

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO COMBINADO
TERMOQUIMICO-MECÁNICO CON ACIDO SULFURICO DILUIDO Y MOLINO
DE DISCOS A PARTIR DE BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR PARA LA
PRODUCCION DE ETANOL**

**ASTRID SUDDEY AFRICANO MEJIA
YISSETH MARIOTTE SÁNCHEZ OJEDA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO COMBINADO
TERMOQUIMICO-MECÁNICO CON ACIDO SULFURICO DILUIDO Y MOLINO
DE DISCOS A PARTIR DE BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR PARA LA
PRODUCCION DE ETANOL**

**ASTRID SUDDEY AFRICANO MEJIA
YISSETH MARIOTTE SÁNCHEZ OJEDA**

Trabajo de Grado para optar al Título de Ingeniero Químico

Director:

Dr. VIATCHESLAV KAFAROV

Codirector:

Ing. NEILA MILENA MANTILLA BARBOSA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

AGRADECIMIENTOS

A Dios...

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

Agradecemos al Dr. Viatcheslav Kafarov por su apoyo, confianza, orientación y por su gestión para hacer posible el desarrollo de esta investigación.

A la Ing. Neila Mantilla Barbosa por su orientación, conocimiento, colaboración y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

Al técnico del Laboratorio especializados de la escuela de Ingeniería química, Guillermo Acero por su orientación, paciencia y colaboración incondicional con los equipos.

A los técnicos del laboratorio de operaciones unitarias de la escuela de Ingeniería química, Eduardo Carreño y Wilson Carreño por su orientación, paciencia y colaboración incondicional con los equipos.

Al equipo de trabajo del Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía –CIDES por su trabajo y colaboración.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN	16
1.1 ¿QUE ES EL PRETRATAMIENTO?	16
1.2 TECNOLOGÍAS DE PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA:	17
1.2.1 Pretratamiento con Ácido diluido	17
1.2.2 Pretratamiento termo-mecánico combinado	17
1.3 HIDROLISIS ENZIMATICA	19
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	20
2.1 MATERIA PRIMA.....	20
2.1.1 Preparación del bagazo de caña de azúcar.....	22
2.1.2 Caracterización Química del bagazo de caña de azúcar	22
2.2 PRETRATAMIENTO TERMOQUÍMICO Y MECÁNICO CON ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO.....	23
2.2.1 Diseño experimental de los pre-tratamientos.....	23
2.2.2 Procedimiento experimental del pretratamiento.....	23
2.2.3. Caracterización biomasa con Pretratamiento.	24
2.3 HIDROLISIS ENZIMÁTICA.....	24
2.4 MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO	27
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	28
3.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR	28
3.2 PRETRATAMIENTO	29
3.2.1 Caracterización del bagazo de caña con pretratamiento	31
3.3 HIDROLISIS ENZIMATICA	32

3.3.1. Concentración de ácido sulfúrico vs % de sólidos	34
3.3.3 Concentración ácido sulfúrico vs Velocidad del tornillo	35
3.3.4. Determinación de los efectos principales e interacción de las variables.....	36
3.3.4.1 Análisis de Glucano.	36
3.3.4.2 Análisis de Xilano.....	37
3.3.5. Pretratamiento Termoquímico.....	38
3.3.5.1 Pretratamiento termoquímico comparado con el pretratamiento termoquímico-mecánico.....	38
3.4. MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM).	39
4. CONCLUSIONES	41
5. RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	49
ANEXOS.....	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de bloques de la metodología experimental.....	21
Figura 2. Diagrama del proceso experimental para 10 % (p/p) de sólidos en el reactor.....	25
Figura 3. Diagrama del proceso experimental para 25 % (p/p) de sólidos en el reactor.....	26
Figura 4. Porcentaje de Solubilización en Pretratamiento Termoquímico.....	30
Figura 5. Bagazo con pretratamiento en diferentes condiciones de operación del pretratamiento termoquímico-mecánico.....	32
Figura 6. Curva de nivel. a) % de conversión de glucano b) % de conversión de xilano.	34
Figura 7. Curva de nivel. a) % de conversión de glucano b) % de conversión de xilano	35
Figura 8. Curva de nivel. a) % de conversión de glucano b) % de conversión de xilano.	35
Figura 9. Diagrama de Pareto para la conversión de Glucano	36
Figura 10. Diagrama de Pareto para la conversión de Xilano.....	37
Figura 11. Perfil de % conversión hidrolisis enzimática corrida 1: H ₂ SO ₄ 1% p/p- Autoclave 1 h 120°C - molino discos 80 rpm 10 % p/p	38
Figura 12. Imágenes de bagazo de caña sometida a diferentes pretratamientos..	39

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental pretratamiento termoquímico-mecánico	23
Tabla 2. Diseño experimental pretratamiento termoquímico.....	23
Tabla 3. Caracterización del bagazo de caña de azúcar	28
Tabla 4. Caracterización de la biomasa obtenida en los tratamientos previos bajo diferentes condiciones.	31
Tabla 5. Matriz del diseño presentando rendimientos de glucano y xilano después de la hidrólisis del bagazo con pretratamiento termoquímico-mecánico.	33

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. DESCRIPCIÓN DE DIFERENTES ALTERNATIVAS DE PRETRATAMIENTO.....	55
ANEXO B. REDUCCIÓN DE MUESTRAS POR EL MÉTODO DE CUARTEO	60
ANEXO C. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR	61
ANEXO D. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	67
ANEXO E .DETERMINACION DE PROTEINA EN LA ENZIMA	70
ANEXO F. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE PORCENTAJE DE CONVERSIÓN HIDROLISIS ENZIMÁTICA PARA EL PRETRATAMIENTO COMBINADO TERMOQUIMICO-MECANICO, PRETRATAMIENTO TERMOQUÍMICO Y MUESTRAS SIN PRETRATAMIENTO.	71
ANEXO G. IMÁGENES TOMADAS POR MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRONICO	76
ANEXO H. TERMINOLOGIA Y ECUACIONES	78

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO COMBINADO TERMOQUIMICO-MECÁNICO CON ACIDO SULFURICO DILUIDO Y MOLINO DE DISCOS A PARTIR DE BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR PARA LA PRODUCCION DE ETANOL.

AUTORES: AFRICANO MEJIA ASTRID SUDDEY Y SÁNCHEZ OJEDA YISSETH MARIOTTE **

PALABRAS CLAVES: bagazo de caña de azúcar, pretratamiento termoquímico, pretratamiento termoquímico-mecánico, hidrolisis enzimática, Glucano, Xilano.

DESCRIPCIÓN:

El proceso de pretratamiento del bagazo de caña fue estudiado efectuando una comparación entre el pretratamiento termoquímico con un planteamiento factorial 2^2 utilizando concentración de ácido sulfúrico (0,5 - 1 %p/p) y porcentaje de sólidos (10 - 25 %p/p) como variables del proceso, y el pretratamiento combinado termoquímico-mecánico con un planteamiento factorial 2^3 utilizando concentración de ácido sulfúrico (0,5 - 1 %p/p), porcentaje de Sólidos (10 - 25 %p/p) y velocidad de tornillo (80 - 160 rpm) en el molino de discos a escala laboratorio. El desempeño del proceso fue medido mediante la cuantificación de la producción de Glucano y Xilano después de la hidrolisis enzimática, la determinación de glucosa y xilosa se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Los resultados demostraron que los factores analizados afectan significativamente la glucosa y xilosa producida. La mayor conversión de Glucano 53,5% (g de glucano hidrolizados/g de glucano en biomasa con ppto) se obtuvo con el pretratamiento termoquímico-mecánico (H₂SO₄ 1% p/p - Autoclave 1 h 120°C - molino discos 80 rpm 10 % p/p), comparado con un 29,03 % (g de glucano hidrolizados/g de glucano en biomasa con ppto) convertido con el pretratamiento termoquímico. El pretratamiento termoquímico-mecánico incrementó la conversión de Glucano aproximadamente en un 24% en peso comparado con el pretratamiento termoquímico. La solubilización de la biomasa (cambio en la composición química) se debe principalmente al pretratamiento termoquímico, el principal azúcar solubilizado en este pretratamiento es la xilosa, y debido a la baja severidad utilizada (0,5-1% H₂SO₄, 121°C, 1 hora) no se degrada a inhibidores.

* Proyecto de Grado

** Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Dr. Viatcheslav Kafarov. Codirectores. Ing Química. Neila Milena Mantilla Barbosa.

ABSTRACT

TITLE: COMBINED THERMOCHEMICAL AND MECHANICAL PRETREATMENT WITH DILUTED SULFURIC ACID TO IMPROVE THE YIELDS IN ENZYMATIC HYDROLYSIS USING SUGARCANE BAGASSE*

AUTHORS: AFRICANO MEJIA ASTRID SUDDEY Y SÁNCHEZ OJEDA YISSETH MARIOTTE **

KEY WORDS: sugarcane bagasse, thermochemical pretreatment, thermochemical - mechanical pretreatment, enzymatic hydrolysis, glucose, xylose.

DESCRIPTION:

In the current investigation, the effect of the combined thermochemical and thermochemical-mechanical pretreatments was studied using sugarcane bagasse with the aim to improve the production of glucose and xylose in the enzymatic hydrolysis. The analysis was performed with a factorial 2^3 . The biomass was pretreated with diluted sulfuric acid 0.5 and 1 % (w / w) , Solids percentage (10 to 25 % w/w) and screw speed (80 to 160 rpm) in a laboratory disc mill like mechanical pretreatment . The determination of glucose and xylose was conducted by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the analyzed factors significantly affect glucose and xylose produced. The highest conversion of glucan 53,4% was obtained with the thermochemical-mechanical pretreatment (H₂SO₄ 1% w / w 1h - Autoclave 120 ° C - 80 rpm disc mill-10% w / w solids) compared with 29,03% converted with thermochemical pretreatment. Generally, the thermochemical-mechanical pretreatment increased the glucan conversion in 24% compared with thermochemical to low severity.

* Thesis

** Physicochemical Engineering Department. Chemical Engineering School. Director: Dr. Viatcheslav Kafarov. Codirectores. Engineering Chemistry Neila Milena Mantilla Barbosa.

INTRODUCCIÓN

Una de las alternativas para abastecer la necesidad energética es la producción de biocombustibles de segunda generación. El etanol celulósico se destaca como una importante fuente de energía [3]. En Colombia la materia prima potencial es el bagazo de caña gracias a que tiene alto contenido de celulosa 40-50%, hemicelulosa del 30-35% (Base seca), viene procesado de las moliendas y es de bajo costo [4] [5] [6] . La industria azucarera colombiana está ubicada en el valle geográfico del río Cauca, el cultivo de la caña de azúcar ocupa cerca de 200 mil hectáreas, la producción de la caña de azúcar alcanza 108.8 toneladas de caña por hectárea (TCH). En Colombia los ingenios al año tienen una producción de 6 millones de toneladas de bagazo. Siendo la materia prima con mayor disponibilidad en Colombia, un 85% es utilizado como combustible en las calderas de los mismos ingenios y el 15% restante se convierte en materia prima para la industria local productora [7] [8]. Otra estrategia de innovación que se está implementando como valor agregado en el sector azucarero colombiano ha sido la producción de etanol a partir del bagazo, a la expectativa de que sea de mayor rentabilidad.

Para la producción de etanol de segunda generación la biomasa debe tener un pretratamiento, que es crucial para mejorar la digestibilidad enzimática de la biomasa, se prevé que sea uno de los pasos del proceso más caros y por lo tanto un obstáculo considerable en la producción de etanol. El objetivo del pretratamiento es romper la capa de la lignina, fraccionar la estructura cristalina de la celulosa, y de esta manera obtener un mayor rendimiento de etanol.

Un pretratamiento eficaz debería romper la estructura cristalina de la celulosa durante la etapa de la hidrólisis, mejorando y aumentando la accesibilidad de enzimas, tener la menor producción de inhibidores y ser rentable [9] [10] [11] [12].

Algunos ejemplos de pretratamientos son físicos, químicos, físico- químicos y biológicos. Algunas de las ventajas del pretratamiento químico especialmente con ácido es que permite cambiar la estructura de la lignocelulosa, aumenta el área superficial y la porosidad de la biomasa; modifica y elimina la lignina, polimeriza parcialmente y elimina la hemicelulosa, reduce 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 [13] [14] [15] [16] [17]. Una de las ventajas del pretratamiento con molino de discos (pretratamiento mecánico) es que es amigable con el medio ambiente pero es un proceso intensivo de energía, tiene que ser utilizado en combinación con otros métodos de tratamiento para ahorrar energía y reducir los costos [18] [19].

Con el propósito de evaluar un pre-tratamiento en el cual se trabajen menos temperatura, para disminuir la producción de inhibidores, corrosión y costos, pero que a su vez no disminuyan los rendimientos, se evaluó un pretratamiento combinado en el bagazo de caña de azúcar. Se realizó una impregnación con ácido sulfúrico y se utilizó un autoclave como pre-tratamiento termoquímico y un molino de discos como pretratamiento mecánico con el fin de hidrolizar parte de la hemicelulosa y reducir el tamaño de partícula para disponer las fibras de la celulosa a la degradación enzimática, dando así como resultado un procedimiento de pre-tratamiento combinado termoquímico-mecánico.

Este estudio se centra principalmente en investigar el efecto de las variables de operación tales como: concentración de ácido sulfúrico (0,5 y 1) %p/p, porcentaje de Sólidos (10 y 25) %p/p y velocidad de tornillo (80 y 160) rpm en el molino de discos a escala laboratorio, las cuales fueron evaluadas en cuanto a los rendimientos totales de azúcares fermentables obtenidos del pretratamiento e hidrólisis enzimática.

1. ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 ¿QUE ES EL PRETRATAMIENTO?

El residuo fibroso de la caña de azúcar después de la molienda y la extracción de su jugo, conocido como 'bagazo', es uno de los mayores residuos de agricultura en el mundo, se compone principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosa [20] [21]. Entre estos componentes, la celulosa y la hemicelulosa tienen que ser hidrolizados, por medio de ácidos o enzimas, en azúcares fermentables para su conversión a etanol. La estructura cristalina de la celulosa dificulta la hidrólisis, y el complejo lignina-celulosa-hemicelulosa asociado forma una barrera física que impide el acceso al proceso microbiológico [22]. Debido a estas características estructurales, el tratamiento previo es un paso esencial para la obtención de azúcares fermentables potencialmente en la etapa de hidrólisis. El objetivo del pretratamiento es romper la estructura de la lignina y romper la estructura cristalina de la celulosa e incrementar el área superficial para así hacer a la celulosa más accesible a las enzimas [9].

El pretratamiento de la biomasa representa uno de los principales costos económicos en el proceso de la producción de etanol. Investigaciones actuales se centran en la identificación, evaluación, desarrollo y demostración de enfoques prometedores que apoyan principalmente la hidrólisis enzimática de la biomasa tratada con dosis de enzimas más bajas y tiempos más cortos de bioconversión [10].

Un pretratamiento efectivo en términos económicos y de rendimiento debe reunir características como: a) producir fibras celulósicas reactivas al ataque enzimático, b) evitar la degradación de la celulosa y la hemicelulosa, c) evitar la formación de posibles inhibidores de enzimas hidrolíticas y microorganismos de fermentación, d)

minimizar la demanda de energía, e) reducir el costo por reducción de tamaños de la materia prima, f) reducir el costo de materiales de construcción para reactores de pretratamiento, g) producir menos residuos y h) el consumo de poco o ningún químico o el uso de un producto químico económico [23].

1.2 TECNOLOGÍAS DE PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA:

Varios métodos se han introducido para el tratamiento previo de materiales lignocelulósicos antes de la hidrólisis o digestión enzimática. Se pueden clasificar en pretratamientos biológicos, físicos, químicos y físico-químicos, de acuerdo con las diferentes fuerzas o energías que se consumen en el proceso de pretratamiento. También se ha estudiado la combinación de estos métodos. [23] [24] [25]. Los métodos de pretratamiento de materiales lignocelulósicos se resumen en el anexo A.

1.2.1 Pretratamiento con Ácido diluido: Es uno de los métodos de pretratamiento químicos más empleados. Se puede realizar con ácido concentrado o diluido pero la utilización de ácido concentrado es menos favorable para la producción de etanol debido a la formación de compuestos inhibidores [10]. Estudios realizados demuestran que el tratamiento con ácido diluido (1-5%) se puede realizar a altas temperaturas (170-190°C) durante un corto período de tiempo; o a temperaturas inferiores (120 °C) durante un tiempo de retención más largo (30-90 min) [26].

1.2.2 Pretratamiento termo-mecánico combinado: El pretratamiento mecánico se puede utilizar para aumentar el rendimiento de los azúcares a partir de la biomasa lignocelulósica a través de la sacarificación enzimática. Sin embargo, también es un proceso intensivo de energía por lo que puede ser utilizado en

combinación con otros métodos de tratamiento para ahorrar energía y reducir los costos [27].

El objetivo del pretratamiento mecánico es reducir el tamaño de partícula y la cristalinidad principalmente de la celulosa, disminuir el grado de polimerización (DP), y aumentar el área de superficie específica de la biomasa celulósica, lo que la hace más susceptible al ataque enzimático. La energía térmica proporcionada hace que la hemicelulosa y la lignina se solubilicen. El pretratamiento térmico a bajas temperaturas puede aumentar el índice de cristalinidad de la celulosa hasta cierto punto [28].

La combinación de pretratamiento mecánico con tratamiento químico también puede mejorar los resultados. Un pretratamiento en un medio ácido diluido a baja temperatura puede llegar a la estructura de la pared por hidrólisis de ciertos componentes, especialmente de la hemicelulosa, de modo que la hemicelulosa solubilizada (oligómeros) se puede someter a reacciones hidrolíticas que producen monómeros [29].

Investigaciones actuales utilizan el método de extrusión como pretratamiento mecánico, [29] [30] [31] la cual tiene muchas ventajas. Las fuerzas de cizallamiento aplicadas exponen continuamente el interior de la biomasa a la acción química y / o térmica, mejorando así la tasa global de descristalización de la celulosa. Solo unas pocas investigaciones han estudiado el efecto del molino de discos como pretratamiento mecánico. (Miura, 2012) [18] informó que el tratamiento hidrotermal del cedro japonés debilita la estructura supramolecular de la pared celular por eliminación parcial de la hemicelulosa y lignina, creando espacios entre las micro fibrillas de celulosa la cual facilita la fibrilación por molino de discos aumentando el área de superficie.

