

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA BASE NaOH,
DE LA CELULOSA Y CELOBIASA EN LA HIDRÓLISIS PARA LA PRODUCCIÓN
DE ETANOL A PARTIR DEL RASTROJO DE LA PIÑA**

PROYECTO DE GRADUACIÓN SOMETIDO A CONSIDERACIÓN DE LA ESCUELA
DE INGENIERÍA QUÍMICA COMO REQUISITO FINAL PARA OPTAR POR EL GRADO
DE LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA

MAUREEN DANIELA CÓRDOBA PÉREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

SAN JOSÉ, COSTA RICA

2011

Proyecto de graduación sometido a consideración de la Escuela de Ingeniería Química como
requisito final para optar por el grado de Licenciatura en
Ingeniería Química

Sustentante:

Maureen Daniela Córdoba Pérez

Aprobado por:

MSc. Alexander Vásquez Calvo
Profesor Adjunto
Escuela de Ingeniería Química

Presidente del Tribunal

Ing. Manuel Molina Córdoba
Profesor Asociado
Escuela de Ingeniería Química

Director del proyecto

M.Sc. Gerardo Chacón Valle
Profesor Asociado
Escuela de Ingeniería Química

Lector del proyecto

Lic. Isabel Carpio
Investigadora
Laboratorio de Productos Forestales

Lectora del proyecto

Ing. Bárbara Miranda M.
Profesora
Escuela de Ingeniería Química

Miembro Invitado

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
2011

“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”

Filipenses 4:13.

DEDICATORIA

La conclusión de esta etapa de mi vida se la dedico primero a Dios, porque Él es quien nos mantiene en pie y nos lleva de la mano por la vida, aunque no nos demos cuenta y nos olvidemos de él.

Y por supuesto, se lo dedico a mis padres, a doña Rafaela y a don Bernardino. Ellos me enseñaron que en la vida hay cosas más importantes que el dinero, como el amor, el respeto, la humildad, la responsabilidad. Que ser feliz depende de nosotros mismos, de lo que somos y no de lo que tenemos. Estoy aquí por ellos, por su apoyo y sacrificio. Tengo que darle gracias a Dios por haberme dado a estas personas maravillas como padres y tengo que pedirle que nos de vida, para poder retribuirles un poquito de todo lo que me han dado.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, a Dios, sin su ayuda no hubiese llegado hasta aquí, puso ángeles en mi camino que me ayudaron de diferentes formas.

A mi papá y a mi mamá, por la confianza y el apoyo que me dieron todos estos años. Gracias por estar siempre pendiente de mí. A ellos les debo todo lo que soy. Y a mi familia, por todo el apoyo brindado.

Al Ing. Manuel Molina, por su amistad y su confianza; por este proyecto y toda la ayuda brindada durante el proceso.

Al MSc. Gerardo Chacón por su colaboración en el proyecto.

A la Lic. Isabel Carpio, por su disposición y su ayuda.

A la Ing. Bárbara Miranda, por su ayuda.

A Ana Rodríguez por el trabajo en conjunto.

A mis compañeros, por todos los momentos compartidos en estos años de estudio.

A Tati y Hellen, por la amistad y el apoyo en momentos cuando estar lejos de mi familia pesaba más que cualquier carga que pueda llevar uno en la vida. Las quiero mucho chicas.

A la Familia Rodríguez Salas, por abrirme las puertas de su casa y brindarme su amistad. Por ser mi familia en estos años de estudio.

A las Familias Ayales Miranda, Briceño Volio y Pérez Vargas, por la ayuda brindada en diferentes etapas de mi vida.

A todas las personas, que de una u otra forma han formado parte de mi vida, me han brindado su apoyo, sus oraciones y sus buenos deseos. Gracias, siempre voy a estar agradecida con Dios y con la vida por conocer tantas personas con un corazón muy grande.

RESUMEN

El objetivo de este proyecto fue determinar el efecto de la concentración hidróxido de sodio y de la concentración de celulasa y celobiasa en la hidrólisis para la producción de etanol a partir del rastrojo de la piña.

Primeramente se caracterizó el rastrojo de la piña y se encontró que contiene un 86,4% de humedad, 12,06% de cenizas, la solubilidad en agua caliente y agua fría es de 20,5% y 13,86% respectivamente, un 17,28% de sus compuestos son solubles en una mezcla de etanol-ciclohexano, contiene un 66,2% de holocelulosa y 8,3% lignina.

Al pretratar el material con concentraciones de NaOH de 0,75%, 1,00%, 1,25% y 1,50% (m/v) por un tiempo de 10, 20, 30 y 40 minutos no hay ningún efecto significativo en la concentración y rendimientos de glucosa por lo que se utiliza en las demás etapas experimentales un tiempo de pretratamiento de 25 minutos.

Se realiza la hidrólisis enzimática de muestras pretratadas con NaOH al 1,00% y 1,25% (m/v) a una temperatura de 121 °C por 25 minutos. La concentración de celulasa utilizada fue de 10, 15 y 20 FPU/g; y una relación celulasa:celobiasa (v:v) de 5:1, 7:1 y 9:1 respectivamente. La temperatura se mantuvo en 50 °C y la agitación en 70 rpm. Estadísticamente, no hay diferencia significativa entre la concentración de hidróxido de sodio y la relación de enzima celulasa:celobiasa. Para la siguiente etapa, se utilizó una concentración de NaOH de 1,00% en la etapa de pretratamiento y una relación de enzimas de 7:1.

Se realiza la sacarificación y fermentación simultáneas de diferentes concentraciones de rastrojo. A las 25 horas de hidrólisis, los rendimientos de glucosa fueron de 56,26% para la concentración de rastrojo de 25,10 g/L, 52,45% para la concentración de 35,10 g/L y 50,33% para la concentración de 50,30 g/L. En cuanto a las pentosas los rendimientos fueron de 48,9%, 30,19% y 25,69%, respectivamente, estos compuestos no son consumidos en la etapa de fermentación y se pueden descomponer en subproductos inhibidores. La concentración de etanol promedio obtenida es de 1,87% v/v.

En la última etapa experimental se evalúa el efecto de la presencia de clorofila en la sacarificación y fermentación simultánea del rastrojo de la piña. Se utilizó una concentración de rastrojo de 35 g/L. A las 25 horas de hidrólisis, el rendimiento de glucosa promedio para las muestras cuyo líquido se centrifugó para reducir la presencia de clorofila fue de 47,90% y el rendimiento de pentosas, 25,63%. Las muestras cuyo líquido no se centrifugó tuvieron un rendimiento de glucosa de 45,12% y un rendimiento de pentosas de 22,76%. La concentración promedio de etanol obtenida es de 0,8% v/v para todas las muestras. Estadísticamente, la presencia de clorofila no afecta la producción de etanol.

La concentración de etanol obtenida con el rastrojo de la piña como materia prima para la producción de etanol es baja comparado con otros materiales que se utilizan en la industria. Se debe investigar y mejorar las condiciones de la hidrólisis y fermentación para determinar si es viable su uso para este propósito.

Se recomienda extraer la fibra del rastrojo con una desfibradora y mejorar la etapa de lavado del pretratamiento y el sistema de agitación durante la hidrólisis.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	v
INDICE.....	vii
INDICE DE CUADROS	ix
INDICE DE FIGURAS	xiii
CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Alcances del proyecto.....	2
CAPÍTULO 2 ASPECTOS GENERALES	3
2.1 Materiales lignocelulósicos	3
2.2 Cultivo de piña y características del rastrojo.....	4
2.2.1 Planta de piña	4
CAPÍTULO 3 PRETRATAMIENTO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	9
3.1 Tipos de pretratamiento	9
CAPÍTULO 4 HIDRÓLISIS DE LA CELULOSA Y FERMENTACIÓN DE LOS AZÚCARES LIBERADOS.....	12
4.1 Hidrólisis ácida	12
4.2 Hidrólisis enzimática	12
4.3 Factores que afectan el proceso de hidrólisis enzimática	14
4.4 Sacarificación y Fermentación Simultáneas	14
CAPITULO 5 MATERIALES, EQUIPO Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	16
5.1 Materiales	16
5.2 Equipo Experimental	16
5.3 Métodos de análisis	18
5.4 Caracterización del rastrojo de la piña	20
5.5 Pretatamiento del rastrojo de la piña	21
5.6 Hidrólisis Enzimática	24
5.7 Sacarificación y fermentación simultáneas.	26
CAPITULO 6 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	29
6.1 Composición del rastrojo de la piña	29

6.2 Pretratamiento a diferentes concentraciones de NaOH: Primera etapa experimental.	29
6.3 Diferentes tiempos de pretratamiento: Segunda etapa.	33
6.4 Determinación del efecto de la concentración de NaOH y de celulasa y celobiasa en la hidrólisis	34
6.6 Evaluación del efecto de la presencia de clorofila en el proceso de fermentación: quinta etapa experimental.	42
CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
7.1 CONCLUSIONES.	44
7.2 RECOMENDACIONES	45
NOMENCLATURA.	46
BIBLIOGRAFÍA	47
APÉNDICES	50
APÉNDICE A DATOS EXPERIMENTALES	51
APÉNDICE B RESULTADOS INTERMEDIOS	60
APÉNDICE C MUESTRA DE CÁLCULO.	68
APÉNDICE D PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.	72

INDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Propiedades químicas del rastrojo de piña.	6
Cuadro 5.1 Reactivos utilizados en el desarrollo de las etapas experimentales del proyecto. .	17
Cuadro 5.2 Equipo utilizado para la realización del proyecto.	17
Cuadro 5.3 Ecuaciones de las curvas de calibración para la cuantificación de glucosa mediante el método de Trinder.	19
Cuadro 5.4 Diseño de bloques para la segunda etapa experimental.	24
Cuadro 5.5 Niveles de las variables en el diseño de bloques.	25
Cuadro 6.1 Composición del rastrojo de la piña.	29
Cuadro 6.2 Resultados del análisis de Varianza de la segunda etapa experimental.	34
Cuadro 6.3 Rendimientos de glucosa para la tercera etapa experimental.	35
Cuadro 6.4 Análisis de Varianza.	36
Cuadro 6.5 Concentración y rendimientos de glucosa al inicio de la fermentación.	37
Cuadro 6.6 Concentración y rendimiento de pentosas al inicio de la fermentación.	39
Cuadro 6.7 Concentración de etanol para las diferentes concentraciones de rastrojo.	41
Cuadro 6.8 Concentración de glucosa y azúcares reductores al finalizar la fermentación.	41
Cuadro 6.9 Concentración y rendimiento de glucosa y pentosas al inicio de la fermentación.	42
Cuadro 6.10 Resultados de la prueba de <i>t-student</i> del rendimiento de glucosa en las muestras de la quinta etapa experimental.	43
Cuadro A.1 Datos para la elaboración de la solución madre de glucosa para el método de Trinder (Primera y Quinta etapa).	51
Cuadro A.2 Datos para la curva de calibración para la determinación de glucosa mediante el método de Trinder (Primera y Quinta Etapa).	51
Cuadro A.3 Datos para la elaboración de la curva de calibración para determinar azúcares reductores mediante el método de Nelson Somogyi para la determinación de la actividad de la celulasa.	51
Cuadro A.4 Datos para la elaboración de la curva de calibración para determinar pentosas mediante el método de Bial modificado por Horecker.	51
Cuadro A.5 Datos para la construcción de la curva de calibración de etanol a 20 °C.	52

Cuadro A.6 Resultados para la medición de la actividad de la celulasa empleando el método de Nelson Somogyi. Absorbancias medidas con un factor de dilución de 13,33.....	52
Cuadro A.7 Datos para la determinación de humedad de las muestras de rastrojo.	52
Cuadro A.8 Datos para la determinación del porcentaje de cenizas del rastrojo de la piña. ...	52
Cuadro A.9 Datos para la determinación de la solubilidad del rastrojo de la piña en agua caliente.....	53
Cuadro A.10 Datos para la determinación de la solubilidad del rastrojo de la piña en agua fría.	53
Cuadro A.11 Datos para la determinación de la solubilidad del rastrojo de la piña en etanol/ciclohexano.....	53
Cuadro A.12 Datos para la determinación del porcentaje de lignina presente en el rastrojo de la piña.	53
Cuadro A.13 Datos para la determinación del contenido de holocelulosa del rastrojo de la piña.	53
Cuadro A.14 Condiciones utilizadas para la primer etapa experimental.	53
Cuadro A.15 Absorbancias obtenidas para la determinación de glucosa mediante el método de Trinder en la primera etapa experimental con un factor de dilución de 20.	54
Cuadro A.16 Condiciones utilizadas en la segunda etapa experimental.....	54
Cuadro A.17 Absorbancias obtenidas por el método de Trinder para las muestras de la segunda etapa experimental con un factor de dilución de 20. Tiempo de pretratamiento: 10 minutos.	54
Cuadro A.18 Absorbancias obtenidas por el método de Trinder para las muestras de la segunda etapa experimental con un factor de dilución de 10. Tiempo de pretratamiento: 20 minutos.	55
Cuadro A.19 Absorbancias obtenidas por el método de Trinder para las muestras de la segunda etapa experimental con un factor de dilución de 10. Tiempo de pretratamiento: 30 minutos.	55
Cuadro A.20 Absorbancias obtenidas por el método de Trinder para las muestras de la segunda etapa experimental con un factor de dilución de 10. Tiempo de pretratamiento: 40 minutos.	55
Cuadro A.21 Condiciones experimentales utilizadas en la tercera etapa experimental.....	56

Cuadro A.22 Volumen de celulasa utilizado en la tercera etapa experimental.....	56
Cuadro A.23 Absorbancias obtenidas por el método de Trinder para las muestras de la tercera etapa experimental con un factor de dilución de 50.	56
Cuadro A.24 Condiciones utilizadas en la cuarta etapa experimental.	56
Cuadro A.25 Absorbancias obtenidas con el método de Trinder para las muestras de la cuarta etapa experimental en el tiempo cero de la fermentación con un factor de dilución de 50 y en el caldo de fermentación con un factor de dilución de 2,5.	57
Cuadro A.26 Absorbancias obtenidas mediante el método de Bial modificado por Horecker para las muestras de la cuarta etapa experimental en el tiempo cero de la fermentación para un factor de dilución de 800.	57
Cuadro A.27 Absorbancias obtenidas mediante el método de Nelson Somogyi para las muestras de la cuarta etapa experimental al finalizar la fermentación con un factor de dilución de 100 y por el método de Trinder para un factor de dilución de 2,5.	57
Cuadro A.28 Índice de refracción medido a 20 C de las muestras destiladas de la cuarta etapa experimental.	58
Cuadro A.29 Condiciones utilizadas en la quinta etapa experimental.	58
Cuadro A.30 Absorbancias obtenidas para las muestras de la quinta etapa experimental en el tiempo cero de la fermentación con el método de Trinder con un factor de dilución de 50 y con el método de Bial modificado por Horecker con un factor de dilución de 800.....	58
Cuadro A.31 Absorbancias obtenidas mediante el método de Nelson Somogyi para las muestras de la cuarta etapa experimental al final de la fermentación para un factor de dilución de 100.	58
Cuadro A.32 Índice de refracción medido a 20 C de las muestras destiladas de la quinta etapa experimental.	59
Cuadro B.1 Datos para la elaboración de la curva de calibración para determinar glucosa mediante el método de Trinder para la primera y quinta etapa experimental.	60
Cuadro B.2 Valores de los parámetros de la ecuación de mejor ajuste para la curva de calibración del método de Trinder para la primera y quinta etapa experimental.	60
Cuadro B.3 Valores de los parámetros de la ecuación de mejor ajuste para la curva de calibración del método de Nelson Somogyi.	61

Cuadro B.4 Valores de los parámetros de la ecuación de mejor ajuste para la curva de calibración del método de Bial modificado por Horecker.....	62
Cuadro B.5 Valores de los parámetros de la ecuación de mejor ajuste para la curva de calibración para la determinación del porcentaje de etanol.....	62
Cuadro B.6 Resultados para la determinación de la actividad de la celulasa.	62
Cuadro B.7 Valores de los parámetros para determinar la actividad de la celulasa.	62
Cuadro B.8 Humedad del rastrojo de la piña	63
Cuadro B.9 Cantidad de cenizas presentes en el rastrojo de la piña.	63
Cuadro B.10 Solubilidad del rastrojo de la piña en agua caliente	63
Cuadro B.11 Solubilidad del rastrojo de la piña en agua fría.	63
Cuadro B.12 Solubilidad del rastrojo de la piña en una mezcla de etanol-ciclohexano.	63
Cuadro B.13 Resultados para el porcentaje de lignina en el rastrojo de la piña.	63
Cuadro B.14 Resultados para el porcentaje de holocelulosa presente en el rastrojo de la piña.	63
Cuadro B.15 Concentración de glucosa en las muestras de la primera etapa experimental. ...	64
Cuadro B.16 Rendimientos de glucosa de las muestras de la primera etapa experimental.	64
Cuadro B.17 Concentración y rendimientos de glucosa de las muestras de la segunda etapa experimental para un tiempo de pretratamiento de 10 minutos.....	64
Cuadro B.18 Concentración y rendimientos de glucosa de las muestras de la segunda etapa experimental para un tiempo de pretratamiento de 20 minutos.....	65
Cuadro B.19 Concentración y rendimientos de glucosa de las muestras de la segunda etapa experimental para un tiempo de pretratamiento de 30 minutos.....	65
Cuadro B.20 Concentración y rendimientos de glucosa de las muestras de la segunda etapa experimental para un tiempo de pretratamiento de 40 minutos.....	65
Cuadro B.21 Concentración de glucosa de las muestras de la tercera etapa experimental.	66
Cuadro B.22 Concentración de azúcares reductores en el caldo de fermentación de las muestras de la quinta etapa experimental.	66
Cuadro B.23 Resultados de la prueba de <i>t-student</i> del rendimiento de pentosas en las muestras de la quinta etapa experimental.	66
Cuadro B.24 Rendimientos de glucosa calculados con el modelo y residuos para la cuarta etapa experimental.....	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Planta de piña (Gutiérrez, 2009).	5
Figura 5.1 Equipos utilizados en el pretratamiento, hidrólisis y fermentación, a) Incubadora, b) Espectrofotómetro y c) Autoclave.....	18
Figura 6.1 Rendimientos de glucosa a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio.	30
Figura 6.2 Micrografía de la muestra de rastrojo sin pretratamiento (aumento 4X).....	31
Figura 6.3 Micrografía de la muestra de rastrojo pretrada con hidróxido de sodio al 1,00% (m/v), a) aumento 4X, b) aumento 10X.	31
Figura 6.4 Micrografía de la muestra de rastrojo pretratada con hidróxido de sodio al 1,25% (m/v), aumento 4X.....	32
Figura 6.5 Micrografía de la muestra de rastrojo pretratada con hidróxido de sodio al 1,50% (m/v), a) aumento 4X, b) aumento 10X.	32
Figura 6.6 Micrografía de la muestra de rastrojo pretratada con hidróxido de sodio al 2,00% (m/v), a) aumento 4X, b) aumento 10X.	32
Figura 6.7 Concentración de glucosa a diferentes tiempos y concentraciones de NaOH en la etapa de pretratamiento.....	33
Figura 6.8 Concentración de glucosa en el tiempo cero de fermentación.....	37
Figura 6.9 Rendimientos de glucosa en el tiempo cero de fermentación.....	38
Figura 6.10 Análisis de residuos para el rendimiento de glucosa.	39
Figura 6.11 Rendimientos de pentosas al inicio de la fermentación.	40
Figura 6.12 Micrografías de la fibra pretratada con 1,00% (m/v) de NaOH.....	40
Figura B.1 Curva de calibración para la determinación de glucosa mediante el método de Trinder para la primera y quinta etapa experimental.....	60
Figura B.2 Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores mediante el método de Nelson Somogyi.....	61
Figura B.3 Curva de calibración para la determinación de pentosas mediante el método de Bial modificado por Horecker.	61
Figura B.4 Curva de calibración para la determinación del porcentaje de etanol.....	62

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

La demanda de etanol para su utilización como combustible ha aumentado en los últimos años. Según el Informe del Estado Global de los Renovables (REN21, 2010), la producción de bioetanol en el mundo para el 2009 ha sustituido cerca del 4% de la producción mundial de gasolinas. La incertidumbre relacionada con la disponibilidad de fuentes de petróleo a largo plazo, la fluctuación en los precios del mismo así como los problemas de contaminación, ha inclinado la balanza hacia el uso de etanol como aditivo de la gasolina.

