nombrar el método con la sustancia que necesita ese tiempo de duración.

- 7.3. Presionar la ventana Batch table en el módulo de control.
- 7.4. Agregar las filas necesarias en la columna "Vial". Una fila por cada vial a utilizar.
- 7.5. Colocar el nombre de las muestras en las columnas "Sample name" y en la columna "Sample ID". Ambas columnas pueden tener el mismo nombre para su respectivo vial.
- 7.6. Seleccionar "unknown" en la columna "Sample Type" y en la columna "Analysis type" seleccionar IT y QT, para todas las muestras.
- 7.7. Dar clic en la columna "Data file" y seleccionar la carpeta en donde se guardarán los resultados de la prueba.
- 7.8. Seleccionar en la columna "Method file" el archivo guardado en el punto 1, cada método de acuerdo al propósito del análisis.
- 7.9. Colocar 20 mL para todas las muestras en la columna "Injection volumen".
- 7.10. Colocar cero (0) en la columna "Level" para todas las muestras.
- 7.11. Seleccionar todas las muestras en la columna "Report Output".
- 7.12. Dar clic en la columna "Report format" y seleccionar en documentos>Hplc>Neila lel archivo "Report format".
- 7.13. Seleccionar todas las muestras en la columna "Autopurge".
- 7.14. Dejar sin seleccionar todas las muestras en la columna "Baseline".
- 7.15. Seleccionar "None" en la columna "Summary type" para todas las muestras.

- 7.16. Seleccionar el archivo "Report format" en la columna "Summary report".
- 7.17. Abrir la sección en donde van las muestras (Cabina inferior al panel de flujo y presión) y retirar la bandeja para las muestras. La bandeja está marcada como "1L".
- 7.18. Colocar los viales en la bandeja en concordancia con el número que está en la columna "vials" en el computador. Colocar nuevamente la bandeja dentro del equipo.
- 7.19. Dar clic en la flecha de play (color verde) del programa.