1.3 HIDROLISIS ENZIMATICA

La hidrólisis enzimática de la celulosa se lleva a cabo por enzimas de celulasa que son altamente específicas. Los productos de la hidrólisis son generalmente azúcares reductores incluyendo la glucosa. El costo de la hidrólisis enzimática es baja en comparación a la hidrólisis ácida o alcalina, porque la hidrólisis enzimática generalmente se lleva a cabo en condiciones suaves (pH 4,8 y temperatura de 45-50 ° C) y no tiene problemas de corrosión. Las celulasas son generalmente una mezcla de varias enzimas. Existen en la actualidad varios preparados enzimáticos comerciales que principalmente contienen actividad celulítica (endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasa, β -1,4-glucosidasa) las cuales actúan en forma sinérgica en el proceso de degradación de la celulosa. [32]

Los factores que afectan a la hidrólisis enzimática de la celulosa incluyen sustratos, actividad de la celulasa, y condiciones de reacción (temperatura, pH, así como otros parámetros).

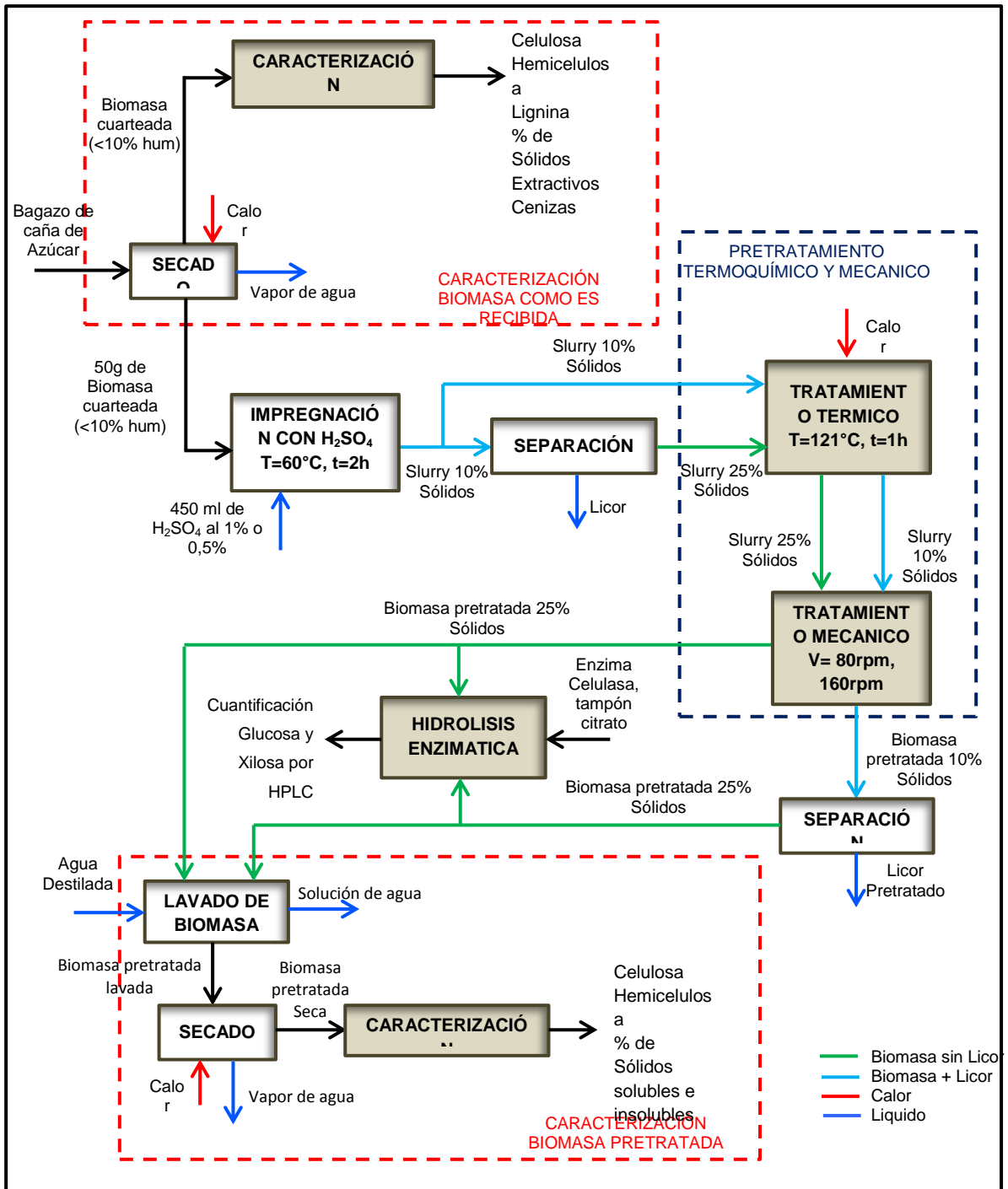
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental comprende cuatro etapas principales: pretratamiento termoquímico-mecánico del bagazo de caña, caracterización biomasa pretratada y sin pretratar, hidrolisis enzimática y determinación de azúcares en el hidrolizado. La figura 1 describe en forma general las etapas que se siguieron durante todo el proceso.

2.1 MATERIA PRIMA

Como materia prima se utilizó bagazo de caña de azúcar suministrada por el Laboratorio de Investigación en Combustibles y Energía (LICE) del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. La biomasa no fue sometida a reducción de tamaño de partícula antes del proceso de pretratamiento.

Figura 1. Diagrama de bloques de la metodología experimental



2.1.1 Preparación del bagazo de caña de azúcar: El bagazo se secó al aire libre hasta un 8-10% de contenido de humedad con el fin de prevenir la degradación de las fibras por la acción de microorganismos. Debido a la naturaleza heterogénea y fibrosa del bagazo de caña de azúcar (agregados gruesos y finos) se homogenizó en diferentes lotes de aproximadamente 100 g cada uno utilizando el Método B de cuarteo de la Norma Técnica Colombiana NTC 3674 [33] como se describe en el anexo B y posteriormente fue almacenado en bolsas herméticamente cerradas.

2.1.2 Caracterización Química del bagazo de caña de azúcar. La caracterización del bagazo de caña de azúcar en estado natural y con pretratamiento se llevó a cabo siguiendo procedimientos analíticos normalizados desarrollados por el 'Laboratorio Nacional de Energía Renovable de Estados Unidos' NREL por sus siglas en inglés.

El bagazo de caña empleado en el pretratamiento fue previamente caracterizado, se preparó adecuadamente la muestra con el objetivo de minimizar las interferencias en el análisis composicional: secado de la muestra, reducción de tamaño de partícula y tamizado (NREL/TP-510-4262) [34]. Se calculó el porcentaje de sólidos totales (NREL/TP-510-4262) [35] con el fin de estandarizar el reporte de resultados con base en el peso seco de biomasa, sustancias extraíbles en agua y alcohol etílico (NREL/TP-510-42619) [36], carbohidratos estructurales: glucanos, xilanos y arabanos, grupos acetilos (NREL/TP-510-42618) [37], lignina soluble e insoluble en ácido (NREL/TP 510-42618) [37] y cenizas (NREL/TP 510-42622) [38]. Ver Anexo C.

La determinación de carbohidratos se cuantificó mediante Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), usando una columna Aminex HPX87H (BIO-RAD) y las siguientes condiciones: eluyente H₂SO₄ 5mM, 0,6ml/min, 65°C y detectores de índice de refracción y arreglo de diodos. Ver Anexo D.

2.2 PRETRATAMIENTO TERMOQUÍMICO Y MECÁNICO CON ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO

2.2.1 Diseño experimental de los pre-tratamientos. Para el estudio del pretratamiento Termoquímico-Mecánico con ácido sulfúrico diluido se realizó un diseño factorial 2^3 : Concentración de ácido sulfúrico (0,5 y 1 %p/p), Velocidad del tornillo (80 y 160 rpm) y % de sólidos en el reactor (10 y 25 %p/p), dando así 16 corridas con replica y un factorial 2^2 con pretratamiento termoquímico (Tabla 2): Concentración de ácido sulfúrico (0,5 y 1 %p/p) y porcentaje de sólidos en el reactor (10 y 25 %p/p) con replica para un total de 8 corridas.

Tabla 1. Diseño experimental pretratamiento termoquímico-mecánico

Prueba	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentración ácido sulfúrico (%p/p)	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5
Velocidad Tornillo (rpm)	80	80	80	80	160	160	160	160
Concentración Sólidos (%p/p)	10	10	25	25	10	10	25	25

Tabla 2. Diseño experimental pretratamiento termoquímico

Prueba	1	2	3	4
Concentración ácido sulfúrico (%p/p)	1	0,5	1	0,5
Concentración Sólidos (%p/p)	10	10	25	25

2.2.2 Procedimiento experimental del pretratamiento. Inicialmente se pesaron 50 gr de biomasa en base húmeda, homogenizada y cuarteada hasta el tamaño requerido, se impregnaron con 450 ml de solución ácida a una concentración predeterminada por el planeamiento. La impregnación se realizó en un baño termostático a una temperatura de 60°C durante 2 h con agitación cada 15 min. Finalizado este tiempo se prosiguió a la adecuación de humedad según la carga de porcentaje de sólidos en el reactor (autoclave). El procedimiento para la

adecuación de la humedad a 10 %p/p de sólidos y 25 %p/p de sólidos se presenta en la figura 2 y en la figura 3 respectivamente. Cada muestra se sometió a un pretratamiento termoquímico en donde se utilizó como reactor una autoclave a 121 ° C y seguidamente a un pretratamiento mecánico utilizando un molino de discos a escala laboratorio. La biomasa pretrada libre de licor fue almacenada a -20 °C en bolsas herméticamente selladas e identificadas estando así listas para la etapa de hidrólisis enzimática y posteriores análisis.

2.2.3. Caracterización biomasa con Pretratamiento. Para cada diseño experimental se determinó el contenido de sólidos solubles e insolubles (NREL/TP-510-42621) [39] y carbohidratos estructurales (NREL/TP-510-42618) [37] según el procedimiento NREL. Los sólidos fueron lavados con agua destilada hasta PH neutro y secados a 105 °C durante 12 h y posteriormente caracterizados. La fracción líquida también fue caracterizada determinando el contenido de monosacáridos por HPLC. Las muestras analizadas fueron aquellas que no se sometieron al pretratamiento mecánico.

2.3 HIDROLISIS ENZIMÁTICA

Para la verificación de cuál fue el mejor pretratamiento y que parámetro estudiado interfiere en el pretratamiento, fueron realizadas hidrólisis para cada una de las muestras según la norma Sacarificación enzimática de biomasa lignocelulósica de NREL No. NREL/TP-510-42629 [40], muestras de 0,3 g de sólidos insolubles de bagazo pretratado fueron agregados a 13 ml de tampón citrato de sodio 0,1 M con PH adecuado a 4.8, las pruebas se realizaron en tubos de vidrio de 15 ml y fueron incubadas en un shaker durante 160 horas a 50°C y 100 rpm. Se utilizó la enzima comercial Multifect® celulasa con actividad enzimática conocida.

Figura 2. Diagrama del proceso experimental para 10 % (p/p) de sólidos en el reactor.

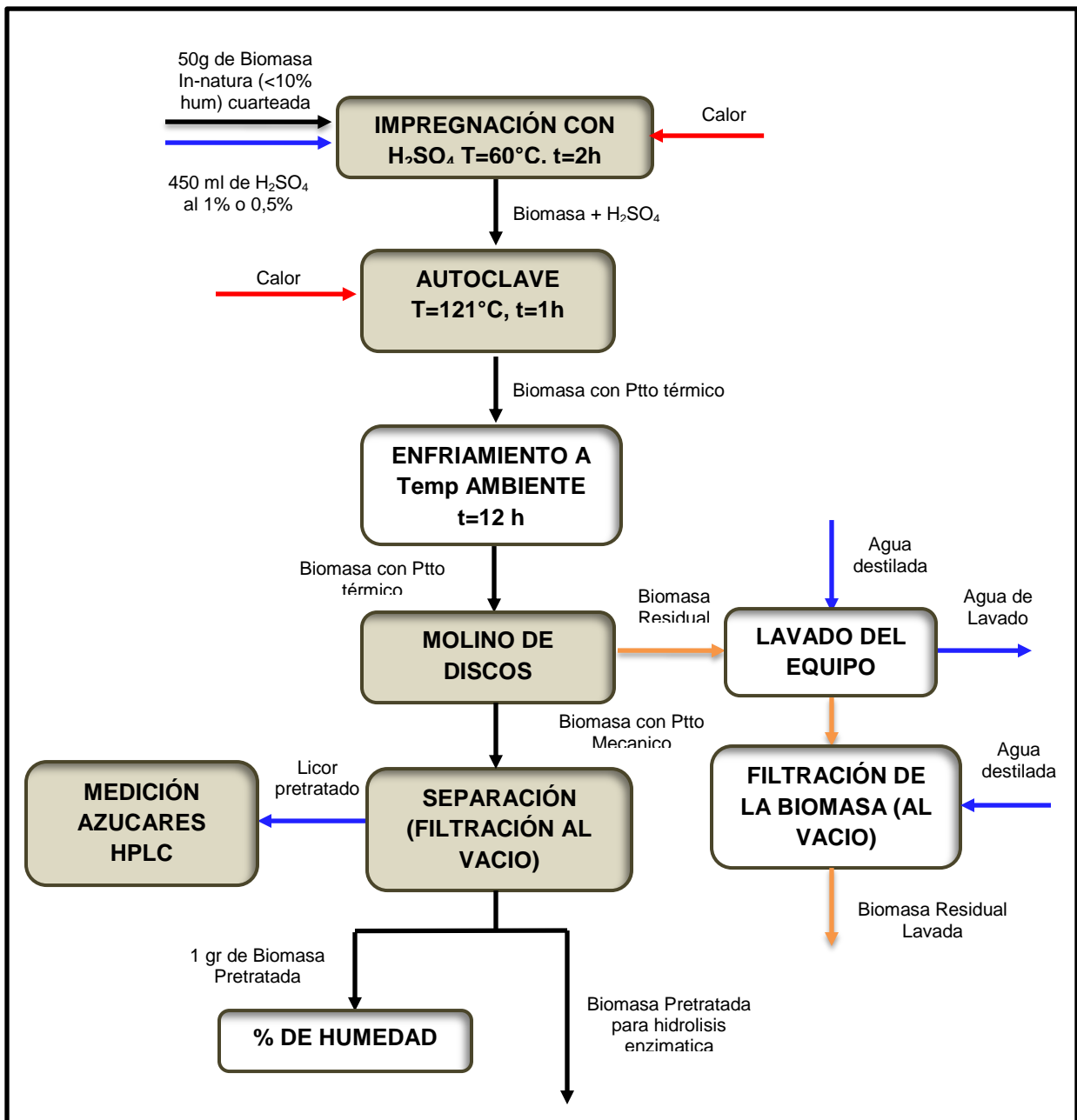
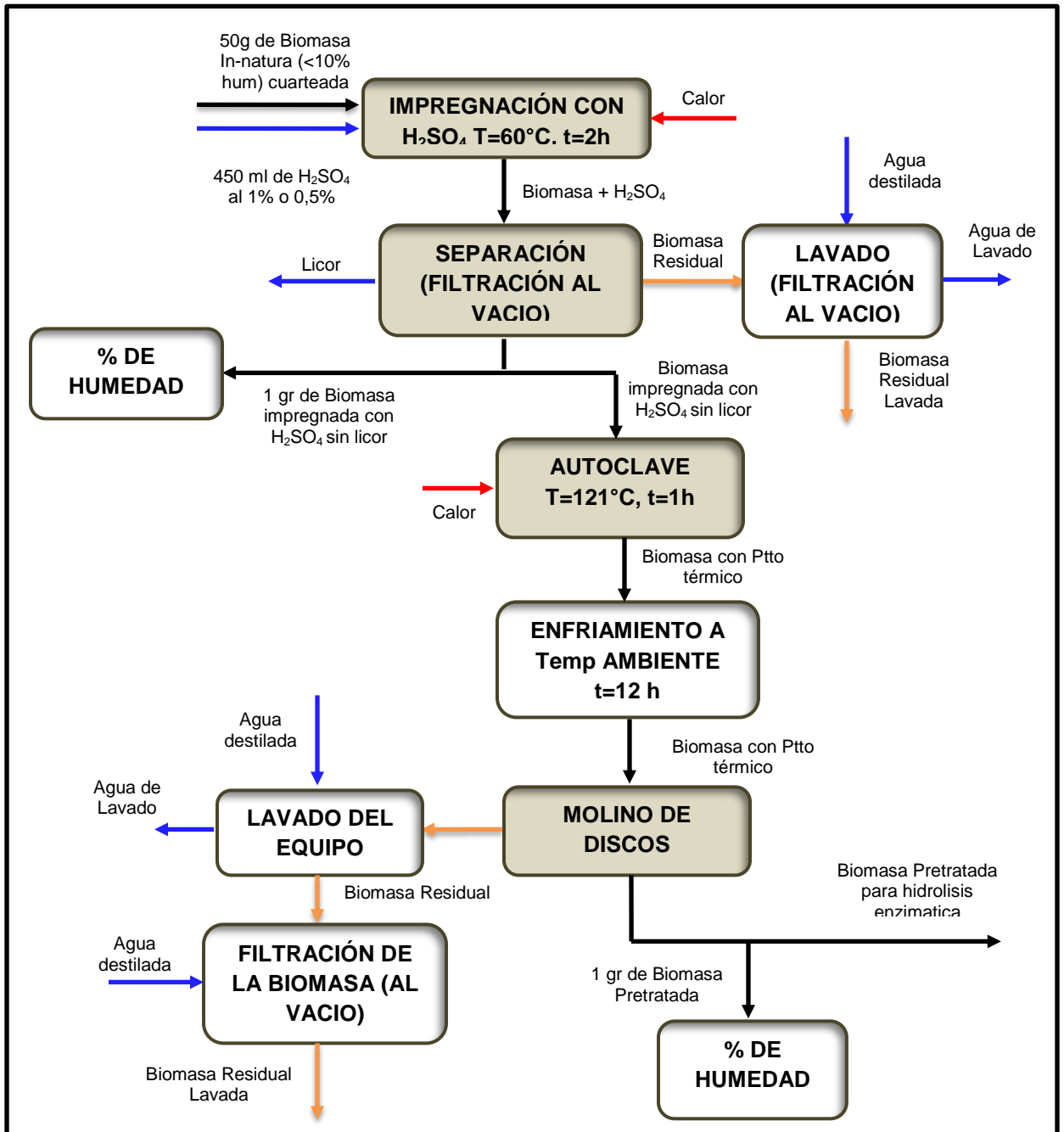


Figura 3. Diagrama del proceso experimental para 25 % (p/p) de sólidos en el reactor



Alícuotas de 1 ml de hidrolizado fueron tomadas en tiempos de 0 horas, 72 y 160 horas y luego hervidas durante 20 min para inactivar la enzima. Los azúcares solubles (glucosa y xilosa) se cuantificaron mediante HPLC.