Las materias primas para la producción del bioetanol incluyen mieles y jugos ricos en sacarosa de fábricas azucareras, productos agrícolas ricos en almidón y materiales lignocelulósicos. Sin embargo, la producción de etanol a partir de productos que contienen almidón está cuestionada debido a que se está utilizando un alimento para la producción de energía, comprometiendo su disponibilidad y aumentando los precios para los consumidores.

Los materiales lignocelulósicos se perfilan como una fuente alternativa que no presenta el problema de los materiales amiláceos y están disponibles en grandes cantidades. Su composición es básicamente lignina, celulosa y hemicelulosa. La celulosa y hemicelulosa se pueden degradar en azúcares fermentables mediante el uso de enzimas y la aplicación de un pretratamiento previo para exponer las fibras de celulosa a la acción de las enzimas.

Los estudios realizados con diferentes materiales buscan disminuir los costos asociados con el proceso de hidrólisis y fermentación para la producción de etanol. Esto ha llevado a la utilización del método de Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS), un proceso en el cual hay un aumento en la velocidad de la hidrólisis, la cantidad de enzima requerida es menor y el tiempo de proceso es más corto.

1.1 Alcances del proyecto

El objetivo de este proyecto es determinar el efecto de la concentración de base (NaOH), de celulasa y celobiasa en la hidrólisis para la producción de etanol a partir del rastrojo de la piña.

Se realizaron cinco etapas experimentales. El objetivo de la primera etapa experimental era determinar los niveles de concentración de hidróxido de sodio a utilizar en el pretratamiento del material con los cuales se obtengan mayores rendimientos en la hidrólisis enzimática.

La segunda etapa se realizó con el objetivo de fijar el tiempo de pretratamiento para las siguientes etapas experimentales con el cual se obtengan mayores rendimientos de glucosa en la hidrólisis enzimática.

La tercera etapa consistió en la hidrólisis de muestras de rastrojo pretratadas con dos concentraciones de hidróxido de sodio diferentes y la utilización de tres niveles de concentración de celulasa manteniendo fija la concentración de la celobiasa, trabajando de esta forma con tres relaciones celulasa:celobiasa (v:v).

Para la cuarta etapa se fijó la concentración de NaOH y la relación celulasa:celobiasa; y se realizó el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas para la producción de etanol con diferentes concentraciones de sustrato.

La quinta etapa se realizó con el objetivo de determinar si la clorofila afecta el rendimiento en la hidrólisis y fermentación para la producción de etanol usando el rastrojo de piña como materia prima.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS GENERALES

En este capítulo se describe la composición de los materiales lignocelulósicos y aspectos relacionados con el cultivo de piña en Costa Rica.

2.1 Materiales lignocelulósicos

La lignocelulosa es el componente principal de las paredes celulares vegetales, consiste principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina junto con pequeñas cantidades de pectina, proteínas, clorofila, grasas y cenizas. El porcentaje que representa cada uno de estos constituyentes depende del tipo de planta (Kumar, Barret, Delwiche, & Stroeve, 2009).

2.1.1 Celulosa

La celulosa es un polisacárido formado por subunidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4- glucosídicos. La unión de las moléculas mediante puentes de hidrógeno en la celulosa forma una estructura lineal ordenada que representa entre un 50-90% de la celulosa total, la otra parte tiene un arreglo desordenado o amorfo (Foyle, Jennings, & Mulcahy, 2007). La celulosa conforma de un 30 a 60% de la planta (Balat, 2010).

La celobiosa es la unidad repetitiva que constituye las cadenas de celulosa. Esta última es más susceptible a la degradación enzimática en su forma amorfa (Kumar et al, 2009).

La celulosa es el material renovable más abundante, tiene un grado de polimerización de 500 a 15 000 unidades. La mayoría de la celulosa es cristalina, siendo insoluble y resistente al ataque de enzimas y al ataque microbiano.

2.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero heterogéneo que representa, en general, 15-35% de la biomasa de la planta. Consiste en cadenas cortas y ramificadas de azúcares. Contiene azúcares de cinco carbonos, generalmente xilosa y arabinosa, azúcares de seis carbonos como galactosa, glucosa y manosa, así como ácidos úronicos (Girío et al, 2010).

La hemicelulosa sirve como conexión entre la lignina y las fibras de celulosa. Debido a su naturaleza ramificada, es amorfa y relativamente fácil de hidrolizar a sus azúcares constitutivos.

2.1.3 Lignina

La lignina tiene una estructura amorfa que consiste en unidades diferentes de fenilpropano. La función principal de la lignina es dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad, resistencia contra ataques microbianos y al estrés oxidativo. Es insoluble en agua y ópticamente inactiva lo que la hace difícil de degradar (Hendricks & Zeeman, 2009). No contiene azúcares pero encierra a la celulosa y hemicelulosa que sí los contienen e impide que sean alcanzadas para ser hidrolizadas.

Los monómeros que forman la lignina se denominan alcoholes cinamílicos diferenciados entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático. Estos alcoholes son el p-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Lozanoff et al, 2007).

La lignina puede ser utilizada para la generación de energía térmica, su valor energético depende de la fuente de biomasa y varía entre 20 934 y 27 912 kJ/kg. También, puede ser procesada, dependiendo de la calidad de la misma, en productos de alto valor económico como plastificantes, polímeros conductores de electricidad o resinas fenólicas (Lozanoff et al, 2007).

2.2 Cultivo de piña y características del rastrojo

2.2.1 Planta de piña

La piña pertenece a la familia Bromeliaceae, género *ananas*, especie *comosus*. Es una planta monocotiledónea herbácea. El tallo de la piña es corto y compacto teniendo una longitud máxima de 35 cm, con un diámetro base de 2 a 3,5 cm, y 5,5 a 7 cm en la parte más compacta. Las hojas cuyo número oscila entre 70 y 100 forman una roseta, son lanceoladas y muy elongadas, algunas veces llegan a un máximo de longitud de 100 cm y un ancho de 7 cm, emergen del tallo teniendo un aproximado de dos tercios de la circunferencia de éste. El número de espinas cambia de acuerdo con la variedad (Picado & Vásquez, 2004). En la Figura

2.1 se presenta una planta de piña, en ella se observa el fruto, la corona y las hojas largas de la planta a las que se les llama rastrojo.



Figura 2.1 Planta de piña (Gutiérrez, 2009).

El rastrojo de la piña es una especie no maderable. Una de sus partes constituyentes es el parénquima, el cual es un tejido fundamental que cumple diversas funciones como la fotosíntesis y la elaboración y almacenamiento de sustancias. Almacena diversas sustancias como hidratos de carbono, proteínas y grasas (Fuentes, 2001). Para que las enzimas actúen sobre la celulosa debe eliminarse el tejido parenquimático.

2.2.2 Cultivo de Piña: Productividad

Los principales desechos agrícolas son los residuos de la industrialización de productos tradicionales como el café y el banano; y los no tradicionales como la piña y la naranja. En el caso de la piña, las exportaciones han aumentado en los últimos años. Se estimó que la producción neta del año 2009 sería de 2 millones de TM aproximadamente para un área bruta entre 50 000 y 51 000 hectáreas (Elizondo, 2009).

Las principales variedades que se cultivan en el país son *Cayena lisa*, *champaka* y MD2. Se produce principalmente en zonas como Buenos Aires de Puntarenas, Pérez Zeledón, Sarapiquí, San Carlos, Siquirres y Guápiles, pero la mayor producción de piña en Costa Rica se da en la

región Huetar Norte: Pital, Río Cuarto, Guatuso y Sarapiquí. En Pital se concentra el 37% de la producción, seguida por Río Cuarto con un 18%, Guatuso 13% y Aguas Zarcas 8%. (Barrientos & Porras, 2010).

2.2.3 Rastrojo de la piña

El rastrojo corresponde a las hojas de la planta de piña, las cuáles son extremadamente fibrosas, tenaces y abrasivas debido a su alto contenido de silicio. Contienen también cordones de fibra, específicos de la piña que le confiere gran resistencia a la torsión (Quesada, Alvarado, Sibaja, & Vega, 2005).

Debido a la morfología de las hojas, las plantas de piña se secan muy lentamente y los renuevos producidos por los tallos de las plantas vivas incorporados al suelo pueden proliferar en los campos, por lo que comúnmente se cortan para acelerar su desecación y descomposición (Quesada et al, 2005).

El rastrojo de piña es un material de desecho del sector agrícola generado en grandes volúmenes. Su degradación es lenta por lo que se ha convertido en un problema ambiental.

Para la variedad *cayena lisa*, cultivada en la Zona Norte y Sur de Costa Rica, se reporta la siguiente composición en base seca:

Cuadro 2.1 Propiedades químicas del rastrojo de piña.

	Zona Norte	Zona Sur
Solubilidad en NaOH (%)	57	63
Extractos totales (%)	47	39
Solubilidad en agua caliente (%)	39	31
Solubilidad en agua fría (%)	24	23
Lignina (%)	13	14
Cenizas (%)	8	7
Holocelulosa (%)	32	40

Fuente: (Araya, 1998)

2.2.4 Disponibilidad de material lignocelulósico

Los desechos de la industrialización de la piña constituyen hasta el 65% del fruto. Además de la corona, el corazón y las cáscaras, se genera el rastrojo, el cuál corresponde a material vegetal de la planta y se elimina después del ciclo comercial. Se ha determinado que, por

hectárea de piña cultivada, se genera cerca de 300 TM de rastrojo, siendo el cultivo de la piña el que genera más desechos agroindustriales.

Alrededor de 1,5 millones de toneladas métricas de rastrojo se transforman en desecho representando más de la mitad de la biomasa implicada, llegando a duplicar el valor del producto mismo (MINAET, MAG, & PROAGROIN, 2009).

El ciclo de producción a nivel comercial de la planta de piña es de 27 meses durante el cual se cosechan dos piñas por planta. La primera cosecha es a los 15 meses y la segunda, 12 meses después. Finalizado este periodo, debe eliminarse la biomasa y preparar el suelo para iniciar un nuevo ciclo de producción (Quesada et al, 2005).

Conforme aumenta el número de hectáreas de piña sembradas, el volumen de desechos generados en la plantación y en los procesos también incrementa generando un problema debido a su lenta degradación.

Los datos respecto a la generación de desechos en la producción de piña preocupan a autoridades nacionales y otros organismos que buscan evitar el deterioro ambiental. Es por esto que es necesario buscar alternativas para el manejo de tanta biomasa y disminuir el consumo de agroquímicos, que si no se tratan de una forma adecuada pueden llegar a contaminar suelos, ríos y el ambiente en general.

2.2.5 Problemas de contaminación asociados con el rastrojo de la piña

Los productores de piña aplican herbicidas como desecante de la planta para después cortarlo y en algunas ocasiones quemarlo. Esta práctica no es adecuada desde el punto de vista ambiental, dado que la aplicación de estos productos químicos se verá reflejada en la afectación del ambiente en cualquier momento.

El herbicida más utilizado es el conocido comercialmente como Paraquat. Este químico presenta una toxicidad acumulativa, afecta el medio ambiente y contamina de forma considerable los suelos (Quesada et al, 2005).

Otro de los problemas que se presentan como consecuencia del manejo del rastrojo y de los desechos relacionados con el cultivo de piña es la proliferación de la mosca de los establos

(*Stomoxys calcitrans*). El proceso de descomposición de la materia orgánica favorece la mosca porque le sirve como medio para completar su ciclo biológico. Esta situación afecta directamente al ganado bajando su producción de leche y carne debido a que estresan al animal (MINAET, MAG, & PROAGROIN, 2009).

CAPÍTULO 3

PRETRATAMIENTO DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

La lignina y la hemicelulosa actúan como una barrera de protección de la celulosa. Para hidrolizar la celulosa y posteriormente, realizar la fermentación de los azúcares, es necesario pretratar el material lignocelulósico, en este caso el rastrojo de la piña, para modificar su estructura, eliminando la lignina y hemicelulosa para que la celulosa quede expuesta para la etapa de hidrólisis.

EL objetivo del proceso de pretratamiento es romper la estructura de la lignina y la estructura cristalina de la celulosa, de tal forma que los ácidos o enzimas tengan acceso a la celulosa y la hidrolicen (Mosier et al, 2005).

Álvira et al (2010) indican que para la etapa de pretratamiento se deben tomar en cuenta varios factores como los siguientes:

- ◆ Los azúcares no deben ser degradados durante el proceso,
- ◆ Generación mínima de compuestos tóxicos,
- ◆ Es preferible que no se requiera una disminución del tamaño de la partícula debido a que conlleva altos costos por consumo de energía,
- ◆ Que la operación se pueda realizar en reactores de costo moderado y tamaño razonable,
- ◆ No producir residuos sólidos,
- ◆ Obtener altas concentraciones de azúcares.

3.1 Tipos de pretratamiento

El pretratamiento que se realiza a la biomasa puede ser físico, químico o microbiológico, también, puede ser una combinación de ellos, los cuáles se enfocan en eliminar la lignina y hemicelulosa para mejorar el acceso a la celulosa.

3.1.1 Pretratamiento físico

Se realiza para disminuir el tamaño de partícula de la biomasa mediante un proceso de trituración y extrusión. El objetivo de la trituración es reducir el tamaño de la partícula y la cristalinidad del material para incrementar la superficie específica y reducir el grado de polimerización. El material se pica, tritura o muele dependiendo del tamaño final de la partícula (Álvira et al, 2010). Con respecto al material sin pretratar, se incrementa el rendimiento total de la hidrólisis de la lignocelulosa en 5-25% dependiendo del tipo de biomasa y del tamaño de partícula. También, reduce el tiempo de digestión en 23-59% (Hendricks & Zeeman, 2009).

Los requerimientos energéticos son altos dependiendo del tamaño final de la partícula y de las características de la biomasa, por lo que su aplicación depende del costo económico que represente.

3.1.2 Pretratamiento químico

Hay diferentes métodos de pretratamiento químico, los que se utilizan comúnmente son el pretratamiento alcalino y ácido.

En el pretratamiento con ácido, el objetivo es solubilizar la hemicelulosa para que la celulosa esté más accesible para la etapa de hidrólisis. Se realiza tanto con ácidos concentrados como con ácidos diluidos. Aunque son un agente fuerte para la hidrólisis de la celulosa, los ácidos concentrados son tóxicos, corrosivos, peligrosos y se requieren reactores de materiales resistentes a la corrosión, por lo que el costo del pretratamiento es elevado (Kumar et al, 2009).

El uso de ácido diluido es más favorable para aplicaciones a nivel industrial, se realiza a altas temperaturas durante un periodo corto de tiempo o a bajas temperaturas con tiempos de retención mayores (Álvira et al, 2010). La lignina también se solubiliza en este proceso. En el pretratamiento con ácido diluido, usualmente se utiliza ácido sulfúrico o ácido clorhídrico a concentraciones que van de 0,3-1,1% (m/m) (Zhu, 2005).

El pretratamiento alcalino se realiza a bajas temperaturas y presiones comparado con otras tecnologías para pretratamiento. Es posible llevar a cabo el proceso a condiciones ambientales pero puede tardar horas o días (Mosier et al, 2005). Comparado con el pretratamiento ácido, el proceso alcalino causa menos degradación de azúcares y la sal caústica se puede recuperar o regenerar (Kumar et al, 2009). Además, la estructura de la celulosa después del pretratamiento es más densa y termodinámicamente más estable que la celulosa natural (Hendricks & Zeeman, 2009).

El pretratamiento con hidróxido de sodio diluido provoca que la biomasa se hinche aumentando la superficie interior mientras que el grado de polimerización disminuye; se separan la lignina de los carbohidratos y se altera la estructura de la lignina (Kumar et al, 2009).

En estudios realizados con bagazo de caña se pretrató este material con hidróxido de sodio al 2,00% (m/v) por 90 minutos a 121 °C. Torres (2009), obtuvo un rendimiento de glucosa máximo de 42% con una concentración de enzima de 3,2 FPU/g en la etapa de hidrólisis. Amador (2009), obtuvo un rendimiento de glucosa máximo de 54,14% con una concentración de celulasa de 25 FPU/g.

En este proyecto se trabajara con hidróxido de sodio en el pretratamiento debido a que se han obtenido buenos rendimientos de glucosa en la etapa de hidrólisis utilizando diferentes materiales lignocelulósicos con bajas concentraciones de hidróxido de sodio.

CAPÍTULO 4

HIDRÓLISIS DE LA CELULOSA Y FERMENTACIÓN DE LOS AZÚCARES LIBERADOS

La etapa de hidrólisis de materiales lignocelulósicos puede realizarse tratando el material con ácido diluido, ácido concentrado o mediante el uso de enzimas.

4.1 Hidrólisis ácida

Con ácido concentrado o diluido se puede romper el polímero de celulosa y hemicelulosa de la biomasa para obtener las moléculas de azúcares que pueden ser fermentadas a etanol. La ventaja de la hidrólisis ácida es que el ácido puede penetrar la lignina sin tratamiento previo, la tasa de hidrólisis ácida es más rápida que la hidrólisis enzimática. Sin embargo, presenta la desventaja de que la glucosa se degrada rápidamente bajo condiciones ácidas (Lenihan et al, 2010).

Se emplean ácido sulfúrico y ácido clorhídrico en concentraciones de 1-10% a una temperatura de 100-150 °C. Pero en estas condiciones relativamente moderadas, es menos eficaz la formación de hexosas debido a que los monosacáridos se descomponen en compuestos menos deseables durante la hidrólisis, como el furfural (producto de la deshidratación de pentosas) y el hidroximetilfurfural (producto de la deshidratación de hexosas que son sustancias inhibitoras (Lenihan et al, 2010).

4.2 Hidrólisis enzimática

Este proceso se lleva a cabo mediante el uso de enzimas llamadas celulasas las cuales son altamente específicas. Los productos son azúcares reductores incluyendo glucosa. Los costos de utilidad de este proceso de hidrólisis son bajos comparados con la hidrólisis ácida porque se realiza bajo condiciones medias (pH de 4,8 y temperatura de 40-50 °C) y no produce problemas de corrosión (Sun & Cheng, 2002).

Zhu (2005) menciona que en comparación con la hidrólisis con ácido diluido, la hidrólisis enzimática tiene la ventaja de que puede lograr altos rendimientos y eliminar la formación de subproductos inhibidores.

Para la producción de celulasas se utilizan microorganismos como bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos aunque solo algunos de ellos producen la enzima celulasa capaz de hidrolizar la celulosa. El *Trichoderma reesei*, un hongo filamentoso ha sido el más estudiado y sus mutaciones son utilizadas para la producción comercial de hemicelulasas y celulasas (Howard et al, 2003).

Las celulasas son una mezcla de varias enzimas, los grupos principales son: endogluconasa, exogluconasa o celobiohidrolasa y β -glucosidasa. Específicamente, los tres tipos de enzimas que incluye una celulasa son: la endo- β -1,4-glucanasa o 1,4- β -D-glucan glucanhidrolasa; la exo- β -1,4-glucanasa o 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa y la β -1,4-glucosidasa o β -D-glucósido glucohidrolasa (Ovando & Waliszewski, 2005).

El mecanismo propuesto para la degradación de la celulosa se puede resumir en tres etapas. Primero la endo β -1,4-glucanasa actúa sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos los cuales mantienen la configuración β de su estructura. La acción de esta enzima se da sobre las regiones amorfas de la molécula o sobre la superficie de las microfibrillas y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos (Ovando & Waliszewski, 2005).

En la segunda etapa, la exo β -1,4-glucanasa corta las cadenas 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas provocando la remoción de unidades de celobiosa o glucosa. Después de que las zonas amorfas son degradadas, la tercera etapa se da en la región cristalina como resultado de la acción sinérgica de la endogluconasa y la exogluconasa. Finalmente, se da la hidrólisis de la celobiosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa. La celobiosa inhibe la acción de las glucanasas limitando la degradación de la celulosa, por lo que es necesario utilizar celobiasa para su hidrólisis (Ovando & Waliszewski, 2005).