2.4 MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO

Se realizaron pruebas en un microscopio Fei Quantafeg 650 de barrido electrónico a 4 muestras con diferente pretratamiento. Antes de la caracterización por microscopía dichas muestras fueron montadas en una cinta adhesiva conductora, por pulverización catódica recubiertas con oro, evitando la degradación y acumulación de carga en las muestras. Se tomaron imágenes con ampliaciones de 1000x y 5000x en dos diferentes puntos localizados. Se agradece al Laboratorio de Microscopía de la Universidad Industrial de Santander – Parque Tecnológico de Guatiguará y su personal, por el servicio de microscopía suministrado para la adquisición de los datos.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Para evaluar el pretratamiento combinado termoquímico-mecánico, se combinaron tres condiciones de tratamiento (tabla 1), determinando así la conversión en porcentaje de Glucano y Xilano después del pretratamiento e hidrolisis enzimática.

3.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Los resultados del análisis de composición química del bagazo de caña en estado natural se encuentran en la tabla 3.

Tabla 3. Caracterización del bagazo de caña de azúcar

Componentes	Valor promedio \pm Desviación estándar (g de componente/ g de biomasa inicial)
% Glucano	42,08 \pm 0,11
% Xilano	22,30 \pm 0,26
% Arabinano	1,82 \pm 0,14
% Humedad	7,22 \pm 0,003
% de Extractivos	6,13 \pm 0,01
% Cenizas	2,52 \pm 0,29
% Lignina soluble en ácido	2,78 \pm 0,02
% Lignina insoluble en ácido	17,46 \pm 0,66
% Ácido acético	7,31 \pm 0,04

Para la caracterización del bagazo de caña en estado natural se determinó previamente el contenido de humedad y cenizas. De acuerdo con los resultados

obtenidos los compuestos presentes en el bagazo en mayor proporción son glucano, xilano y lignina total con 42,08%, 22,30% y 20,24% (g de componente/ g de biomasa inicial) respectivamente, los cuales concuerdan con los resultados reportados en la literatura [5]. En menores cantidades se encuentran los extractivos y grupos acetilos. La composición del bagazo de caña de azúcar puede variar dependiendo de la temporada de crecimiento, procedimiento de cosecha, método de procesamiento, ubicación y de los métodos analíticos.

3.2 PRETRATAMIENTO

La metodología experimental del pretratamiento se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.2.2. Se realizaron 8 corridas con replica según el diseño experimental los cuales incluyen el pretratamiento termoquímico-mecánico combinado y en conjunto se realizó respectivamente 4 pruebas que solo incluye el pretratamiento termoquímico por duplicado.

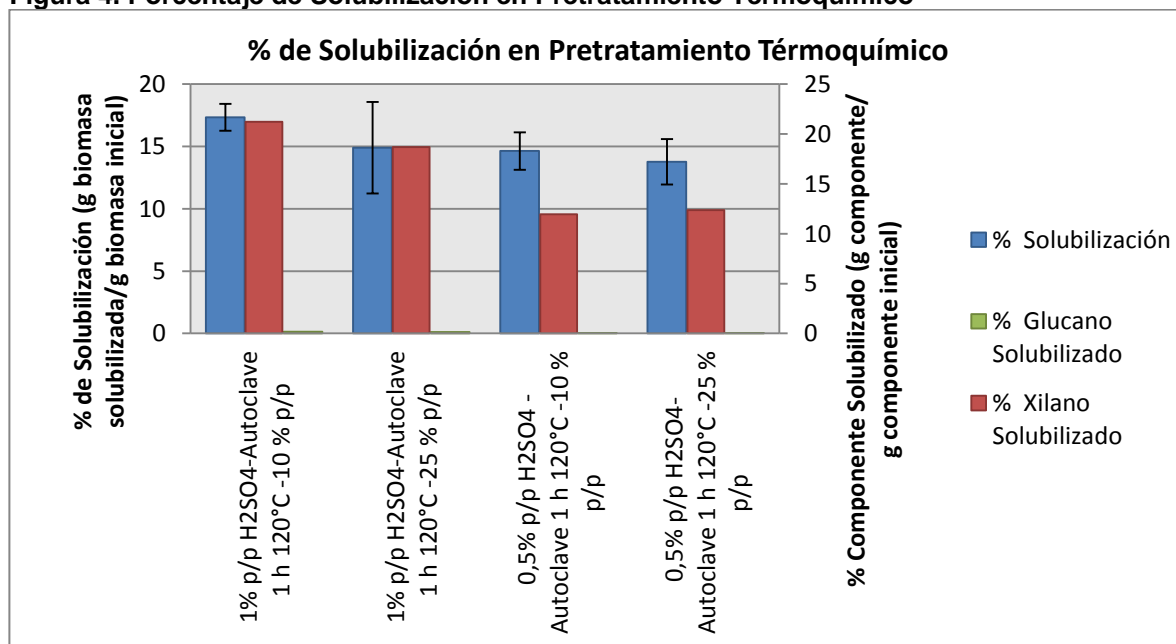
El pretratamiento termoquímico cambia químicamente la estructura de la biomasa, donde polisacáridos principalmente la hemicelulosa es solubilizada en oligosacáridos o monosacáridos. Durante la etapa del pretratamiento mecánico no se presenta solubilización, es decir, no hay cambio en la composición química de la biomasa, ya que este pretratamiento solo reduce el tamaño de partícula disminuyendo así el grado de polimerización.

La Figura 4 presenta los porcentajes de solubilización durante la etapa del pretratamiento termoquímico bajo diferentes condiciones experimentales, este porcentaje de solubilización incluye diferentes monómeros que constituyen la hemicelulosa, oligómeros, cenizas estructurales y parte de lignina. También se muestra los porcentajes de glucano y xilano solubilizados. Se puede observar que el mayor porcentaje de solubilización fue de 17,34% con un 21,2% de xilano

solubilizado y con un 0,15% de glucano solubilizado alcanzado cuando se trabajó con 1 %p/p de H₂SO₄ y una carga de solidos del 10 %p/p. La menor solubilización fue de 13,76% con un 12,36% de xilano solubilizado y un 0,03% de glucano solubilizado que se alcanzó cuando se trabajó con 0,5 %p/p de H₂SO₄ y una carga de solidos del 25%. Se puede decir que la solubilidad la favorece concentraciones más altas de H₂SO₄ y menor porcentaje de sólidos.

El porcentaje de xilano solubilizado es mayor al de glucano ya que lo que principalmente se solubiliza es la hemicelulosa (xilano), esto debido a que se encuentra en las paredes celulares secundarias, son biopolímeros heterogéneos ramificados que contienen pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa), hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, galactosa α -D) y / o ácidos orgánicos (α -D-glucurónico, α -D-4-O-metilgalacturónico). Son relativamente fáciles de hidrolizar a causa de su estructura amorfa, y la estructura ramificada (con cadena lateral corta), así como su bajo peso molecular. [41] [42].

Figura 4. Porcentaje de Solubilización en Pretratamiento Termoquímico



3.2.1 Caracterización del bagazo de caña con pretratamiento. La biomasa con pretratamiento termoquímico fue caracterizada obteniéndose así el porcentaje en peso de glucano, xilano, sólidos solubles e insolubles. La tabla 4 muestra el porcentaje de glucano y xilano para cada una de las condiciones de operación del pretratamiento termoquímico, se analizó las muestras hasta esta etapa ya que el pretratamiento con el molino de discos no cambia químicamente la estructura de la biomasa. Se puede observar que el porcentaje de Glucano permanece igual. El porcentaje de xilano disminuyó confirmándose que la solubilización (Cambio en la composición química de la biomasa) es debida a la solubilización de la hemicelulosa, que está compuesta principalmente de Xilano.

Tabla 4. Caracterización de la biomasa obtenida en los tratamientos previos bajo diferentes condiciones.

Condiciones de Pretratamiento	Promedio (%p/p) g de componente/ gr de biomasa pretratada.		Promedio (%p/p) g de componente/ gr de biomasa inicial.	
	Glucano	Xilano	Glucano	Xilano
1% p/p H ₂ SO ₄ -Autoclave 1h 120°C -10 % p/p	50,16 ± 0,51	18,98 ± 3,37	41,46 ± 0,82	15,67 ± 1,61
1% p/p H ₂ SO ₄ -Autoclave 1h 120°C -25 % p/p	50,86 ± 0,77	21,76 ± 0,50	43,29 ± 0,99	18,51 ± 0,46
0,5% p/p H ₂ SO ₄ -Autoclave 1h 120°C -10 % p/p	50,31 ± 0,21	20,92 ± 3,17	42,94 ± 1,27	17,84 ± 1,46
0,5% p/p H ₂ SO ₄ -Autoclave 1h 120°C -25 % p/p	50,65 ± 0,53	19,12 ± 4,58	43,67 ± 1,52	16,52 ± 3,27

Figura 5. Bagazo con pretratamiento en diferentes condiciones de operación del pretratamiento termoquímico-mecánico.

a) 1%p/pH₂SO₄ 120°C 80rpm 10%p/p. b) 0,5%p/pH₂SO₄ 120°C 80rpm 10%p/p. c) 1%p/pH₂SO₄ 120°C 80rpm 25%p/p. d) 0,5%p/pH₂SO₄ 120°C 80rpm 25%p/p. e) 1%p/pH₂SO₄ 120°C 160rpm 25%p/p. f) 1%p/pH₂SO₄ 120°C 160rpm 10%p/p. g) 0,5%p/pH₂SO₄ 120°C 160rpm 10%p/p. h) 0,5%p/pH₂SO₄ 120°C 160rpm 25%p/p. i) Muestra representativa de las muestras con pretratamiento termoquímico (Sin pretratamiento mecánico).



3.3 HIDROLISIS ENZIMÁTICA

La hidrolisis enzimática de la biomasa pretratada se realizó durante 160 horas con una carga enzimática de 40 mg de proteína/mg de glucano. Se determinó el contenido de proteína de la enzima utilizada mediante el método Pierce BSA como se muestra en el anexo E.

Tabla 5. Matriz del diseño presentando rendimientos de glucano y xilano después de la hidrólisis del bagazo con pretratamiento termoquímico-mecánico.

Replica	Concentración H2SO4 (%p/p)	Velocidad del Tornillo (rpm)	% de Sólidos (%p/p)	gr de Glucano Hidrolizado/gr Biomasa pretratada	gr de Xilano Hidrolizado/gr Biomasa pretratada
2	0,5	80	10	46,67	40,07
1	0,5	160	10	28,60	16,05
2	1,0	80	10	55,31	37,67
2	0,5	160	25	46,80	52,54
1	1,0	160	25	21,77	28,84
1	1,0	80	25	40,45	40,46
2	0,5	80	25	37,75	46,15
2	1,0	160	10	39,00	31,28
1	0,5	80	25	36,03	46,64
2	0,5	160	10	27,72	17,93
1	1,0	80	10	51,68	40,33
2	1,0	80	25	41,16	43,28
1	0,5	160	25	41,92	54,28
1	0,5	80	10	41,21	33,69
1	1,0	160	10	42,47	30,26
2	1,0	160	25	23,97	26,49

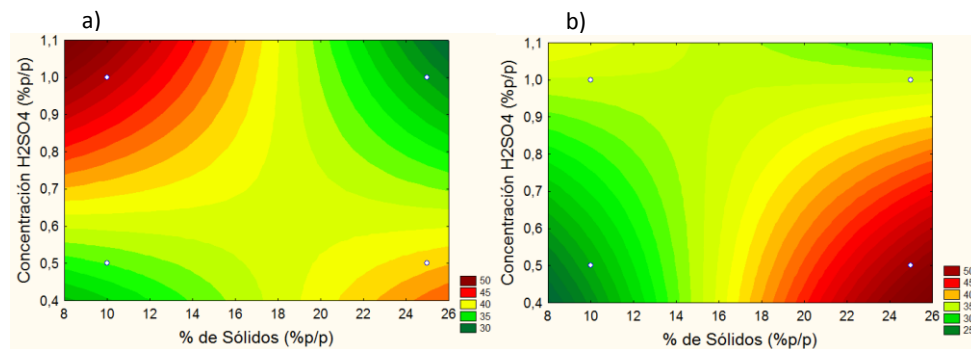
La tabla 5 muestra la matriz de diseño, el porcentaje de conversión de glucano y xilano después de la hidrólisis enzimática del bagazo con pretratamiento termoquímico-mecánico en cada uno de los ensayos del diseño experimental. Estos porcentajes fueron calculados mediante la ecuación 1 presentada a continuación:

$$\% \text{Conversion Hidrolisis enzimatica} = \frac{\text{g de componente hidrolizado}}{\text{g de componente en biomasa con pretratada}^*} * 100 \quad (1)$$

*cantidades teóricas de glucano y xilano reportadas en la caracterización del bagazo con pretratamiento (ver tabla 3)

3.3.1. Concentración de ácido sulfúrico vs % de sólidos. De acuerdo a la Figura 5 el máximo de masa de glucosa obtenida se da a menor % de sólidos pero a una mayor concentración de H₂SO₄ en cambio a mayor % de sólidos y a menor concentración de H₂SO₄ favorece la Conversión de xilosa. Este puede deberse debido al efecto silla, donde se observa que en la figura 5 a) para un porcentaje de sólidos superior a 25% puede incrementar el rendimiento también para la glucosa. Esta diferencia puede deberse a la facilidad para hidrolizar la hemicelulosa con bajas cantidades de ácido y altas concentraciones de sólidos, mientras que para la celulosa, se requieren condiciones más severas de pretratamiento, lo cual podría llevar la degradación de xilosa a furfural, el cual es un inhibidor para una posterior etapa de fermentación.

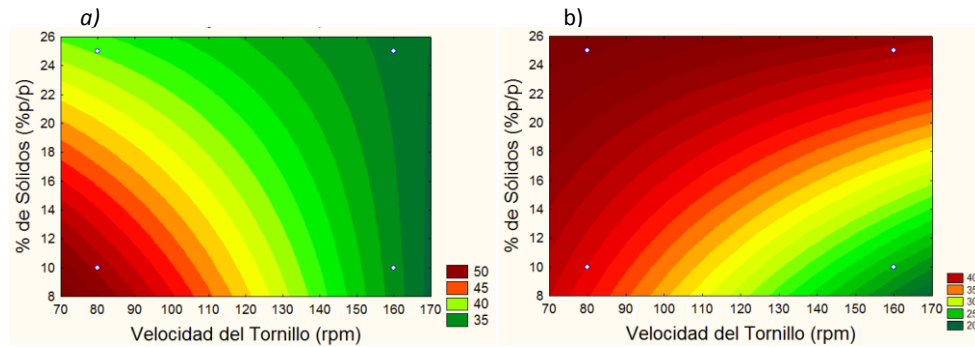
Figura 6. Curva de nivel. a) % de conversión de glucano b) % de conversión de xilano.



3.3.2 Porcentaje de Sólidos vs Velocidad del tornillo. Se observa en la Figura 7 que se ve favorecida la hidrólisis enzimática cuando se realiza un pretratamiento con bajas velocidades del tornillo del molino, efecto que puede deberse a que incrementa el tiempo de retención de la biomasa cuando va pasando a través de los discos, incrementando los esfuerzos de corte en la biomasa. Como se mencionó anteriormente, la solubilización de glucosa la favorecen las bajas cargas de sólidos, mientras que la xilosa la favorecen las altas cargas de sólidos, esto

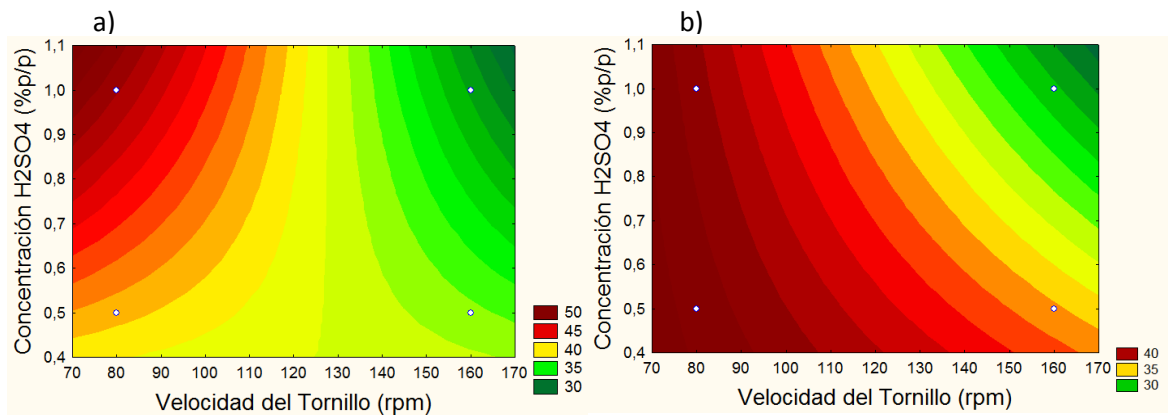
puede deberse a que la presencia de más solución en el pretratamiento térmico, favorece la porosidad o desfibrilación de la celulosa.