4.3 Factores que afectan el proceso de hidrólisis enzimática

Sun & Cheng (2002) mencionan que los factores que afectan la hidrólisis enzimática de la celulosa incluye el sustrato, la actividad de la celulasa y las condiciones de reacción como temperatura y pH, entre otros.

La concentración del sustrato es uno de los principales factores que intervienen en el rendimiento y la tasa inicial de la hidrólisis enzimática de la celulosa. Un aumento en la concentración de sustrato resulta normalmente en un incremento en el rendimiento y la velocidad de la hidrólisis. Sin embargo, altas concentraciones de sustrato pueden causar una inhibición del mismo, lo cual baja sustancialmente la velocidad de la hidrólisis. El grado de inhibición del sustrato depende de la razón entre el sustrato y la enzima (Sun & Cheng, 2002).

La susceptibilidad de los sustratos celulósicos a las celulasas depende de las características estructurales del sustrato tales como la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, la superficie disponible del sustrato, y el contenido y distribución de la lignina. Esta última bloquea el acceso a la celulosa impidiendo su hidrólisis (Álvira et al, 2010; Sun & Cheng, 2002).

Un aumento en la concentración de la celulasa aumenta el rendimiento y la velocidad de la hidrólisis pero implica un aumento significativo en los costos del proceso.

La actividad de la celulasa disminuye durante el proceso de hidrólisis. La actividad de la celulasa es inhibida por la celobiosa y en menor medida por la glucosa (Sun & Cheng, 2002).

4.4 Sacarificación y Fermentación Simultáneas

Después de la hidrólisis, los azúcares liberados se fermentan para producir etanol. En el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) los azúcares producidos en la hidrólisis son fermentados inmediatamente por microorganismos, por lo que la formación de los productos inhibidores de la hidrólisis disminuye.

El organismo más utilizado para la fermentación es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual ha demostrado ser adecuada para la fermentación de los productos de la hidrólisis de

materiales lignocelulósicos. Este microorganismo puede fermentar hexosas pero no la xilosa, sin embargo, produce etanol con altos rendimientos (Balat, 2010).

Si se compara con un proceso en dos etapas, donde primero se da el proceso de hidrólisis y posteriormente la fermentación, la SSF tiene la ventaja de que hay un aumento en la velocidad de la hidrólisis porque los azúcares que inhiben la actividad de la celulasa se fermentan rápidamente, se requiere menor cantidad de enzima, el tiempo de proceso es más corto y el volumen del reactor disminuye. Por otro lado, las desventajas de este proceso son principalmente que la temperatura a la que se realiza la hidrólisis y la fermentación son diferentes y que el etanol puede inhibir la acción de la enzima (Sun & Cheng, 2002).

Tropper (2009) al utilizar una concentración de bagazo de 45 g/L produjo en promedio 1% de etanol y con una concentración de 60 g/L la concentración de etanol fue de 1,5% en un proceso de sacarificación y fermentación simultánea. La autora compara estos resultados con otros reportados en la literatura en condiciones de pretratamiento e hidrólisis similares del bagazo de caña pero en un sistema de hidrólisis y fermentación separadas, donde se obtuvo una concentración de 1% de etanol a partir de una concentración de sustrato de 60 g/L, siendo mayor el rendimiento para el proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas.

CAPITULO 5

MATERIALES, EQUIPO Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen los materiales, el quipo y la metodología experimental que se utilizó para cumplir el objetivo del presente proyecto.

5.1 Materiales

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes materiales:

- a. Rastrojo de piña:** El rastrojo se adquirió de una finca productora de piña ubicada en San Carlos. La variedad de piña cultivada es la MD2. El material estaba libre de productos químicos. La fibra se extrajo mediante la molienda en una licuadora.
- b. Enzimas:** Para la etapa de hidrólisis se utilizó una celulasa y una celobiasa. La celulasa utilizada es la que se comercializa con el nombre de ACCELLERASE® 1500 y la celobiasa como β -glucosidasa Novozyme® 188. La celulasa es producida a partir de una cepa modificada del hongo *Trichoderma reesei*. Las condiciones óptimas de operación de esta enzima son: temperatura de 50 °C a 65 °C y pH entre 4,0 y 5,0. La cantidad de β -glucosidasa utilizada se determinó mediante una relación de volumen celulasa:celobiasa.
- c. Levadura:** Para la fermentación se utiliza una levadura usada en la panificación *Sacharomyces cerevisiae*, la cual se adquirió en el mercado nacional.
- d. Reactivos:** Los reactivos utilizados en la etapa de caracterización del material y en el desarrollo del plan experimental se detallan en el Cuadro 5.1.

5.2 Equipo Experimental

Los equipos utilizados en las diferentes etapas experimentales de este proyecto se detallan en el Cuadro 5.2. Además de esos equipos, se utilizó cristalería general del Laboratorio de Ingeniería Química.

En la Figura 5.1 se ilustran los principales equipos utilizados en la realización del presente proyecto.

Cuadro 5.1 Reactivos utilizados en el desarrollo de las etapas experimentales del proyecto.

Reactivo	Fabricante	Grado	Pureza
Nitrato de amonio	Merck	Pro-análisis	99%
Sulfato de magnesio heptahidratado	Aldrich	Reactivo	98%
Fosfato de amonio dibásico	Aldrich	Reactivo	98%
Extracto de levadura	Sigma	-	-
Levadura	Fleischman	-	-
Ácido clorhídrico	Gamma	Reactivo	38%
Glucosa	Sigma	Reactivo	99,5%
Ácido acético glacial	Spectrum	Reactivo	99,7%
Etanol	Fanal	-	95%
Hidróxido de sodio	Gamma	Reactivo	97%
Papel filtro	Watman	-	-
Glucosa Oxidasa	Biocientifica	-	-
Ciclohexano	Merck	Pro-análisis	99,5%
Xilosa	Sigma	Sigma-Ultra	99%
Ácido Cítrico monohidratado	Merck	Pro-análisis	99,5%
Metanol	Fermont	Pro-análisis	99,8%
Ácido Sulfúrico	Merck	Pro-análisis	95-97%

Cuadro 5.2 Equipo utilizado para la realización del proyecto.

Equipo	Fabricante	Ámbito	Placa UCR
Autoclave	TOMIN	0-3 kg/cm ²	215001
Espectrofotómetro Bio Mate 3	Thermo Scientific	-	270461
Shaker con control de temperatura	LAB-LINE	0-500 rpm; 0-60 °C	180435
Medidor de pH	OAKTON	-	-
Balanza analítica	Denver Instrument	0-260 g	220466
Balanza semianalítica	Adam	0-360 g	223343
Horno gravimétrico	Blue M	0-250 °C	
Horno mufla	Jernus Temp- Master	0- 900 °C	2943
Baño de temperatura controlada	Precision Scientific	0-99 °C	120758
Licuada	Oster	-	-
Refractómetro de Abbe	Reichert	-	317955
Micropipeta	Trasferpette	10-100 µL	-



a.



b.



c.

Figura 5.1 Equipos utilizados en el pretratamiento, hidrólisis y fermentación, a) Incubadora, b) Espectrofotómetro y c) Autoclave.

5.3 Métodos de análisis

5.3.1 Cuantificación de glucosa

La determinación de la cantidad de glucosa en las muestras de cada etapa experimental se realizó mediante el método de Trinder, descrito en el trabajo de Torres (2009). Las absorbancias de las muestras se leen a una longitud de onda de 500 nm en un espectrofotómetro BioMate 3. En la Figura B.1 se presenta una curva de calibración que relaciona la absorbancia con la concentración de glucosa.

En el desarrollo del proyecto se realizaron tres curvas de calibración para este método. En el Cuadro 5.3 se detallan las ecuaciones y las etapas en las que se utilizaron dichas curvas de calibración.

Cuadro 5.3 Ecuaciones de las curvas de calibración para la cuantificación de glucosa mediante el método de Trinder.

Ecuación	R²	Etapas
$A_1 = 0,257 \cdot Cn_G + 0,0014$	0,9968	Primera y quinta
$A_2 = 0,239 \cdot Cn_G - 0,01$	0,9977	Segunda y cuarta
$A_3 = 0,233 \cdot Cn_G + 0,0018$	0,9996	Tercera

5.3.2 Cuantificación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se cuantifican mediante el método de Nelson Somogyi, descrito en el trabajo de Torres (2009). Las absorbancias se leen a una longitud de onda de 500 nm en el espectrofotómetro BioMate 3. Al igual que para el método anterior, se realizó una curva de calibración que se muestra en la Figura B.2.

5.3.3 Cuantificación de pentosas

La determinación de la cantidad de pentosas se realizó mediante el método de Bial modificado por Horecker, descrito en el trabajo de Torres (2009). La absorbancia se mide a una longitud de onda de 670 nm en un espectrofotómetro BioMate 3. Se realiza la curva de calibración para relacionar la absorbancia con la concentración. Esta curva se presenta en la Figura B.3.

5.3.4 Determinación de la actividad de la celulasa

Para determinar la actividad de la celulasa, se utiliza el método propuesto por Adney & Baker (1996). En este método, la actividad se mide en una unidad estándar denominada FPU por sus siglas en inglés (Filter Paper Unit). El sustrato son 50 mg de papel filtro Watman N° 1. La celulasa hidroliza el sustrato durante 60 minutos, a un pH de 4,8 y una temperatura de 50 °C y se debe encontrar la concentración de enzima que libere 2 mg de azúcares a estas condiciones. Los azúcares liberados se cuantifican mediante el método de Nelson Somogyi. Consultar procedimiento en Torres (2009).

5.3.5 Cuantificación del contenido de etanol

Para determinar el contenido de etanol de las muestras se mide el índice de refracción a 20 °C. Se toman 50 mL de líquido después de la etapa de fermentación y se diluye en un balón de 100 mL. La muestra se destila y a los primeros 50 mL que se obtienen como destilado se le mide el índice de refracción. En la Figura B.4 se muestra la curva de calibración que relaciona el porcentaje volumen/volumen de etanol con el índice de refracción a 20 °C.