Figura 7. Curva de nivel. a) % de conversión de glucano b) % de conversión de xilano .



3.3.3 Concentración ácido sulfúrico vs Velocidad del tornillo. De acuerdo a la Figura 8 se aprecia que se favorece la conversión de glucano concentraciones de ácido del 1% en peso, mientras que para el Xilano es mejor concentraciones menores, ya que la xilosa es más fácilmente hidrolizable. Para ambas conversiones es mejor bajas velocidades de tornillo, ya se aumenta el tiempo de residencia de la biomasa expuesta a los esfuerzos de corte.

Figura 8. Curva de nivel. a) % de conversión de glucano b) % de conversión de xilano.

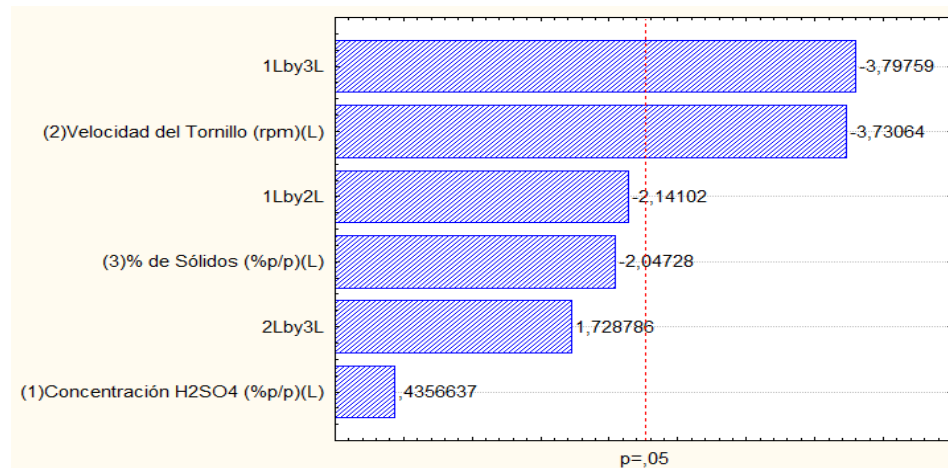


3.3.4. Determinación de los efectos principales e interacción de las variables.

El análisis de los efectos principales y de interacción de las variables durante la hidrólisis enzimática fue realizado utilizando el software STATISTICA 7.0

3.3.4.1 Análisis de Glucano.

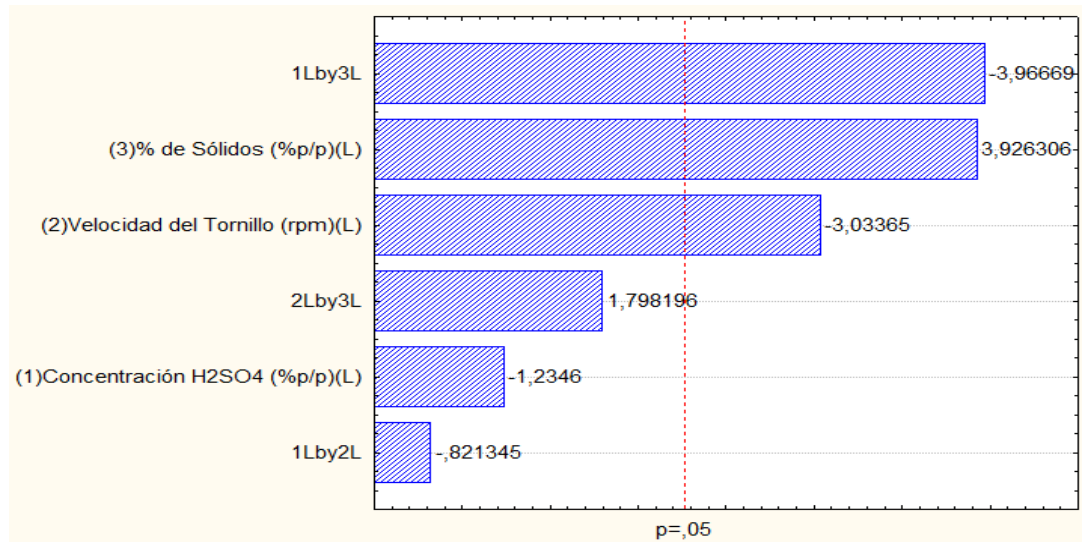
Figura 9. Diagrama de Pareto para la conversión de Glucano



Los efectos significativos con respecto a la conversión del glucano son la velocidad del tornillo, la cual, con una confianza del 0.05, presenta un efecto negativo, ya que al reducir la velocidad del tornillo se incrementa el tiempo de residencia el cual favorece los esfuerzos de corte de la biomasa, este efecto tiene que ver con el pretratamiento mecánico utilizado, mientras que hay efecto silla en el porcentaje de sólidos y ácido utilizado, donde las altas conversiones se pueden obtener con baja carga de sólidos y ácido al 1%, pero también es posible que se pueda obtener en altas concentraciones de sólidos y menores concentraciones de ácido.

3.3.4.2 Análisis de Xilano.

Figura 10. Diagrama de Pareto para la conversión de Xilano

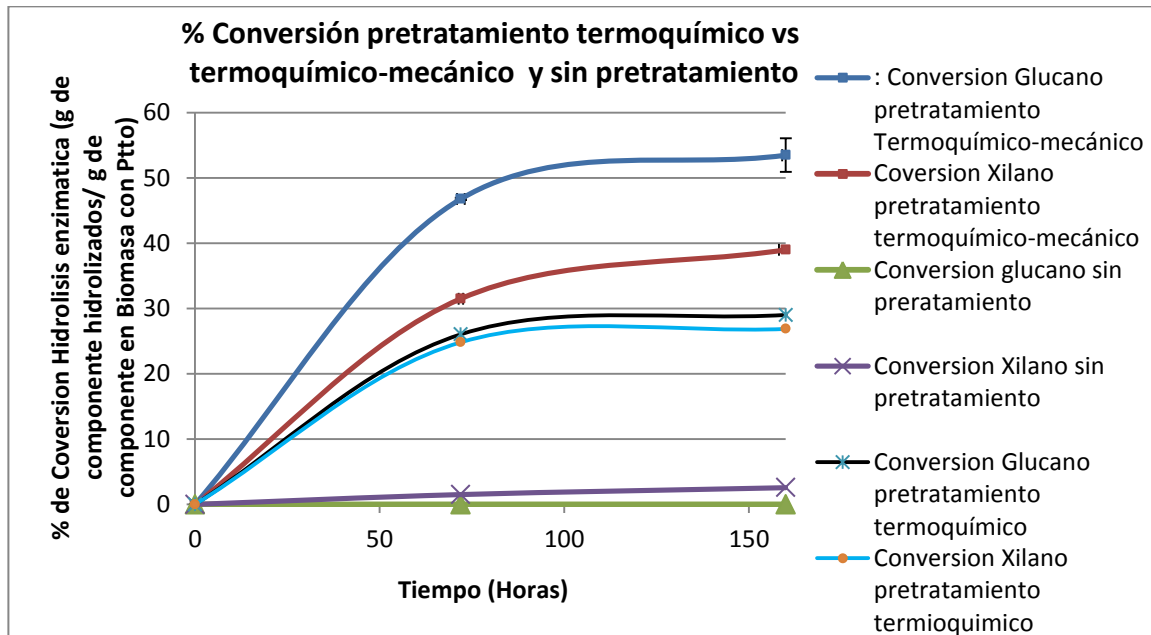


En la figura 10 se muestra que el molino de discos operado a bajas velocidades favorece la conversión del Xilano, donde es significativo este efecto junto con el incremento en el porcentaje de sólidos. Se presenta un efecto silla similar a la conversión del glucano en el porcentaje de sólidos y ácido utilizado, donde las altas conversiones se pueden obtener con baja carga de sólidos y ácido al 1%, pero también es posible que se pueda obtener en altas concentraciones de sólidos y menores concentraciones de ácido.

3.3.5. Pretratamiento Termoquímico.

3.3.5.1 Pretratamiento termoquímico comparado con el pretratamiento termoquímico-mecánico.

Figura 11. Perfil de % conversión hidrolisis enzimática corrida 1: H₂SO₄ 1% p/p-Autoclave 1 h 120°C - molino discos 80 rpm 10 % p/p



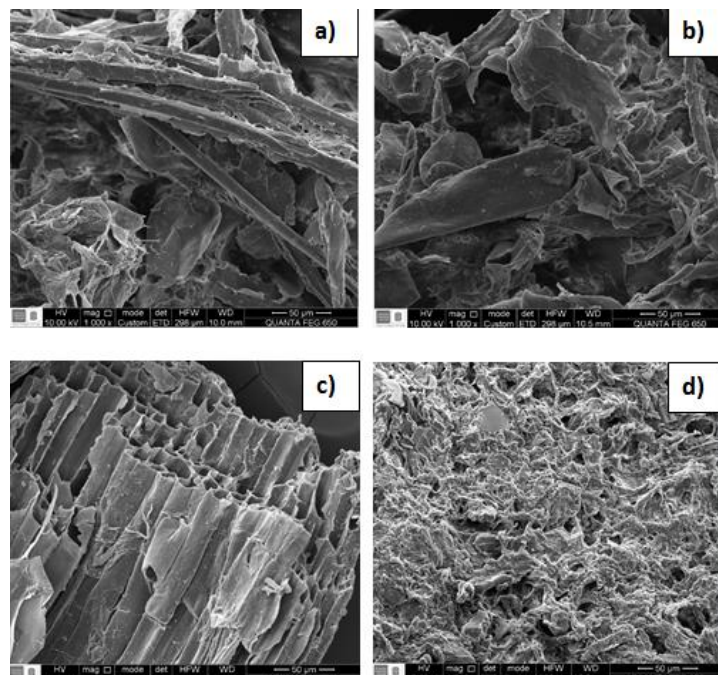
Al analizar la Figura 11 se muestra el porcentaje de conversión de hidrolisis enzimática de la primera corrida, donde se observa los porcentajes de conversión de glucano y xilano solubilizados en la hidrolisis enzimática a diferentes tiempos para la biomasa sin pretratamiento, la biomasa con pretratamiento termoquímico y la biomasa con pretratamiento combinado termoquímico-mecánico. Se observa que el porcentaje de conversión glucano y xilano de la biomasa sin pretratamiento es aproximadamente cero, pero existe un bajo porcentaje de conversión de xilano de la biomasa sin pretratamiento debido a que las enzimas no lograron llegar la celulosa por la ausencia de pretratamiento. Para el porcentaje de conversión glucano y xilano el pretratamiento termoquímico presenta un aumento en la

conversión debido a que el pretratamiento termoquímico rompe los enlaces de lignina y hemicelulosa internos mejorando la biodegradabilidad de la celulosa y para el porcentaje de conversión glucano y xilano con pretratamiento combinado termoquímico-mecánico se observa un mayor aumento gracias a que, además de solubilizar parte de la hemicelulosa y lignina, rompe la estructura cristalina, aumenta el área de superficie debido al pretratamiento mecánico proporcionando una mejora de la accesibilidad de la celulosa para las enzimas hidrolíticas.

En el Anexo F se presenta los demás perfiles de porcentaje de Conversión de hidrolisis enzimática donde se muestra la comparación de cada una de las corridas con el pretratamiento termoquímico correspondiente en función del tiempo, mostrándose que para todos los ensayos se mantiene el mismo patrón.

3.4. MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM).

Figura 12. Imágenes de bagazo de caña sometida a diferentes pretratamientos



La microscopia de barrido electrónico muestra la microestructura y morfología después de diferentes pretratamientos a) la fibra con pretratamiento termo-mecánico (H₂O-autoclave 120°C-molino de discos 80 rpm), b) la fibra con pretratamiento mecánico (H₂O-molino de discos 80 rpm), c) la fibra con pretratamiento termoquímico (H₂SO₄ 1% p/p-autoclave 120°C), d) fibra con pretratamiento termoquímico-mecánico (H₂SO₄ 1% p/p –autoclave 120°C – molino de discos 80 rpm).

a) se rompe la estructura de la pared celular, se aprecia que este es debido principalmente al pretratamiento mecánico ya que es similar a la estructura de la figura b) en la cual no hay pretratamiento térmico c) aumento de la porosidad, pero no se aprecia disrupción celular d) disrupción de la estructura cristalina de la celulosa y de la matriz enlazada de hemicelulosas y la lignina, aumento de la porosidad y del área de superficial. Comparando los cambios en la morfología del bagazo de caña pretratado indica que el aumento de porosidad se presenta gracias al pretratamiento termoquímico c) debida a la solubilización de parte de la hemicelulosa y lignina y que junto con el pretratamiento mecánico d) se reduce la cristalinidad de la celulosa, aumentando la porosidad y el área superficial presentados, dando así un mayor acceso a la enzima con lo que se puede decir que el pretratamiento combinado termoquímico-mecánico presenta una mayor descristianización de la celulosa, gracias al pretratamiento mecánico, a la acción química y térmica, mostrando mayor cambio en la estructura (amorfa) y aumento considerable del área superficial. Las imágenes SEM proporcionaron más pruebas y el apoyo a los resultados obtenidos en el estudio experimental. Ver Anexo G .

4. CONCLUSIONES

- El pretratamiento combinado termoquímico-mecánico es prometedor ya que incrementa la conversión en la hidrólisis enzimática en un 24,47% en promedio, con respecto al pretratamiento termoquímico.
- El pretratamiento combinado termoquímico-mecánico incrementa el área superficial de la biomasa, incrementado la accesibilidad de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa, según las imágenes mostradas del SEM.
- La solubilización de la biomasa (cambio en la composición química) se debe principalmente al pretratamiento termoquímico, donde se solubiliza parte de la hemicelulosa y lignina. El principal azúcar solubilizado en este pretratamiento es la xilosa, y debido a la baja severidad utilizada (0,5-1% H₂SO₄, 121°C, 1 hora) no se degrada a inhibidores. Cerca del 15,16 % de la biomasa se solubiliza.
- La mejor conversión de glucano en el pretratamiento termoquímico-mecánico, fue con 1% H₂SO₄, 10% sólidos y 80 rpm del molino de discos, dando una conversión en la hidrólisis enzimática de 53,50% mientras que para las mismas condiciones del pretratamiento termoquímico (1% H₂SO₄, 10% sólidos) la conversión fue de 29.03%.
- La mejor conversión de xilano en el pretratamiento termoquímico-mecánico, se ve favorecida con 0.5 %H₂SO₄, 25 % sólidos y 160 rpm del molino de discos, dando una conversión en la hidrólisis enzimática de 46.39% mientras que para las mismas condiciones del pretratamiento termoquímico (1% H₂SO₄, 10% sólidos) la conversión fue de 26.88%.

- Los efectos significativos para la conversión de glucano son bajas velocidades de tornillo (80 rpm) y un efecto silla para la concentración de ácido sulfúrico diluido y % de sólidos, donde las altas conversiones se pueden obtener con baja carga de sólidos y ácido al 1%, pero también es posible que se pueda obtener en altas concentraciones de sólidos y menores concentraciones de ácido.
- Los efectos significativos para la conversión de xilano son bajas velocidades de tornillo (80 rpm), altas concentraciones de sólidos y un efecto silla para la concentración de ácido sulfúrico diluido y % de sólidos, donde las altas conversiones se pueden obtener con baja carga de sólidos y ácido al 1%, pero también es posible que se pueda obtener en altas concentraciones de sólidos y menores concentraciones de ácido.

5. RECOMENDACIONES

- Estudiar el efecto de modificar el diseño de la geometría de los discos utilizados, ya que es posible que con una optimización de los parámetros del diseño del reactor incrementen las conversiones.
- Utilizar una enzima que sea especial para biomasa lignocelulósica y que tenga mayor actividad enzimática.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Quintero, J., Montoya, M., Sánchez, O., Giraldo, O., Cardona, C., Fuel ethanol production from sugarcane and corn: comparative analysis for a Colombian case. En: Energy. March, 2008, Vol. 33, p. 385-399.
2. Garcia, R., Pizarro, C., Lavin, A., Bueno, J., characterization of Spanish biomass wastes for energy use. En: Bioresource Technology. January, 2012, Vol. 103, p. 249-258.
3. Saxena, R., Adhikari, D., Goyal, H., Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. January, 2009, Vol. 13, p. 167-178.
4. Cardona, C., Sánchez, Ó., Montoya, M., Quintero, J., Producción de etanol carburante: material lignocelulósico una nueva alternativa. En: Revista Científica de América Latina. 2005, Vol. 1, p. 47-55.
5. Bian, J., Peng, F., Peng, Xiao-Peng., Xu, Feng., Sun, Run-Cang., Kennedy, John F., Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. En: Carbohydrate Polymers. April, 2012, Vol. 88, p. 638-645.
6. Shi, Jian-Bin., Yang, Qiu-Lin., Lin, Lu., Structural features and thermal characterization of bagasse hemicelluloses obtained from the yellow liquor of active oxygen cooking process. En: Polymer Degradation and Stability. February, 2013, Vol 98, p. 550-556.
7. Colciencias, Ideam, Upme, Uis. Atlas del potencial Energético de la Biomasa Residual en Colombia. 2010. ISBN: 978-958-8504-59-9.
8. Asocaña, sector azucarero Colombiano. (2013). *Aspectos Generales del Sector Azucarero 2012-2013*. Cali, Colombia; Claudia Ximena Calero Cifuentes.

9. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., Ladisch, C., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. En: Bioresour Technol. April, 2005, Vol. 96, p. 673-686.
10. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M., Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. En: Bioresource Technology. July, 2010, Vol 101, p. 4851-4861.
11. Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., Srivastava, M., A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. April, 2014, Vol. 32, p. 713-728.
12. Lynd, L., Elander, R., Wyman, C., likely features and costs of mature biomass ethanol technology. En: Applied biochemistry and biotechnology, Vol. 57/58, 1996, p. 741- 761.
13. Cardona, E., Rios, J., Peña, J., Rios L., Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant. En: Fuel. February, 2014, Vol. 118, p. 41-47.
14. Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar S., Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. August, 2014, Vol. 36, p. 91-106.
15. Amiri, H., Karimi, K., Zilouei, H., Organosolv pretreatment of rice straw for efficient acetone, butanol, and ethanol production. En: Bioresource Technology. January, 2014, Vol. 152, p. 450-456.
16. Zhou, S., Weimer, P., Hatfield, R., Runge, T., Digman M., Improving ethanol production from alfalfa stems via ambient-temperature acid pretreatment and washing. En: Bioresource Technology. October, 2014, Vol. 170, p. 286-292.
17. McIntosh, S., Vancov, T., Palmer, J., Morris, S., Ethanol production from cotton gin trash using optimised dilute acid pretreatment and whole slurry fermentation processes. En: Bioresource Technology, December, 2014, Vol. 173, p. 42-51.

18. Miura, T., Lee, S., Inoue, S., Endo, T., Combined pretreatment using ozonolysis and wet-disk milling to improve enzymatic saccharification of Japanese cedar. En: Bioresource Technology. December, 2012, Vol. 126, p. 182-186.
19. Hiden, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Fujimoto, S., Minowa, T., Inoue, S., Endo, T., Sawayama, S., Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. En: Bioresource Technology. May, 2009, Vol. 100, p. 2706-2711.
20. Pandey, A., Soccol, C., Nigam, P., Soccol, V., Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. En: Bioresource Technology. August, 2000, Vol. 74, p. 69-80.
21. Cardona, C., Quintero, J., Paz, I., Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. En: Bioresource Technology. July, 2010, Vol. 101, p. 4754-4766
22. Dantas, G., Legey, L., Mazzone, A., Energy from sugarcane bagasse in Brazil: An assessment of the productivity and cost of different technological routes. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. May, 2013, Vol. 21, p. 356-364.
23. Mohammad, J., Keikhosro, K., Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to improve Ethanol and Biogas Production: A Review. September, 2008, Vol.9, p. 1621–1651.
24. Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., Saddler, J., Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. En: Journal of Biotechnology. September, 2006, Vol. 125, p. 198-209.
25. Wyman, C.E. Handbook on bioethanol: production and utilization; Taylor & Francis: Washington DC, USA, 1996.
26. Badal C., Saha, L., Iten, B., Cotta, M., Wu, Y., Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. En: Process Biochemistry. December, 2005, Vol. 40, p. 3693-3700.

27. Agbor, V., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D., Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. En: Biotechnology Advances. November–December, 2011, Vol. 29, p. 675-685.
28. Um, B., Choi, C., Oh, K., Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). En: Bioresource Technology. February, 2013, Vol. 130, p. 38-44.
29. Vandebossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Barzana, E., Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., Mata, J., Castellón, E., Rigal, L., A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. En: Industrial Crops and Products. April, 2014, Vol. 55, p. 258-266.
30. Choi, C., Oh, K., Application of a continuous twin screw-driven process for dilute acid pretreatment of rape straw. En: Bioresource Technology. April, 2012, Vol. 110, p. 349-354.
31. Chen, W., Xu, Y., Hwang, W., Wang, J., Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol. En: Bioresource Technology. November, 2011, Vol. 102, p. 10451-10458.
32. Sun, Y., Cheng, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. En: Bioresource Technology. May, 2002, Vol. 83, p. 1-11.
33. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA: ingeniería civil y arquitectura. práctica para la reducción del tamaño de las muestras de agregados, tomadas en campo, para la realización de ensayos. NTC 3674 Bogotá DC: 1995.
34. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Preparation of Samples for Compositional Analysis .June, 2008.
35. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Process in Liquid Solids Samples. March, 2008.

36. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY Determination of Extractives in Biomass. January, 2008.
37. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. April, 2008.
38. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY .Determination of Ash in Biomass. January, 2008.
39. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of Insoluble Solids in pretreated Biomass Material. March, 2008.
40. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Enzymatic saccharification of Lignocellulosic Biomass. March, 2008.
41. Mood, S., Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Jouzani, G., Najafi, G., Gholami, M.,. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. November, 2013, Vol. 27, p.77-93.
42. Li, M., Fan, Y., Xu, F., Sun, R., Zhang, X., Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: Characterization of the cellulose rich fraction. En: Industrial Crops and Products. November, 2010, Vol. 32, p. 551-559.

BIBLIOGRAFIA

Agbor, V., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D., Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. En: Biotechnology Advances. November–December, 2011, Vol. 29, p. 675-685.

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

Amiri, H., Karimi, K., Zilouei, H., Organosolv pretreatment of rice straw for efficient acetone, butanol, and ethanol production. En: Bioresource Technology. January, 2014, Vol. 152, p. 450-456.

Asocaña, sector azucarero Colombiano. (2013). *Aspectos Generales del Sector Azucarero 2012-2013*. Cali, Colombia; Claudia Ximena Calero Cifuentes.

Badal C., Saha, L., Iten, B., Cotta, M., Wu, Y., Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. En: Process Biochemistry. December, 2005, Vol. 40, p. 3693-3700.

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar S., Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. August, 2014, Vol. 36, p. 91-106.

Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., Saddler, J., Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by

softwood lignin preparations. En: Journal of Biotechnology. September, 2006, Vol. 125, p. 198-209.

Bian, J., Peng, F., Peng, Xiao-Peng., Xu, Feng., Sun, Run-Cang., Kennedy, John F., Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. En: Carbohydrate Polymers. April, 2012, Vol. 88, p. 638-645.

Cardona, C., Quintero, J., Paz, I., Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. En: Bioresource Technology. July, 2010, Vol. 101, p. 4754-4766

Cardona, C., Sánchez, Ó., Montoya, M., Quintero, J., Producción de etanol carburante: material lignocelulósico una nueva alternativa. En: Revista Científica de América Latina. 2005, Vol. 1, p. 47-55.

Cardona, E., Rios, J., Peña, J., Rios L., Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant. En: Fuel. February, 2014, Vol. 118, p. 41-47.

Chen, W., Xu, Y., Hwang, W., Wang, J., Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol. En: Bioresource Technology. November, 2011, Vol. 102, p. 10451-10458.

Choi, C., Oh, K., Application of a continuous twin screw-driven process for dilute acid pretreatment of rape straw. En: Bioresource Technology. April, 2012, Vol. 110, p. 349-354.

Colciencias, Ideam, Upme, Uis. Atlas del potencial Energético de la Biomasa Residual en Colombia. 2010. ISBN: 978-958-8504-59-9.

Dantas, G., Legey, L., Mazzone, A., Energy from sugarcane bagasse in Brazil: An assessment of the productivity and cost of different technological routes. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. May, 2013, Vol. 21, p. 356-364.

Garcia, R., Pizarro, C., Lavin, A., Bueno, J., characterization of Spanish biomass wastes for energy use. En: Bioresource Technology. January, 2012, Vol. 103, p. 249-258.

Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Fujimoto, S., Minowa, T., Inoue, S., Endo, T., Sawayama, S., Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. En: Bioresource Technology. May, 2009, Vol. 100, p. 2706-2711.

Li, M., Fan, Y., Xu, F., Sun, R., Zhang, X., Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: Characterization of the cellulose rich fraction. En: Industrial Crops and Products. November, 2010, Vol. 32, p. 551-559.

Lynd, L., Elander, R., Wyman, C., likely features and costs of mature biomass ethanol technology. En: Applied biochemistry and biotechnology, Vol. 57/58, 1996, p. 741- 761.

Mcintosh, S., Vancov, T., Palmer, J., Morris, S., Ethanol production from cotton gin trash using optimised dilute acid pretreatment and whole slurry fermentation processes. En: Bioresource Technology, December, 2014, Vol. 173, p. 42-51.

Miura, T., Lee, S., Inoue, S., Endo, T., Combined pretreatment using ozonolysis and wet-disk milling to improve enzymatic saccharification of Japanese cedar. En: Bioresource Technology. December, 2012, Vol. 126, p. 182-186.

Mohammad, J., Keikhosro, K., Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to improve Ethanol and Biogas Production: A Review. September, 2008, Vol.9, p. 1621–1651.

Mood, S., Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Jouzani, G., Najafi, G., Gholami, M., Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. November, 2013, Vol. 27, p.77-93.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., Ladisch, C., Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. En: Bioresour Technol. April, 2005, Vol. 96, p. 673-686.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY .Determination of Ash in Biomass. January, 2008.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY Determination of Extractives in Biomass. January, 2008.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of Insoluble Solids in pretreated Biomass Material. March, 2008.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. April, 2008.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Process in Liquid Solids Samples. March, 2008.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Enzymatic saccharification of Lignocellulosic Biomass. March, 2008.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Preparation of Samples for Compositional Analysis .June, 2008.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA: ingeniería civil y arquitectura. práctica para la reducción del tamaño de las muestras de agregados, tomadas en campo, para la realización de ensayos. NTC 3674 Bogotá DC: 1995.

Pandey, A., Soccol, C., Nigam, P., Soccol, V., Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. En: Bioresource Technology. August, 2000, Vol. 74, p. 69-80.

Quintero, J., Montoya, M., Sánchez, O., Giraldo, O., Cardona, C., Fuel ethanol production from sugarcane and corn: comparative analysis for a Colombian case. En: Energy. March, 2008, Vol. 33, p. 385-399.

Saxena, R., Adhikari, D., Goyal, H., Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. January, 2009, Vol. 13, p. 167-178.

Shi, Jian-Bin., Yang, Qiu-Lin., Lin, Lu., Structural features and thermal characterization of bagasse hemicelluloses obtained from the yellow liquor of active oxygen cooking process. En: Polymer Degradation and Stability. February, 2013, Vol 98, p. 550-556.

Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., Srivastava, M., A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews. April, 2014, Vol. 32, p. 713-728.

Sun, Y., Cheng, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. En: Bioresource Technology. May, 2002, Vol. 83, p. 1-11.

Um, B., Choi, C., Oh, K., Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). En: Bioresource Technology. February, 2013, Vol. 130, p. 38-44.

Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Barzana, E., Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., Mata, J., Castellón, E., Rigal, L., A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. En: Industrial Crops and Products. April, 2014, Vol. 55, p. 258-266.

Wyman, C.E. Handbook on bioethanol: production and utilization; Taylor & Francis: Washington DC, USA, 1996.

Zhou, S., Weimer, P., Hatfield, R., Runge, T., Digman M., Improving ethanol production from alfalfa stems via ambient-temperature acid pretreatment and washing. En: Bioresource Technology. October, 2014, Vol. 170, p. 286-292.

ANEXOS

ANEXO A. DESCRIPCIÓN DE DIFERENTES ALTERNATIVAS DE PRETRATAMIENTO

PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS:

El pretratamiento químico se ha convertido en uno de los métodos más prometedores para mejorar la biodegradabilidad de la celulosa mediante la eliminación de la lignina y/o hemicelulosas, y para disminuir el grado de polimerización y la cristalinidad del componente celulósico. Se ha investigado extensamente para ser utilizado para la deslignificación de material celulósico en la industria de pulpa y papel. También se ha explotado para mejorar la digestibilidad de la biomasa en un proceso de pretratamiento industria.

PRETRATAMIENTOS FÍSICOS:

Diferentes tipos de procesos físicos tales como la molienda (molienda por bolas, molienda de dos rodillos, molienda por martillos, molienda coloidal), astillado, molienda y/o irradiación (rayos gamma y haz de electrones) se pueden utilizar para mejorar la digestibilidad enzimática de los residuos lignocelulósicos. La reducción de tamaño se utiliza en la mayoría de los estudios de investigación de la hidrólisis, pero hay poca información disponible acerca de las características del consumo de sustrato y la energía en el proceso. Teniendo en cuenta el requisito de alta energía de la molienda a escala industrial y el aumento en las demandas de energía, es poco probable que la molienda se todavía económicamente viable.

PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS:

Los pretratamientos que combinan tanto los procesos químicos y físicos son de importancia en la disolución de la hemicelulosa y la alteración de la estructura de

la lignina, que proporciona una mejora de la accesibilidad de la celulosa para las enzimas hidrolíticas. Esta categoría incluye la gran mayoría de los métodos de pretratamiento, tales como la explosión de vapor, agua caliente líquido, amoníaco fibra / congelación explosión, la oxidación húmeda, amoníaco reciclado de percolación, amoníaco acuoso, organosolv y CO₂ explosión.

PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO

El pretratamiento biológico se asocia principalmente con la acción de hongos que son capaces de producir enzimas para degradar la lignina, hemicelulosas y polifenoles presentes en la biomasa.

Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de pretratamiento para materiales lignocelulósicos.

PRETRATAMIENTOS TÉRMICOS		
Método	Ventajas	Desventajas
Explosión de vapor	Hidrólisis de 80 al 100% de la hemicelulosa. Alta concentración de sólidos. Reducción del tamaño con menor gasto energético. Despolimerización baja de la celulosa y recuperación fácil de esta por lavado. La lignina inalterada se puede extraer. No es necesaria la recirculación y no hay costos ambientales.	Destrucción de una parte de los xilanos de las hemicelulosas. Incompleta rotura de la matriz lignina-carbohidratos. Generación de inhibidores que afectan el proceso de fermentación. Debe combinarse con H ₂ SO ₄ , SO ₄ ó CO ₂ para mejorar la eficiencia. Existe el riesgo de producción de compuestos fenólicos solubles.

PRETRATAMIENTOS TÉRMICOS		
Método	Ventajas	Desventajas
Agua caliente líquida presurizada	Se recuperan la mayoría de las pentosas. Hidrólisis de la hemicelulosa de 80- 100%. Baja ó nula formación de inhibidores. Respecto al pretratamiento con vapor, este tiene la ventaja de solubilizar productos de hemicelulosa y lignina en concentraciones más bajas.	Debido a las bajas concentraciones se reduce el riesgo de degradación de productos como furfural y la condensación y la precipitación de compuestos de lignina
PRETRATAMIENTOS MECÁNICOS		
Trituración mecánica	La reducción de tamaño de partículas lleva a un aumento de superficie específica y una reducción del grado de polimerización (DP). El incremento del área superficial específica, reduce DP, este es un factor que incrementa los rendimientos de la hidrólisis entre el 5–25% (dependiendo de la clase de biomasa, clase y duración de la molienda), también se disminuye el tiempo de digestión entre el 23–59% así se incrementa la velocidad de la hidrólisis.	A pesar de no producirse inhibidores (como furfural y HMF (hidroximetilfurfural)), la molienda es ideal tanto para el metano y la producción de etanol. Sin embargo, esta operación requiere de alta consumo energético y se encontró este pretratamiento económicamente no viable. Teniendo en cuenta las necesidades de alta energía de molienda y el continuo aumento de los precios de la energía, es probable que la molienda no sea el pretratamiento más viable.

PRETRATAMIENTOS TÉRMICOS		
Método	Ventajas	Desventajas
PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS		
Proceso de explosión de fibra con amoníaco (AFEX)	No se producen inhibidores. No requiere pequeños tamaños de partícula para aumentar su eficiencia.	No se solubiliza la hemicelulosa. La composición del material sometido a este proceso prácticamente no cambia. Sólo es aplicable y efectivo hasta un 90% en materiales con contenidos de lignina menores a 15%. Requiere recuperación del amoníaco.
Explosión con CO ₂	Es más barato que la explosión con amoníaco. No origina los compuestos inhibitorios que se originan durante la explosión por vapor.	Rendimientos relativamente bajos comparados con la explosión por vapor y el proceso AFEX.
PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS		
Hidrólisis ácida	Ácidos concentrados: se obtienen rendimientos de hidrólisis superiores al 90%. Ácidos diluidos: bajo consumo de ácidos; hidrólisis del 80 al 100% de la hemicelulosa; la temperatura alta favorece la hidrólisis de la celulosa.	Ácidos concentrados: la gran cantidad de ácido requerido; los costos de la recuperación del ácido; los efectos corrosivos de los ácidos concentrados que con llevan a altas inversiones en los equipamientos; es necesaria una costosa etapa de neutralización antes de la fermentación. Existe el riesgo de formación de inhibidores.

PRETRATAMIENTOS TÉRMICOS		
Método	Ventajas	Desventajas
		Ácidos diluidos: Requiere altas temperaturas para alcanzar rendimientos aceptables de conversión de celulosa a glucosa; a pesar de las temperaturas altas y tiempos de residencia cortos que generan máximos rendimientos en glucosa, tan sólo han logrado el 60% en torno al rendimiento teórico.
Tratamientos con ozono	La eliminación efectiva de la lignina. No origina productos inhibidores.	Los altos costos por la cantidad de ozono requerido. No ha sido probado en cascarilla de arroz, sin embargo, si en paja de trigo.
Hidrólisis con álcalis	Aumento del área superficial interna. Descenso del nivel de cristalización. Separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos. Rotura de la estructura de la lignina.	La efectividad de este pretratamiento depende del contenido de lignina del material a tratar, que debe ser máximo de 18%. El pretratamiento alcalino causa la solubilización de hemicelulosa y lignina. Existe a menudo una pérdida de productos en la degradación de hemicelulosa y la solubilización de lignina, a menudo tiene un efecto inhibitor.

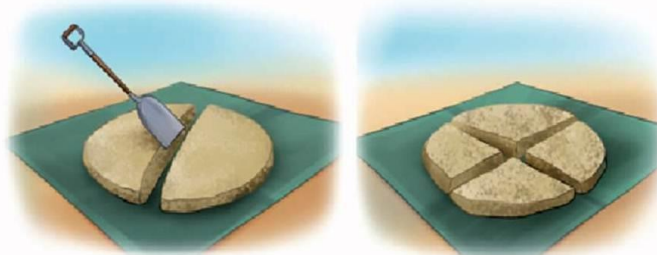
ANEXO B. REDUCCIÓN DE MUESTRAS POR EL MÉTODO DE CUARTEO

-Método B: Descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 3674, la cual proporciona procedimientos para reducir la muestra grande, obtenida en el campo, hasta un tamaño conveniente para realizar un número de ensayos que describan el material y midan su calidad de tal manera que la porción más pequeña sea probablemente la más representativa de la muestra de campo, y por lo tanto del suministro total.