5.4 Caracterización del rastrojo de la piña

Para determinar la composición del rastrojo de la piña, se cuantifica: cenizas, humedad, extractos solubles en agua fría y caliente, extractos solubles en etanol-ciclohexano, cantidad de lignina y holocelulosa. Estas mediciones se realizaron de acuerdo a las normas establecidas por la *American Standard Testing Materials* (ASTM).

5.4.1 Determinación de Cenizas

La cantidad de cenizas que contiene el rastrojo de la piña se determina mediante el procedimiento descrito en la norma ASTM 1102-56 que se detalla en Amador (2009).

5.4.2 Determinación de Humedad

La humedad de la muestra se determina en un horno gravimétrico. La muestra se somete a una temperatura de 100-105 °C hasta que su peso sea constante. El procedimiento se detalla en el Apéndice D.2.

5.4.3 Determinación de los extractos solubles en agua fría y agua caliente

La cantidad de extractos solubles en agua fría y agua caliente que contiene el rastrojo se determina mediante el procedimiento descrito en la norma ASTM 1110-84, el cual se puede consultar en el trabajo de Amador (2009).

La solubilidad en agua fría permite obtener una medida de la cantidad de taninos, gomas, azúcares y materia coloreada que compone el material. La solubilidad en agua caliente permite obtener una medida de la cantidad de almidones además de los compuestos anteriores.

5.4.4 Determinación de la solubilidad en etanol-ciclohexano

Para determinar la cantidad de extractos solubles en una mezcla de disolventes orgánicos se utilizó la norma ASTM 1107-56 con una modificación validada por el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional. Este procedimiento está descrito en el trabajo de Amador (2009).

Con la solubilidad en etanol-ciclohexano se obtiene el porcentaje de ceras, grasas, resinas, aceites, taninos y otros compuestos insolubles en éter, que contiene el rastrojo de la piña.

5.4.5 Determinación de Lignina

La determinación de la cantidad de lignina se realizó mediante el procedimiento descrito en la norma ASTM 1104-56. Para este procedimiento la muestra debe estar libre de extractos, por lo que se deben realizar los procedimientos descritos en la norma ASTM 1105-96. Ambos procedimientos se pueden consultar en el trabajo de Amador (2009).

5.4.6 Determinación de holocelulosa

Para determinar la cantidad de holocelulosa del rastrojo de la piña se procede de la forma indicada en el procedimiento descrito en la norma ASTM 1104-56. El procedimiento se describe en el trabajo de Amador (2009).

La muestra debe estar libre de extractos por lo que se debe seguir el procedimiento descrito en la norma ASTM 1105-96. El resultado se expresa como porcentaje respecto al peso inicial en base seca del rastrojo.

5.5 Pretatamiento del rastrojo de la piña

Se plantea una primera etapa experimental en la cual se varía la concentración de hidróxido de sodio en el pretratamiento del material para determinar con qué niveles de esta variable trabajar, y una segunda etapa experimental donde se varía el tiempo de pretratamiento para las concentraciones seleccionadas.

5.5.1 Primera etapa: Pretratamiento con diferentes concentraciones de hidróxido de sodio.

Objetivo experimental: Determinar los niveles de concentración de hidróxido de sodio a utilizar en el pretratamiento del material con los cuales se obtengan mayores rendimientos en la hidrólisis enzimática.

En esta etapa, el tiempo de pretratamiento se fija en 20 minutos y la temperatura de pretratamiento en 121 °C. La hidrólisis se realiza a 50 °C y un pH de 4,8 regulado con un buffer de citrato 0,05 M, la concentración de sustrato es de 11 g/L y la concentración de enzima de 10 FPU/g. La relación celulasa:celobiasa fue de 3:1 v:v. La agitación se mantuvo en 70 rpm y el tiempo de hidrólisis fue de 48 horas. Algunos de los experimentos se realizaron por duplicado.

Para seleccionar la concentración de NaOH a utilizar en el pretratamiento, también se deben tomar en cuenta aspectos ambientales y económicos. Después del pretratamiento, la biomasa se lava con el fin de eliminar la solución de hidróxido de sodio y quitar el tejido parenquimático desprendido.

Amador (2009), analizó las aguas de lavado del pretratamiento de bagazo de caña para concentraciones de NaOH de 1,5%, 2,0%, 2,5% y 3,0% (m/v). En su estudio, determinó que en el líquido concentrado la demanda química de oxígeno (DQO) es de 55 200 mg/L para la concentración de 1,5% que aumenta conforme la disolución de hidróxido de sodio se concentra hasta llegar a un DQO de 64 350 mg/L para la concentración de 3,0%. Estos valores sobrepasan los permitidos en el Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales en nuestro país para una industria que se dedique a la producción de alcohol etílico por fermentación (1 000 mg/L), por lo que deben ser tratadas y esto tiene un costo asociado.

La variable experimental corresponde a la concentración de hidróxido de sodio. Las muestras de rastrojo fueron pretratadas con concentraciones de NaOH de 0%; 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1,0%; 1,25%; 1,5% y 1,75% y 2,00% (m/v).

La variable de respuesta para esta etapa es la concentración de glucosa, la cual se determina mediante el método de Trinder. Además, se calculan los rendimientos con dichas concentraciones expresados como:

$$\% \text{ Rendimiento de glucosa} = \frac{C_G}{C_R} \times 100 \quad (5.1)$$

5.5.1.1 Metodología del trabajo experimental

El rastrojo se pica en cuadros de 1-2 cm de lado, la fibra se extrae con una licuadora, se lava para eliminar la coloración verde y se seca. El material seco se pretrata con las diferentes concentraciones de NaOH. El volumen de la base utilizado es de 10 mL/g de rastrojo seco. Estas muestras se introducen en el autoclave por 20 minutos a 121 °C y una presión de 1,5 kg/cm². Posteriormente, se lava el rastrojo con agua hasta que el líquido de lavado sea claro.

Una vez finalizado los lavados, las muestras se secan en un horno gravimétrico. La etapa de hidrólisis se realiza en erlenmeyer de 250 mL, que se colocan en la incubadora a 50 °C con una agitación de 70 rpm. El pH se mantiene a 4,8 con un buffer de citrato de sodio 0,05 M. La concentración de rastrojo para la hidrólisis es de 11 g/L. La celulasa se agrega en una concentración de 10 FPU/g y una relación de celulasa:celobiasa de 3:1 (v:v). El tiempo de hidrólisis fue de 48 horas. Transcurrido este tiempo, se determina la concentración de glucosa mediante el método de Trinder.

5.5.2 Segunda etapa: Pretratamiento con diferentes concentraciones de hidróxido de sodio a diferentes tiempos.

Objetivo experimental: Realizar el pretratamiento a diferentes tiempos y diferentes concentraciones de NaOH para fijar el tiempo de pretratamiento para las siguientes etapas experimentales con el cual se obtengan mayores rendimientos de glucosa en la hidrólisis enzimática.

Las variables involucradas en esta etapa son las mismas que en la primera etapa con la variación de que las variables experimentales en este caso son el tiempo de pretratamiento y la concentración de hidróxido de sodio. Las muestras de rastrojo se pretratan a 10, 20, 30 y 40

minutos en el autoclave con concentraciones de NaOH de 0,75%; 1,0%; 1,25% y 1,5% (m/v). La variable de respuesta es la concentración de glucosa. La concentración de rastrojo es de 10 g/L.

5.5.2.1 Diseño del experimento

Se realiza la hidrólisis enzimática de muestras pretratadas a diferentes tiempos y diferentes concentraciones para determinar el tiempo de pretratamiento. Se realiza un diseño de bloques por duplicado. En el Cuadro 5.4 se presenta el detalle de los bloques y tratamientos.

Cuadro 5.4 Diseño de bloques para la segunda etapa experimental.

Bloques: Tiempo de pretratamiento (minutos)	Tratamiento: Concentración de NaOH (%m/v)
10	0,75%
20	1,00%
30	1,25%
40	1,50%

5.5.2.2 Metodología del trabajo experimental

Se procede de la misma forma que en la etapa anterior, lo que se varía es el tiempo de pretratamiento.

5.6 Hidrólisis Enzimática

Una vez definido el tiempo pretratamiento y los niveles de la concentración de hidróxido de sodio a utilizar, se realiza una tercera etapa experimental para evaluar el efecto de la concentración de NaOH y de celulasa y celobiasa en la hidrólisis para la producción de etanol a partir del rastrojo de la piña.

5.6.1 Tercera etapa experimental

Objetivo experimental: Determinar el nivel de la concentración de hidróxido de sodio en el pretratamiento y la concentración de enzimas que resulten en un mayor rendimiento en la hidrólisis enzimática del rastrojo de la piña.

Para esta etapa, las variables fijas son las siguientes: temperatura y tiempo de pretatamiento: 121 °C y 25 minutos. Las condiciones de reacción: 50 °C a un pH de 4,8; la concentración de

sustrato: 10,3 g/L y el nivel de agitación: 70 rpm. El tiempo de hidrólisis es de 48 horas. El volumen de celobiasa utilizado es 50 $\mu\text{L/g}$ de rastrojo seco pretratado.

Las variables de diseño son la concentración de hidróxido de sodio en sus niveles 1,00% y 1,25% (m/v) y la concentración de celulasa: 10, 15 y 20 FPU/g que equivale a una razón celulasa:celobiasa: 5:1, 7:1 y 9:1 v:v.

La variable de respuesta son la concentración de glucosa y los respectivos rendimientos calculados con la ecuación 5.1.

5.6.2 Diseño del experimento

Para evaluar el efecto de la concentración de hidróxido de sodio y la concentración de enzimas se realiza un diseño de bloques por duplicado con dos niveles de concentración de NaOH y tres niveles de concentración de celulasa, que corresponden a una relación v:v celulasa:celobiasa de 5:1,7:1 y 9:1 respectivamente. En el Cuadro 5.5 se muestra los niveles de los bloques y los tratamientos.

Cuadro 5.5 Niveles de las variables en el diseño de bloques.

Bloques: Relación celulasa:celobiasa (v:v)	Tratamiento: Concentración de NaOH
5:1	1,00 % (m/v)
7:1	1,25 % (m/v)
9:1	

5.6.3 Metodología del trabajo experimental

La metodología experimental es similar a la metodología de las etapas anteriores. En este caso, el rastrojo se pretrata con una concentración de NaOH de 1,00% y 1,25% (m/v) por 25 minutos en el autoclave, a una temperatura de 121 °C y 1,5 kg/cm². La hidrólisis se realiza en erlenmeyers de 250 mL y se agrega la celulasa a concentraciones de 10, 15 y 20 FPU/g según sea el caso. Se agrega 50 $\mu\text{L/g}$ de rastrojo seco de celobiasa que corresponde a una relación de 5:1, 7:1 y 9:1 v:v celulasa:celobiasa.

5.7 Sacarificación y fermentación simultáneas: cuarta etapa experimental.

Después de determinar la concentración de hidróxido de sodio y la relación celulasa:celobiasa que resultan en mayores rendimientos de glucosa dentro de los niveles estudiados en la hidrólisis enzimática, se procede a realizar la fermentación para la producción de bioetanol utilizando el rastrojo de la piña como materia prima. En las primeras 25 horas ocurre la hidrólisis y en las 30 horas posteriores, la fermentación.

Objetivo experimental: Evaluar el rendimiento de la producción de glucosa y etanol en la hidrólisis y fermentación simultáneas del rastrojo de la piña utilizando diferentes concentraciones de sustrato.

El material lignocelulósico se pretrata con una solución de hidróxido de sodio al 1,00% (m/v), un tiempo de pretratamiento de 25 minutos y 121 °C. La hidrólisis se realiza con una concentración de celulasa de 15 FPU/g y una relación celulasa:celobiasa de 7:1 v:v. La temperatura de reacción es de 50 °C en la etapa de hidrólisis y 32 °C en la fermentación a un pH de 4,8. La agitación se mantiene en 70 rpm. El tiempo de hidrólisis fue de 25 horas y el de fermentación de 30 horas. La concentración de sustrato utilizada es de 25,10 g/L, 35,10 g/L y 50,30 g/L.

Las variables de respuesta son la concentración de glucosa medida con el método de Trinder, la concentración de pentosas que se determina con el método de Bial modificado por Horecker, la concentración de azúcares reductores por el método de Nelson Somogyi y la concentración de etanol que se determina con el índice de refracción.

5.7.1 Metodología experimental

Se mezcla el rastrojo seco con una solución de NaOH al 1,00% (m/v) a una razón de 10 mL por gramo de rastrojo seco. Se introduce en el autoclave por 25 minutos a una temperatura de 121 °C. Concluido este tiempo, se lavan las muestras hasta que el líquido de lavado sea claro y se secan en el horno.

Posteriormente, se coloca la masa de rastrojo seca necesaria para cada concentración de sustrato en erlenmeyer de 500 mL para el proceso de hidrólisis. Se agrega la celulasa a una

concentración de 15 FPU/g y celobiasa en una relación celulasa:celobiasa de 7:1 v:v. La hidrólisis se lleva a cabo por 25 horas manteniendo el pH a 4,8 con un buffer de citrato 0,05 M. Al finalizar la hidrólisis, se toman muestras para determinar la cantidad de glucosa liberada y la concentración de pentosas.

Después de la hidrólisis, se baja la temperatura a 32 °C y se agregan los nutrientes y la levadura para dar inicio al proceso de fermentación. Se adiciona 1 g/L de fosfato de amonio, 0,25 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, 3 g/L de nitrato de amonio y 0,25 g/L de extracto de levadura. Al concluir las 30 horas de reacción, se toman 50 mL de muestra y se aforan en un balón de 100 mL para ser destilados. A los primeros 50 mL de destilado, se le mide el índice de refracción para determinar el porcentaje de etanol de la muestra. Además, se toman muestras del caldo de la fermentación para determinar la concentración de glucosa y azúcares reductores mediante el método de Trinder y Nelson Somogyi, respectivamente.

5.8 Determinación del efecto de la presencia de clorofila en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea: Quinta etapa.

Objetivo experimental: Evaluar el efecto de la presencia de clorofila en el proceso de hidrólisis y fermentación del rastrojo de piña para la producción de etanol.

En esta etapa, la concentración de las muestras es de 35 g_{sustrato}/L y se realiza por triplicado. La extracción de la fibra se realiza con agua destilada y se recoge el líquido. Una parte de este líquido se centrifuga para eliminar la mayor cantidad de clorofila y partículas suspendidas posibles y otra parte se deja sin centrifugar. Este líquido se utilizará en lugar del agua destilada.

Se pretrata fibra del rastrojo con una concentración de hidróxido de sodio de 1,00% (m/v) por 25 minutos en el autoclave y se prepara de la misma forma que para las demás etapas.

Para la hidrólisis y fermentación, se agrega el líquido centrifugado o sin centrifugar según sea el caso, para que el volumen total de reacción sea de 300 mL. Se añade la fibra pretratada y el volumen de buffer de citrato correspondiente. La concentración de celulasa es de 15 FPU/g y la relación celulasa:celobiasa es de 7:1. La temperatura de hidrólisis se mantiene a 50 °C y la

agitación en 70 rpm. A las 25 horas de hidrólisis, se toman muestras del líquido para la determinación de glucosa y pentosas. En este momento, se baja la temperatura a 32 °C y se agregan los nutrientes en las concentraciones mencionadas en la sección anterior para dar inicio al proceso de fermentación. Al finalizar este proceso, se toman 50 mL de muestra, se filtra y se afora en un balón de 100 mL. Se destila y se determina el índice de refracción para cuantificar la concentración de etanol. Además, se determina la concentración de azúcares reductores en el caldo de fermentación.

Las variables de respuesta son la concentración y rendimientos de glucosa, la concentración y rendimientos de pentosas; y la concentración de azúcares reductores.

CAPITULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presenta el análisis de los resultados experimentales de cada etapa. Además, se muestra la composición del rastrojo de la piña.

6.1 Composición del rastrojo de la piña

En el Cuadro 6.1 se presenta la composición del rastrojo utilizado como materia prima en la investigación. Se puede observar que el contenido de lignina es bajo.

Cuadro 6.1 Composición del rastrojo de la piña.

Análisis	Valor (%)
Humedad	86,43
Cenizas	12,06%
Solubilidad en agua fría	13,86
Solubilidad en agua caliente	20,50
Solubilidad en etanol-ciclohexano	17,28
Holocelulosa	66,2
Lignina	8,3

Realizado por Maureen Córdoba y Ana Rodríguez (2011).

6.2 Pretratamiento a diferentes concentraciones de NaOH: Primera etapa experimental.

Con el objetivo de determinar los niveles de concentración de hidróxido de sodio a utilizar en la etapa de pretratamiento, se realizan experimentos a diferentes concentraciones de la misma, manteniendo fijo el tiempo de pretratamiento y las condiciones del proceso de hidrólisis como se indicó en la sección 5.5.1.

La Figura 6.1 muestra los rendimientos de glucosa después de las 48 horas de hidrólisis enzimática con respecto a la concentración de hidróxido de sodio en el pretratamiento. Se observa que hay un aumento en el rendimiento de glucosa hasta una concentración de 1,00% (m/v) de NaOH, después de este punto la concentración se mantiene constante y luego disminuye.

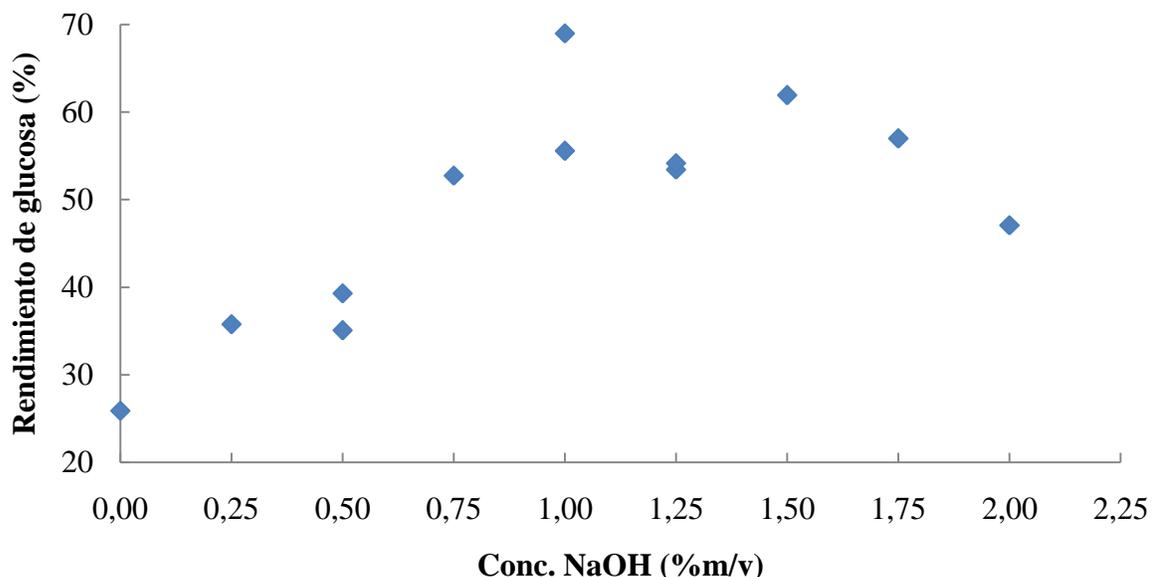


Figura 6.1 Rendimientos de glucosa a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio.

Los rendimientos se presentan en el Cuadro B.16. El rendimiento más alto es de 62,28% para una concentración de 1,00% de hidróxido de sodio y el más bajo corresponde, como es de esperar, a la concentración de hidróxido de sodio de 0% donde el rendimiento es de 27,64%. El rendimiento para las concentraciones de 1,25% y 1,50% son de 53,80% y 61,93% respectivamente, este último resultado es cercano al obtenido con la concentración de base de 1,00%.

La disminución en el rendimiento de glucosa al aumentar la concentración de hidróxido de sodio concuerda con lo reportado por Nlewem & Thrash (2010), quienes determinaron que un aumento en la concentración de hidróxido de sodio provoca una degradación irreversible de la celulosa que se pierde en los lavados del material por lo que los rendimientos de la hidrólisis disminuyen.