Procedimiento: El bagazo de caña se seca (hasta 8-10% de contenido de humedad) en el entorno del laboratorio y se prosigue a hacer lo siguiente:

- La biomasa se coloca en una manta de lona y se mezcla el material volcando la muestra completa tres veces.
- Utilizando una pala se forma una pila la cual se alisa hasta obtener un alto y diámetro uniformes, presionando el vértice de modo que cada cuarta parte de la pila resultante contenga el material original en ella. El diámetro deberá ser, aproximadamente de cuatro a ocho veces el espesor.
- Se divide la masa alisada en cuatro cuartos iguales, con una pala o palustre; se remueven dos cuartos diagonalmente opuestos, incluyendo todo el material fino, y se barren los espacios desocupados.
- Se mezcla y cuarteo sucesivamente el material remanente hasta que la muestra se reduzca al tamaño deseado.

Cuarteo sobre una manta de lona



ANEXO C. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZUCAR

La caracterización del bagazo de caña de azúcar en estado natural y con pretratamiento se llevó a cabo siguiendo procedimientos analíticos normalizados desarrollados por el 'Laboratorio Nacional de Energía Renovable de Estados Unidos' NREL por sus siglas en inglés.

El bagazo es el residuo lignocelulósico fibroso remanente de los tallos de caña, obtenido a la salida del último molino del tándem azucarero, constituyendo un conjunto heterogéneo de partículas de diferentes tamaños. Desde el punto de vista físico, el bagazo integral se compone de fibra, sólidos insolubles, sólidos solubles y humedad, mientras que desde el punto de vista químico, se compone de celulosas y hemicelulosas (pentosanos) enlazadas mediante lignina, un polímero aromático altamente oxigenado, con esqueleto de fenilpropano que se repite. Sobre esta matriz se deposita una mezcla de compuestos de bajo peso molecular llamados extractivos. Las hemicelulosas abarcan un conjunto de polisacáridos diferentes, cuya composición tiene como características comunes: solubilidad en solventes, reactividad frente a los ácidos y descomposición en azúcares y furfural. Estas propiedades las diferencian, analíticamente, del resto de los componentes químicos del bagazo.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS COMPOSICIONAL:

Se debe preparar adecuadamente la muestra con el objetivo de minimizar las interferencias en el análisis composicional: secado de la muestra, reducción de tamaño de partícula y tamizado. Después del cuarteo de la biomasa, las muestras se fraccionaron mediante tamizado durante 30 minutos: dos tiempos de 15 minutos y uno de 10 minutos (reposo). La serie del tamiz fue compuesta por el número de mallas: N°20 (0,85mm), N°80 (0,18mm) y Fondo. La biomasa retenida en el tamiz de malla N°20 fue disminuida de tamaño mediante un Molino de cuchillas o molino Wiley N° 4 con tamiz de 2 mm, y fue nuevamente tamizada. El

material seleccionado para el análisis composicional es el retenido en las mallas -20/ +80. (NREL/TP-510-4262).

SÓLIDOS TOTALES:

El contenido total de sólidos se determinó introduciendo la biomasa en un horno a 105 °C por 12 horas hasta peso constante, es decir $\pm 0,1$ % de cambio en el peso (NREL/TP-510-4262). Para ello se pesó 0,5 gr de cada muestra y se realizó por duplicado.

$$\% \text{ Sólidos Totales} = \left(\frac{m_2 - m}{m_1} \right) * 100 \quad (1)$$

Donde:

m=Peso del Crisol (g)

m_1 = Peso inicial de la Muestra (g)

m_2 = Peso de la muestra seca más el Crisol(g)

CONTENIDO DE CENIZAS:

El contenido de cenizas se determinó en un horno mufla con rampa a 575° C durante 244 minutos con el fin de quemar los compuestos orgánicos de la biomasa. Se realizó por duplicado a la biomasa antes y después de extractivos. El contenido de cenizas es reportado como porcentaje en base seca, calculado de la siguiente forma (NREL/TP 510-42622):

$$\% \text{ Contenido de Cenizas} = \left(\frac{m_2 - m}{m_1} \right) * 100 \quad (2)$$

Donde:

m=Peso del Crisol (g)

m_1 = Peso inicial de la Muestra en base seca (g)

m_2 = Peso de la muestra seca más el Crisol después de remover de la mufla (g)

DETERMINACIÓN DE EXTRACTIVOS EN LA BIOMASA:

Fue necesario eliminar el material no estructural de la biomasa antes del análisis para evitar la interferencia con etapas analíticas posteriores. Se utilizó un proceso de extracción soxhlet de dos etapas para eliminar el material soluble en etanol y soluble en agua. Se pesaron 8 gr de muestra (con replica) colocados en un cartucho poroso y se midieron 190 ml de solvente. Una primera extracción se realizó con agua durante 10 horas con una velocidad de reflujo de cuatro ciclos por hora. Sin desmontar el equipo soxhlet se realizó una segunda extracción con etanol durante 10 horas con una velocidad de reflujo de 6 ciclos por hora. Los extractos solubles en agua fueron analizados por HPLC para cuantificar su contenido de sacarosa y los extractos solubles en etanol fueron llevados a un horno de convección a 40 °C para la eliminación del disolvente por evaporación, el porcentaje de extractos por gramo de biomasa seca se calculó con la siguiente ecuación (NREL/TP-510-42619).

$$\% \text{ Extractos} = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) * 100 \quad (3)$$

Donde:

m_1 = Peso inicial de la Muestra (g)

m_2 = Peso final de la muestra(g)

CONTENIDO DE LIGNINA Y CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES:

El contenido de carbohidratos estructurales, lignina soluble e insoluble en ácido es obtenido a través de dos etapas de hidrólisis con ácido sulfúrico. El procedimiento es descrito a continuación. Se hace reaccionar 1 gr de biomasa de un tamaño de partícula no mayor a 2 mm con 10 mL de ácido sulfúrico al 72 % (p/p) a 30 °C durante una hora. Posteriormente se adiciona al hidrolizado 84 mL de agua desionizada para obtener una concentración final de ácido sulfúrico de 4 % (p/p) y terminar la reacción en una autoclave a 120 °C durante una hora (norma NREL/TP- 510-42618). La solución es filtrada mediante un Papel de filtro celulosa

Munktel separando el sólido para determinar el contenido de lignina insoluble en ácido. El residuo es lavado con agua destilada para retirar el exceso de ácido presente. El papel filtro y el sólido son secados a 105 °C por 12 h, pesados y colocados en una mufla con rampla. El porcentaje de lignina insoluble en ácido en la biomasa en base seca es calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lignina insoluble en ácido} = \left(\frac{m_2 - m_3}{m_1 * \frac{\% \text{ sólidos Totales}}{100}} \right) * 100 \quad (4)$$

Donde:

m_1 = Peso inicial de la Muestra (g)

m_2 = Peso del crisol más la muestra seca a 575° C(g)

m_3 = Peso del crisol y muestras despues de remover de la mufla (g)

El contenido de lignina soluble en ácido corresponde a la porción de lignina que se disolvió durante la hidrólisis realizada previamente y se determinó de acuerdo con la norma NREL/TP- 510-42618. El líquido obtenido en la filtración de la lignina insoluble en ácida fue analizado con un Espectrofotómetro UV-Visible. La absorbancia del hidrolizado fue medida a 240 nm utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. La muestra se diluyó con agua destilada hasta llevar la absorbancia al intervalo de 0,7 a 1. El porcentaje de lignina soluble en ácido por gramo de biomasa seca fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lignina ácida soluble} = \left(\frac{\frac{A}{b*a} * df * V * \frac{L}{1000 \text{ ml}}}{m * \frac{\% \text{ sólidos Totales}}{100}} \right) * 100 \quad (5)$$

Donde:

A= absorbancia a 240 nm

df= factor de dilución

b= Longitud de celda

a= absortividad, igual a 25L/g*cm

m= masa inicial de biomasa

El contenido de carbohidratos estructurales en la biomasa se determinó cuantificando los monosacáridos provenientes de la hemicelulosa (xilosa y arabinosa) y celulosa (glucosa) en la biomasa extraída. Los monosacáridos presentes en el líquido obtenido en la filtración es cuantificado a través del HPLC utilizando la columna Biorad HPX-87H (7,8 x 300 mm) Aminex. Como fase móvil se utilizó 0,005 M de ácido sulfúrico con un flujo de 0,6 mL/min y una temperatura de 65 °C en el horno. La concentración de cada uno de los monosacáridos fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ carbohidrato } (p/p) = \left(\frac{c \cdot v_f}{m \cdot \frac{\% \text{ sólidos Totales}}{100} \cdot FC} \right) * 100 \quad (6)$$

m1 = Peso inicial de la muestra (g)

Vf = Volumen de filtrado 287 ml

C = Concentración de monosacáridos reportado en el HPLC, mg/mL

FC = Factor de corrección de la cantidad de monosacáridos degradados durante la segunda etapa de la hidrólisis.

- Preparación de estándares de recuperación de azúcares:

Para conocer las pérdidas debidas a la destrucción de los azúcares durante la hidrólisis ácida diluida (segunda hidrólisis). Se preparó un conjunto de estándares de recuperación: D-(+) glucosa, D-(+) xilosa y L-(+) arabinosa con las siguientes concentraciones: 2 g/l de Glucosa, 1,5 g/l de xilosa y 1 g/l de arabinosa. Se tomó de cada conjunto 10 ml de solución y se le agregaron 348 µl de ácido sulfúrico al 72 % (p/p).

En la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa hay pérdidas de moléculas de agua, por lo tanto es posible establecer una relación entre las masas moleculares de la glucosa y celulosa, al igual que entre la xilosa y hemicelulosa, considerando esta

como componente mayoritario en la hemicelulosa. El factor de relación entre la concentración de glucosa y el contenido de celulosa es (162/180) y para la hemicelulosa es (132/150), los cuales son utilizados para calcular el contenido de cada uno de estos carbohidratos estructurales. Por lo tanto la concentración de carbohidratos estructurales, celulosa y hemicelulosa se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Celulosa } (p/p) = \text{Glucosa } \%(p/p) * \frac{162}{180} \quad (7)$$

$$\% \text{ Hemicelulosa } (p/p) = \sum(\text{Xilosa} + \text{Arabinosa}) \%(p/p) * \frac{132}{150} \quad (8)$$

ANEXO D. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

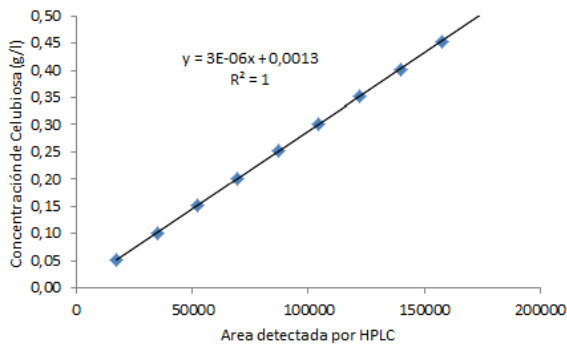
Los extractos líquidos de los hidrolizados de la caracterización, del pretratamiento y de la hidrolisis enzimática fueron analizados para determinar cualitativa y cuantitativamente los azúcares presentes utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), Shimadzu Corporation, modelo LC-10AD, se empleó una columna Aminex HPX87H BIO-RAD (300 mm x 7,8 mm) con las siguientes condiciones: eluyente H₂SO₄ 5mM, 0,6 ml/min, 65°C y detectores de índice de refracción.

La caracterización y cuantificación de azúcares se efectuó mediante la comparación de los tiempos de retención y las áreas de los picos de las muestras, con los de soluciones patrones de los azucares a analizar.

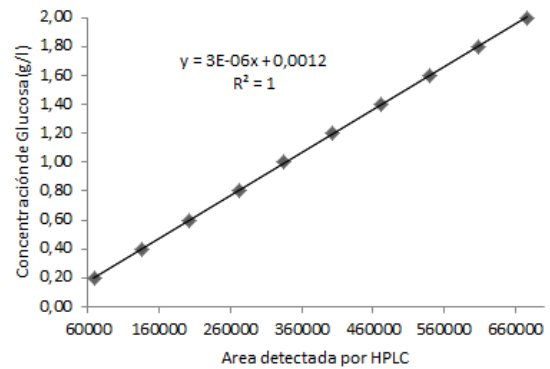
CURVA DE CALIBRACIÓN:

Es una línea trazada y una ecuación asociada que describe la relación entre la concentración de la sustancia a ser probada y la respuesta del detector de HPLC. Para la cuantificación de los azucares presentes en la caracterización y el pretratamiento se construyó una curva de calibración a partir de los patrones con concentraciones conocidas de los azucares a analizar: Glucosa: 2 g/l, Xilosa: 1.2 g/l, Arabinosa: 0.5 g/l, Celobiosa: 0.5 g/l y para el Ácido acético: 0.5 g/l. Por regresión lineal se obtuvo una ecuación de una línea recta que describe la relación entre la concentración de la sustancia a ser analizada y la respuesta del detector de HPLC. A continuación se presentan las curvas de calibración para cada azúcar analizado.

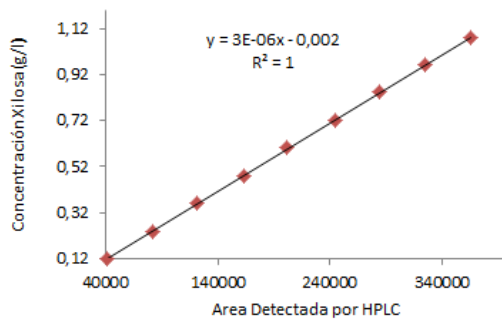
Curva Patrón de Celubiosa



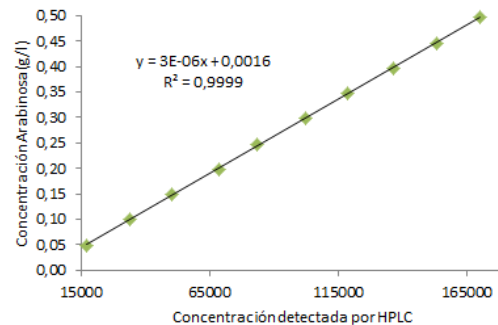
Curva Patrón de Glucosa



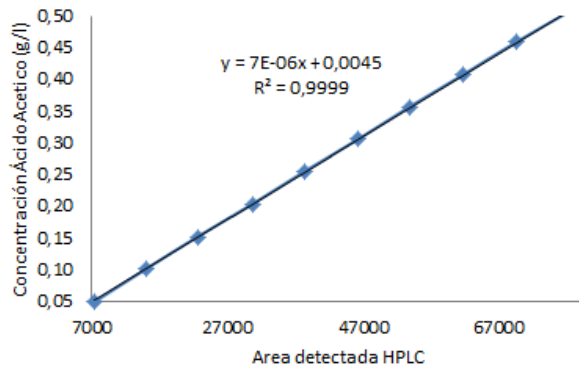
Curva Patrón de Xilosa



Curva Patrón Arabinosa



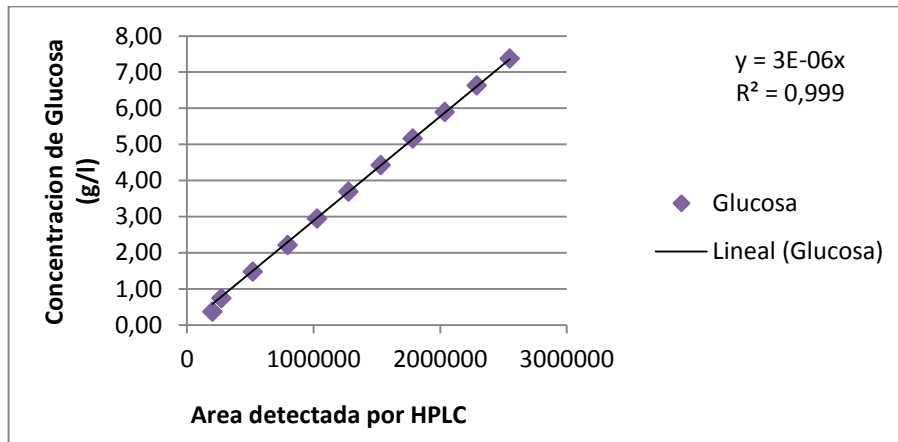
Curva patrón Ácido acético



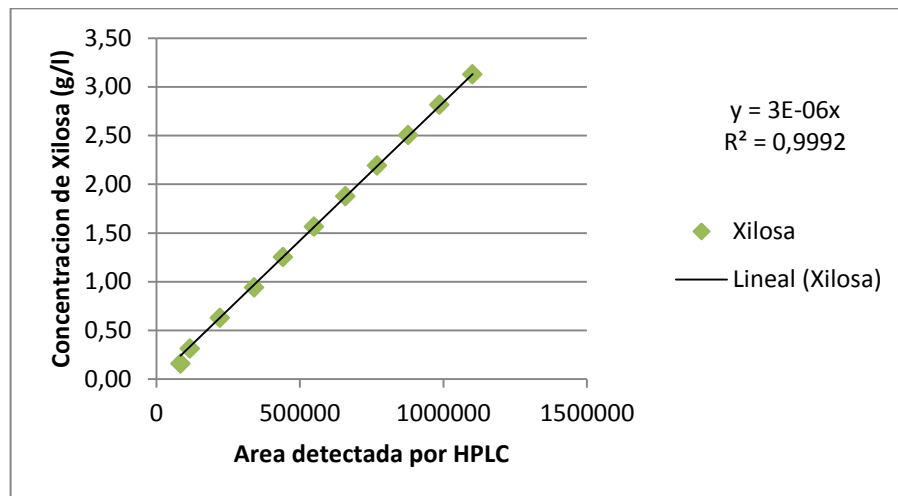
Para la cuantificación de los azúcares presentes en la hidrólisis enzimática se construyó una curva de calibración a partir de los patrones con concentraciones conocidas de los azúcares a analizar: Glucosa: 7,368 g/l, Xilosa: 3,126 g/l, Por regresión lineal se obtuvo una ecuación de una línea recta que describe la relación entre la concentración de la sustancia a ser analizada y la respuesta del detector

de HPLC. A continuación se presentan las curvas de calibración para los dos azúcares analizados.

Curva Patrón de Glucosa en hidrolisis enzimática



Curva Patrón de Xilosa en hidrolisis enzimática



ANEXO E .DETERMINACION DE PROTEINA EN LA ENZIMA

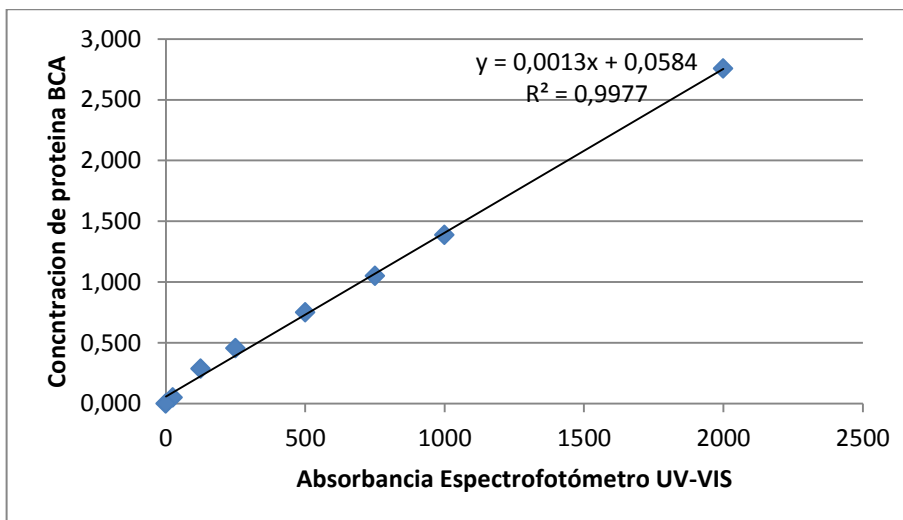
La cantidad de proteína presente en la enzima se determinó a partir de un protocolo Pierce TM BCA kit de ensayo de proteínas. Se prepararon patrones de albúmina (BSA) la cual se diluyo a partir de la siguiente secuencia.

Preparación de patrones diluidos albúmina (BSA)

Muestra	Volumen de agua (μL)	Volumen de patrón BSA (μL)	Concentración final de BSA (μg/mL)
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175	750
E	325	325	500
F	325	325	250
G	325	325	125
H	400	100	25
I	400	0	0

Obteniéndose la siguiente curva de calibración

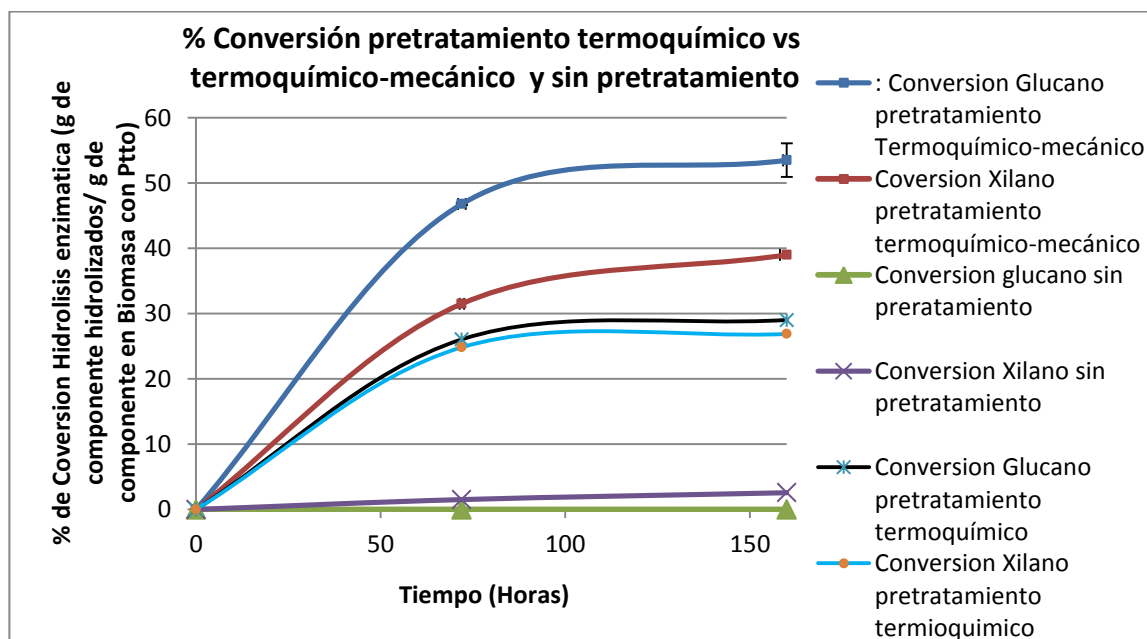
Curva Patrón de proteína



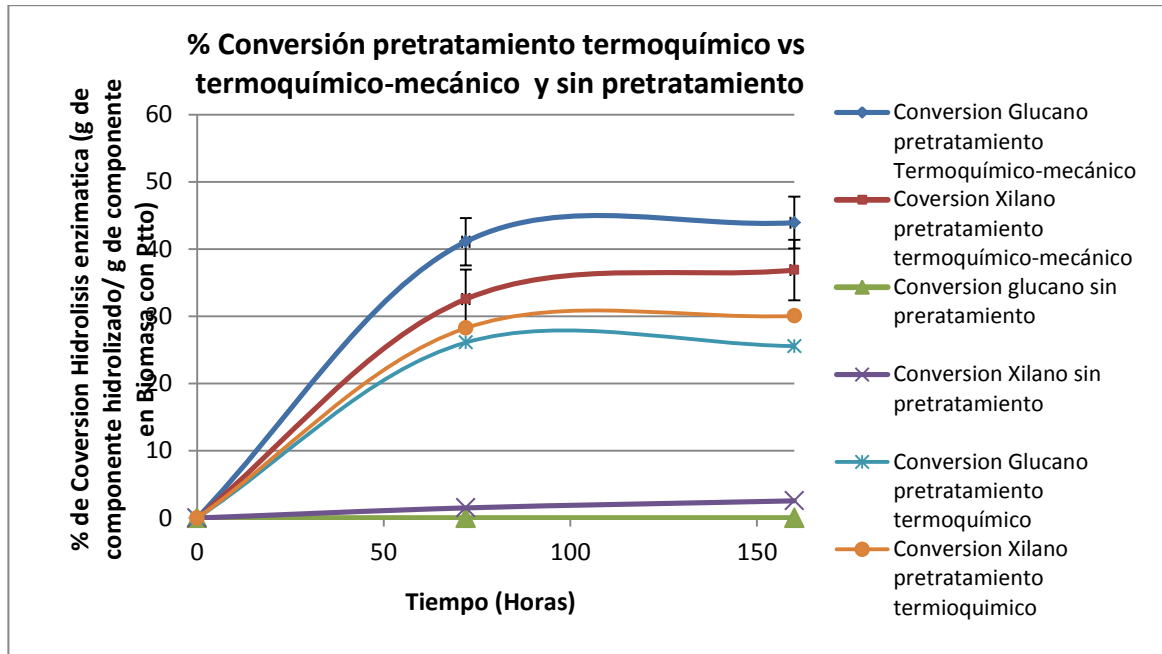
ANEXO F. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE PORCENTAJE DE CONVERSIÓN HIDROLISIS ENZIMÁTICA PARA EL PRETRATAMIENTO COMBINADO TERMOQUIMICO-MECANICO, PRETRATAMIENTO TERMOQUÍMICO Y MUESTRAS SIN PRETRATAMIENTO.

A continuación los perfiles de % conversión hidrolisis enzimática para cada corrida.

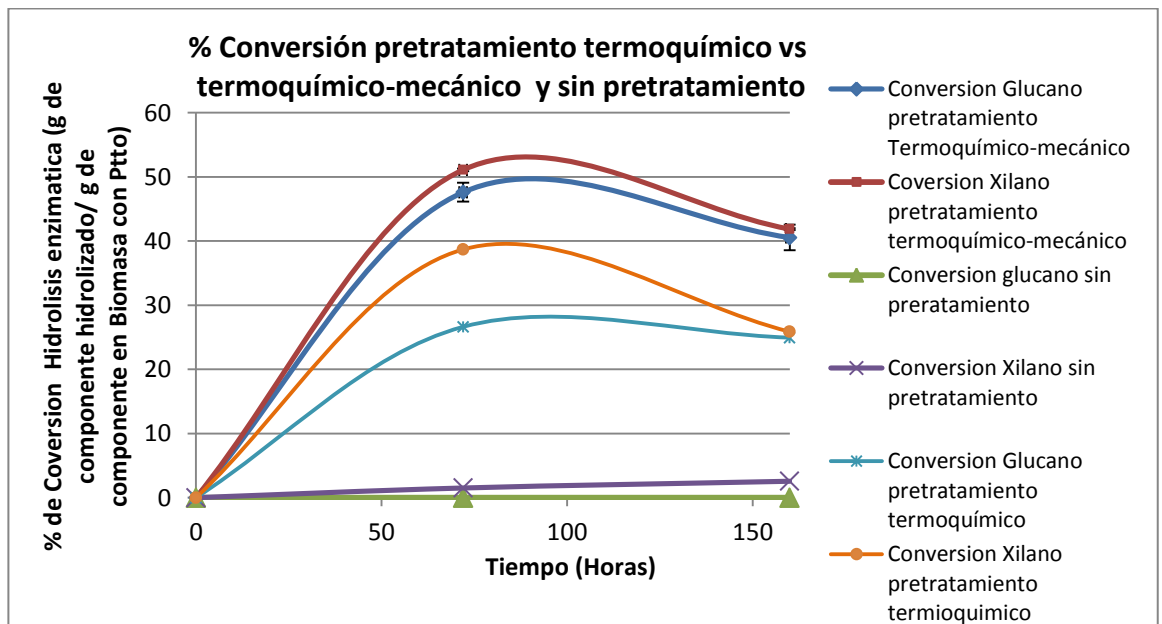
Perfil de % conversión hidrolisis enzimática corrida 1: H₂SO₄ 1% p/p-Autoclave 1 h 120°C - molino discos 80 rpm 10 % p/p



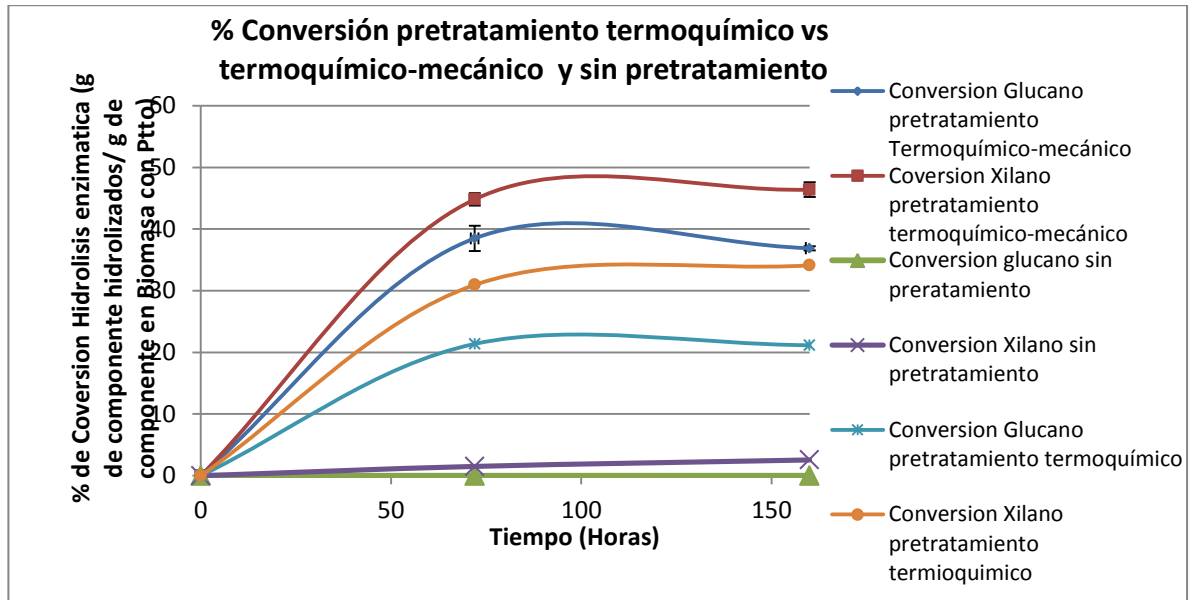
Perfil de % conversión hidrolisis enzimática corrida 2: H₂SO₄ 0,5% p/p-Autoclave 1 h 120°C - molino discos 80 rpm 10 % p/p



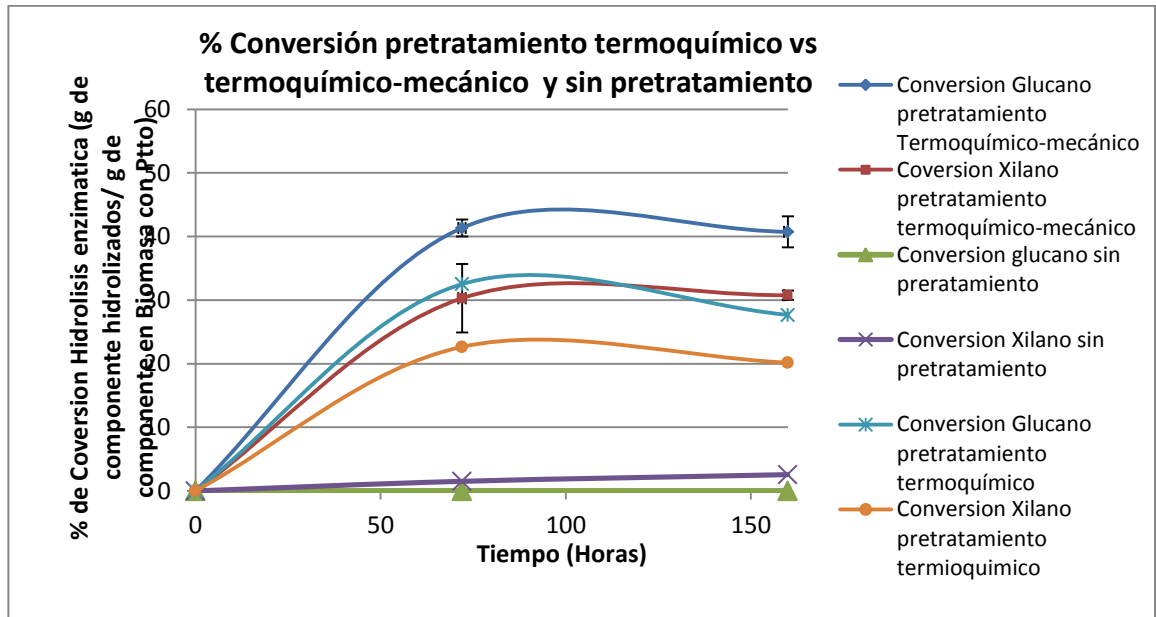
Perfil de % conversión hidrolisis enzimática corrida 3: H₂SO₄ 1% p/p-Autoclave 1 h 120°C - molino discos 80 rpm 25 % p/p



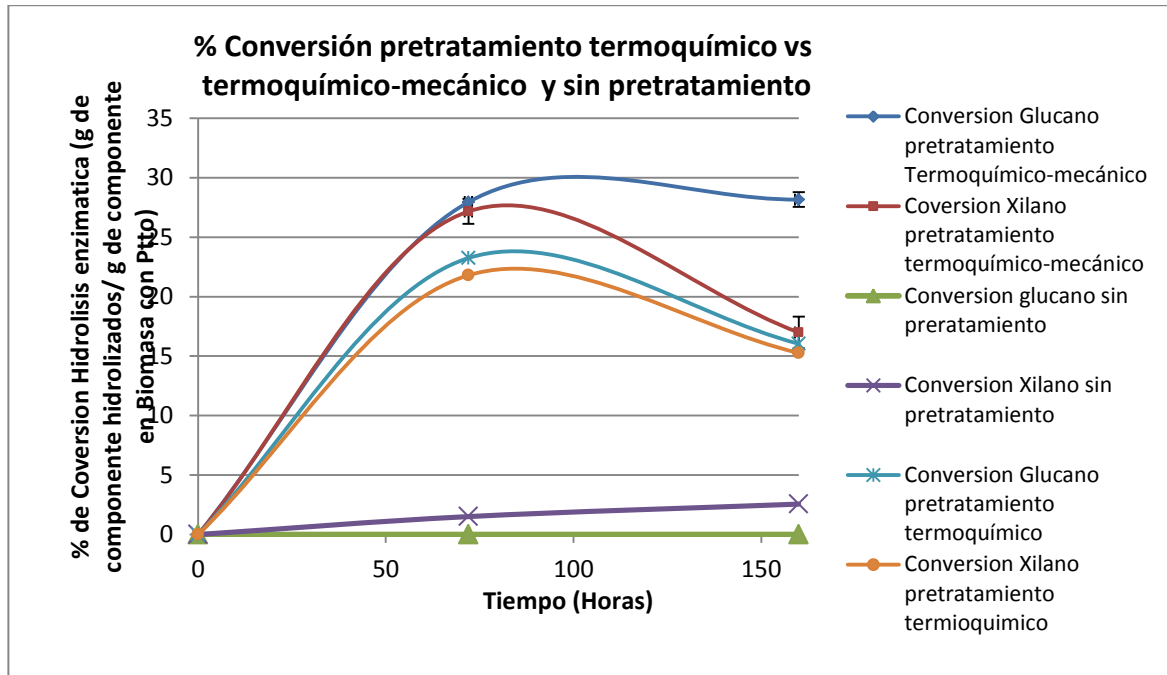
Perfil de % conversión hidrolisis enzimática corrida 4: H₂SO₄ 0,5% p/p-Autoclave 1 h 120°C - molino discos 80 rpm 25 % p/p



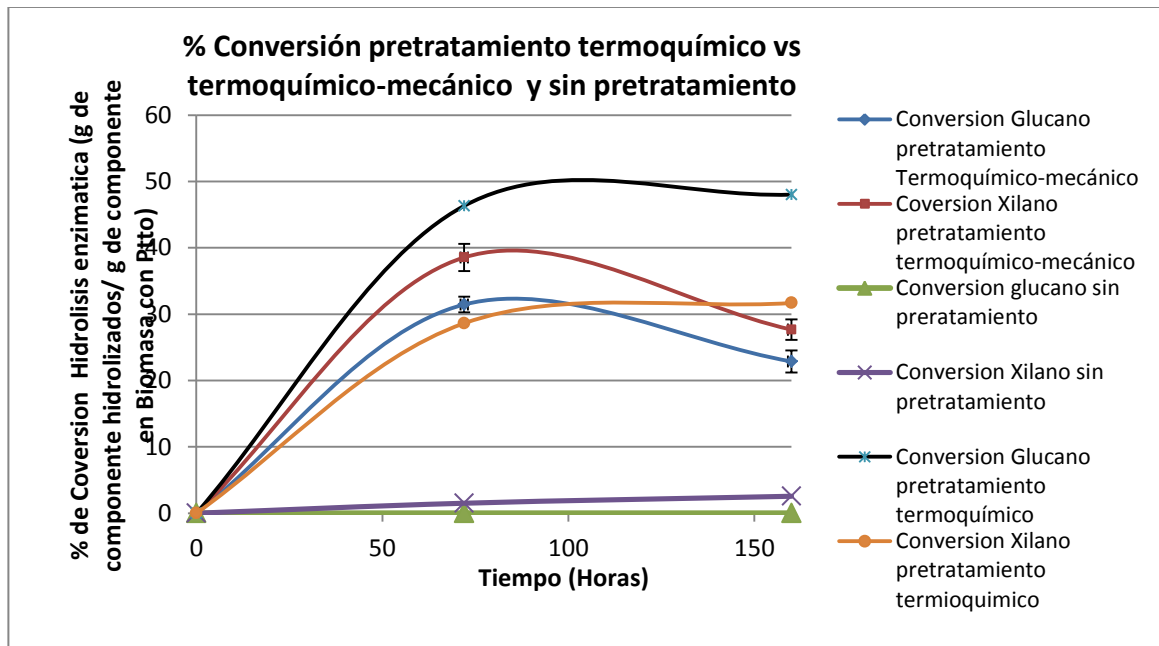
Perfil de % conversión hidrolisis enzimática corrida 5: H₂SO₄ 1% p/p-Autoclave 1 h 120°C - molino discos 160 rpm 10 % p/p



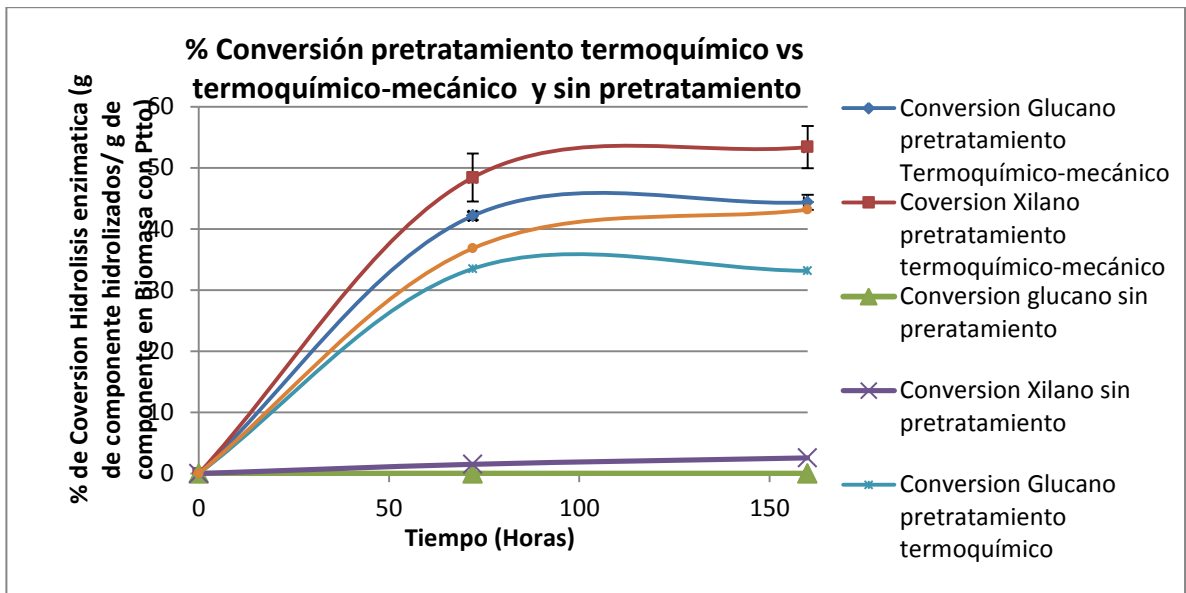
Perfil de % conversión hidrolisis enzimática corrida 6: H₂SO₄ 0,5% p/p-Autoclave 1 h 120°C - molino discos 160 rpm 10 % p/p



Perfil de % conversión hidrolisis enzimática corrida 7: H₂SO₄ 1% p/p-Autoclave 1 h 120°C - molino discos 160 rpm 25 % p/p

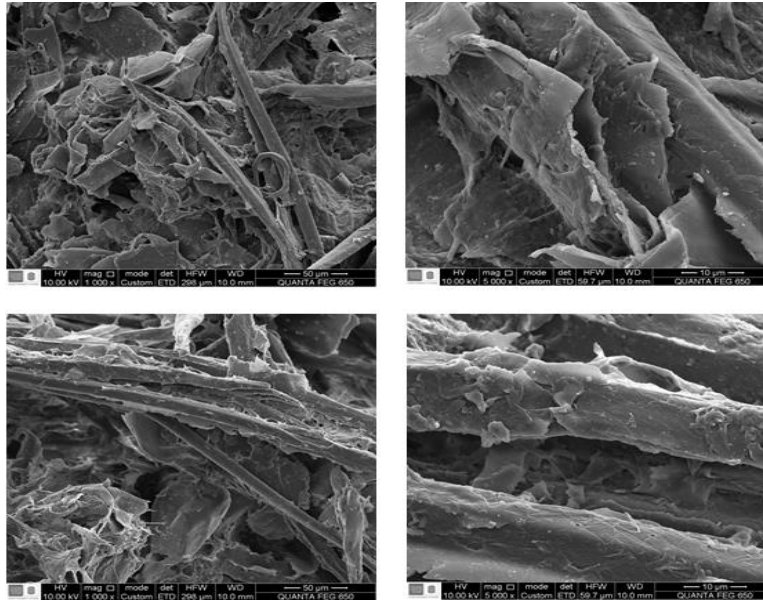


Perfil de % conversión hidrolisis enzimática corrida 8 H2SO4 0,5% p/p-Autoclave 1 h 120°C - molino discos 160 rpm 25 % p/p:

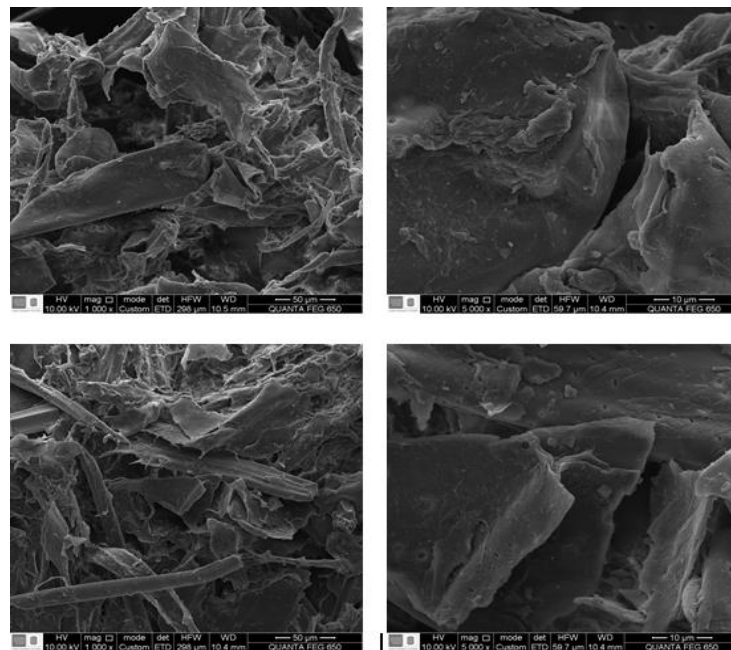


ANEXO G. IMÁGENES TOMADAS POR MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRONICO

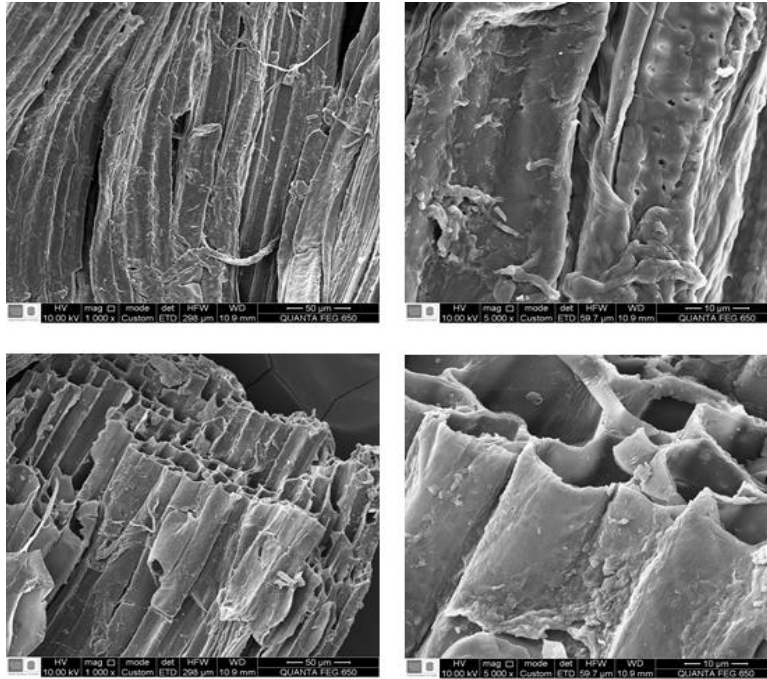
Fibra con pretratamiento termomecánico (H₂O-autoclave 120°C-molino de discos 80 rpm).



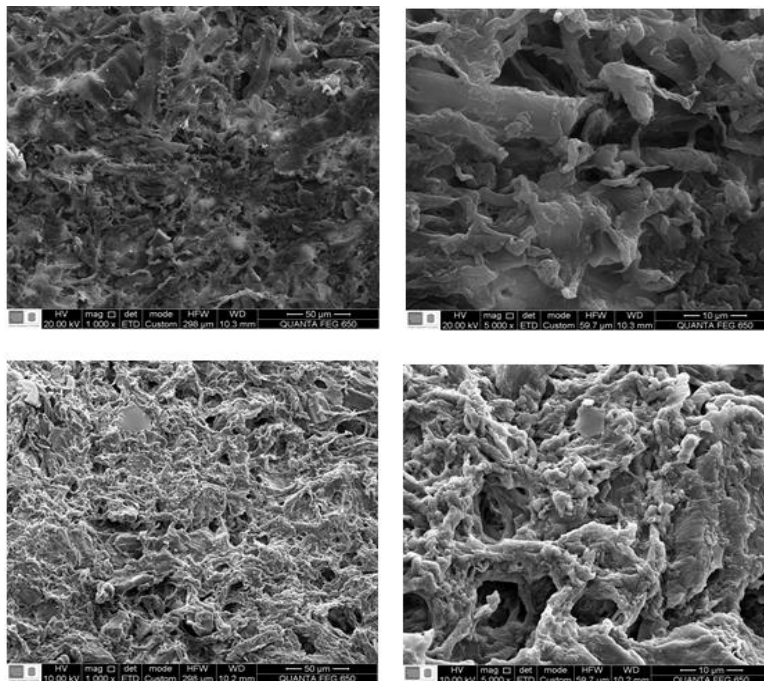
Fibra con pretratamiento mecánico (H₂O-molino de discos 80 rpm)



Fibra con pretratamiento termoquímico (H₂SO₄ 1% p/p–autoclave 120°C)



Fibra con pretratamiento termoquímico- mecánico (H₂SO₄ 1% p/p –autoclave 120°C –molino de discos 80 rpm)



ANEXO H. TERMINOLOGIA Y ECUACIONES

- Conversión total: gramos de componente hidrolizado en pretratamiento + gramos de componente hidrolizado en hidrolisis enzimatica con respecto al componente inicial.
- Componente inicial: gr de glucano o xilano presente en la biomasa sin pretratamiento.
- Conversión de la hidrolisis enzimática: componente hidrolizado en la hidrolisis - enzimática sobre componente presente en la biomasa con pretratamiento.
- Conversión en la etapa del pretratamiento: g de componente solubilizado / g de componente inicial
- Proceso: pretratamiento termoquimico-mecanico e hidrolisis enzimatica
- Componente: Glucano o Xilano
- Biomasa inicial: biomasa libre de humedad sin ningún pretratamiento
- Biomasa con pretratamiento: Biomasa sometida a tratamiento previo ya sea térmomecánico o termoquímico mecánico
- Peso seco: el peso de la biomasa matemáticamente corregida por la cantidad de humedad presente en la muestra en el momento del pesaje.
- Sólidos totales: La cantidad de sólidos que quedan después de calentar la muestra a 105 ° C a peso constante. Por el contrario, el contenido de humedad es una medida de la cantidad de agua (y otras componentes volatilizadas a 105 ° C), presente en una muestra.
- Sólidos insolubles: son aquellos sólidos que no se pueden disolver, formando un sistema heterogéneo en donde se puede observar partículas solidas en suspensión en el seno del fluido.
- Sólidos solubles: son aquellos que se pueden disolver, forman parte de ellos monómeros, oligómeros, cenizas estructurales y parte de lignina.
- Cenizas: El residuo inorgánico que queda después de la oxidación seca a 575 °C.

- Extractivos: Material que es soluble en agua o etanol. Extractos incluyen componentes no estructurales de muestras de biomasa que potencialmente podrían interferir con el análisis aguas abajo de la muestra de biomasa.
- Los componentes no estructurales: componentes no unidos químicamente de biomasa que incluyen pero no se limitan a sacarosa, nitratos / nitritos, proteínas, cenizas, clorofila, y ceras.
- Biomasa libre de extractivos: Biomasa después de la extracción con etanol y con agua.
- Lignina insoluble en Acido: El residuo que queda en un medio crisol filtrante de porosidad después de dos etapas de hidrólisis, con corrección para la ceniza insoluble en ácido y la proteína insoluble en ácido, si es necesario.
- Carbohidratos estructurales: hidratos de carbono poliméricos a saber, la celulosa y la hemicelulosa.

ECUACIONES UTILIZADAS

- Caracterizacion:

- $\% \text{ Sólidos Totales} = \left(\frac{m_2 - m}{m_1} \right) * 100$

Dónde:

m = Peso del Crisol (g)

m₁= Peso inicial de la Muestra (g)

m₂= Peso de la muestra seca más el Crisol(g)

- $\% \text{ Contenido de Cenizas} = \left(\frac{m_2 - m}{m_1} \right) * 100$

Dónde:

m = Peso del Crisol (g)

m₁= Peso inicial de la Muestra en base seca (g)

m₂= Peso de la muestra seca más el Crisol después de remover de la mufla (g)

- $\% \text{ Extractos} = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) * 100$

Dónde:

m_1 = Peso inicial de la Muestra (g)

m_2 = Peso final de la muestra (g)

- $\% \text{ Lignina insoluble en ácido} = \left(\frac{m_2 - m_3}{m_1 * \frac{\% \text{ sólidos Totales}}{100}} \right) * 100$

Dónde:

m_1 = Peso inicial de la Muestra (g)

m_2 = Peso del crisol más la muestra seca a 575° C (g)

m_3 = Peso del crisol y muestras después de remover de la mufla (g)

- $\% \text{ Lignina ácida soluble} = \left(\frac{\frac{A}{b * a} * df * V * \frac{L}{1000 \text{ ml}}}{m * \frac{\% \text{ sólidos Totales}}{100}} \right) * 100$

Dónde:

A = absorbancia a 240 nm

df = factor de dilución

b = Longitud de celda

a = absortividad, igual a 25L/g*cm

m = masa inicial de biomasa

- $\% \text{ carbohidrato (p/p)} = \left(\frac{c * v_f}{m * \frac{\% \text{ sólidos Totales}}{100} * FC} \right) * 100$

m_1 = Peso inicial de la muestra (g)

V_f = Volumen de filtrado 287 ml

C = Concentración de monosacáridos reportado en el HPLC, mg/mL

FC = Factor de corrección de la cantidad de monosacáridos degradados durante la segunda etapa de la hidrólisis

- $\% \text{ Celulosa (p/p)} = \text{Glucosa } \% (p/p) * \frac{162}{180}$

- $\% \text{ Hemicelulosa (p/p)} = \sum (\text{Xilosa} + \text{Arabinosa}) \% (p/p) * \frac{132}{150}$

-pretratamiento:

- %Glucano= $\frac{\text{g de glucano}}{\text{g de biomasa inicial}}$
- % Solubilización= $\frac{\text{g de biomasa solubilizada}}{\text{g de biomasa inicial}}$
- % componente hidrolizado en pretratamiento= $\frac{\text{g de azucar hidrolizados en pretratamiento}}{\text{g de glucan inicial}}$
- % Conversion hidrolisis enzimatica = $\frac{\text{g de componente hidrolizados}}{\text{g de componente en biomasa con pretratamiento}}$
- Conversión total= % (p/p) $\left(\frac{\text{g de azucar solubilizados en el proceso}}{\text{g de azucar inicial}} \right)$

- Hidrolisis enzimática:

Glucosa y xilosa hidrolizadas durante la hidrolisis enzimática:

- Cero horas= $\frac{\text{g}}{\text{l}} \left((0.012) + \frac{(\text{peso biomasa g}) - (\text{insolubles g})}{1000} \right) * 0.9$
- 72 horas= $\frac{\text{g}}{\text{l}} \left[\left((0.012) + \frac{(\text{peso biomasa g}) - (\text{insolubles g})}{1000} + 0.0005 \right) * 0.9 \right]$ - g de glucosa en cero horas.
- 160 horas= $\frac{\text{g}}{\text{l}} \left[\left((0.011) + \frac{(\text{peso biomasa g}) - (\text{insolubles g})}{1000} + 0.0005 + (\text{glucosa 72h} * 0.001) - \text{glucosa cero horas} \right) * 0.9 \right]$