El contenido de lignina en el rastrojo de la piña es de 8,3%, un porcentaje bajo si se compara con las especies maderables, por lo que no es necesario utilizar altas concentraciones de base en el pretratamiento como lo menciona Sun & Cheng (2002). Los autores indican que los pretratamientos con hidróxido de sodio diluido originan buenos rendimientos de glucosa para materiales con bajo contenido de lignina (10-18%).

En la Figura 6.2 se muestra el rastrojo sin pretratar, se observa tejido epidérmico y abundante tejido parenquimático, el cual es parte de la anatomía de las especies no maderables como el rastrojo de la piña. Durante el proceso de trituración para la extracción de la fibra, se liberan algunos haces de fibras.



Figura 6.2 Micrografía de la muestra de rastrojo sin pretratamiento (aumento 4X).

En las Figuras 6.3, 6.4, 6.5 y 6.6, se presentan las fotografías de las muestras de rastrojo pretratadas. Se observa que hay tejido parenquimático junto con los haces de fibras. Las fotografías corresponden a las muestras pretratadas con 1,00%, 1,25%, 1,50% y 2,00%.

Según lo observado en las micrografías, utilizar concentraciones de 1,50% y 2,00% origina que los haces de fibras estén más sueltos con respecto a las otras concentraciones; sin embargo, Amador (2009) y Torres (2009) mencionan que al utilizar altas concentraciones de la base hay una pérdida de material durante el lavado y en consecuencia una disminución del rendimiento, por lo que es preferible utilizar concentraciones bajas.

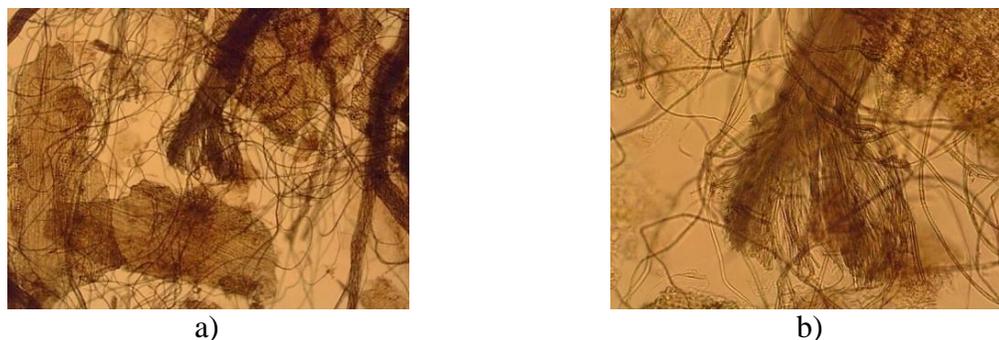


Figura 6.3 Micrografía de la muestra de rastrojo pretratada con hidróxido de sodio al 1,00% (m/v), a) aumento 4X, b) aumento 10X.



Figura 6.4 Micrografía de la muestra de rastrojo pretratada con hidróxido de sodio al 1,25% (m/v), aumento 4X.



a)

b)

Figura 6.5 Micrografía de la muestra de rastrojo pretratada con hidróxido de sodio al 1,50% (m/v), a) aumento 4X, b) aumento 10X.



a)

b)

Figura 6.6 Micrografía de la muestra de rastrojo pretratada con hidróxido de sodio al 2,00% (m/v), a) aumento 4X, b) aumento 10X.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta parte de la investigación se tomara como niveles para la tercer etapa experimental, concentraciones de base de 1,00 % (m/v) y 1,25% (m/v) en el pretratamiento del material, donde se determinará el efecto de la concentración de NaOH y de la celulasa y celobiasa en la hidrólisis enzimática. Previamente, debe definirse un tiempo de pretratamiento.

6.3 Diferentes tiempos de pretratamiento: Segunda etapa experimental.

Para fijar el tiempo de pretratamiento, se realizaron corridas a diferentes tiempos y concentraciones de NaOH, como se indicó en la sección 5.5.2. En la Figura 6.7 se muestra la concentración de glucosa y el tiempo de pretratamiento para cada concentración.

Al utilizar una concentración de NaOH de 0,75% (m/v), la máxima concentración de glucosa liberada en la hidrólisis enzimática es de 6,78 g/L y se alcanza a un tiempo de pretratamiento de 30 minutos. El rendimiento correspondiente a esta concentración de glucosa es de 67,8%.

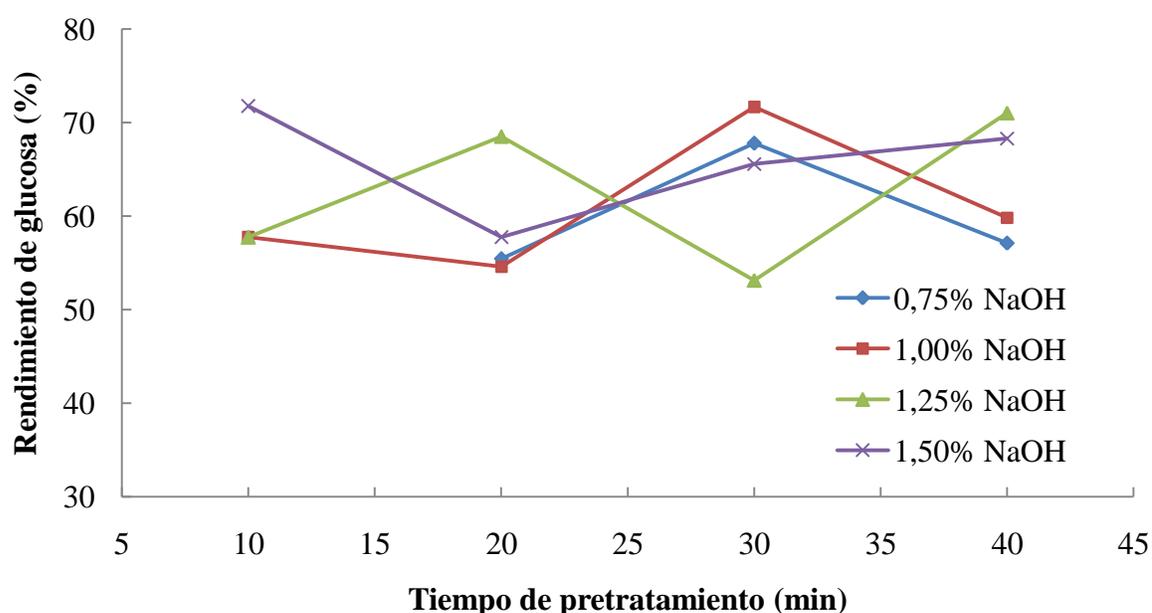


Figura 6.7 Rendimientos de glucosa a diferentes tiempos y concentraciones de NaOH en la etapa de pretratamiento.

Para una concentración de 1,00% (m/v) de hidróxido de sodio, la máxima concentración de glucosa se alcanza al pretratar la fibra por 30 minutos con un rendimiento de 70,84%, mientras que para la concentración de 1,25% (m/v) la máxima concentración de glucosa se alcanza a los 40 minutos de pretratamiento con un rendimiento promedio de 71,03%. Sin embargo, el rendimiento para esta concentración y un tiempo de pretratamiento de 20 minutos es de 68,51%, el resultado difiere en 2,52 unidades del rendimiento promedio máximo obtenido.

Para la concentración de NaOH de 1,5% (m/v) el mayor rendimiento de glucosa se obtiene a los 10 minutos de pretratamiento, se observa que a mayores tiempos de pretratamiento hay una reducción en la concentración de glucosa.

De estos resultados se encuentra que el tiempo de pretratamiento está entre 20 y 30 minutos, ya que es a estos tiempos donde se obtiene la mayor concentración de glucosa y por ende los mayores rendimientos.

Los tiempos de pretratamiento en estudios realizados con bagazo de caña son mayores a los utilizados en la presente investigación, sin embargo, los rendimientos alcanzados en este proyecto son similares a los de Torres (2009) y Amador (2009). Esto tendría un impacto positivo en el aspecto económico, ya que a menores tiempos de pretratamiento, la energía consumida es menor y el costo asociado a la misma también disminuye.

En los Cuadros B.17, B.18, B.19 y B.20 se presentan las concentraciones y los rendimientos para cada una de las corridas. Se realizó un análisis de varianza encontrándose que no hay efectos ni interacciones significativas entre la concentración de NaOH y el tiempo de pretratamiento, por lo que se decide utilizar para las siguientes etapas un tiempo de pretratamiento de 25 minutos. Estos resultados se presentan en el Cuadro 6.2.

Cuadro 6.2 Resultados del análisis de Varianza de la segunda etapa experimental.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F_{Calc}	F_{0,05}
Tiempo de pretratamiento (min)	1,60	2	0,801	1,00	5,14
Concentración de NaOH (%m/v)	0,38	3	0,125	0,16	4,76
Error	4,78	6	0,797		
Total	6,76	11			

6.4 Determinación del efecto de la concentración de NaOH y de celulasa y celobiasa en la hidrólisis enzimática del rastrojo de la piña: tercera etapa.

Para determinar el efecto de la concentración de NaOH en el pretratamiento del rastrojo de la piña y la concentración de enzimas celulasa y celobiasa en la hidrólisis enzimática para la

producción de etanol a partir del rastrojo de la piña, se realizó esta etapa mediante un diseño de bloques.

Uno de los problemas de la hidrólisis enzimática es la inhibición de la actividad de la celulasa debido a la presencia de la celobiosa que impide la acción de las glucanasas limitando la degradación de la celulosa. Es por esto que se utiliza en conjunto con la celulasa, la celobiasa con el objetivo de que hidrolice la celobiosa a glucosa conforme se va liberando en el proceso de hidrólisis.

Los niveles de concentración de base utilizados son 1,00% y 1,25% como se detalla en el Cuadro 5.5 así como la concentración de celulasa de 10 FPU/g, 15 FPU/g y 20 FPU/g que al mantener el volumen de celobiasa fijo (50 μ L/g), resulta en una relación celulasa:celobiasa de 5:1, 7:1 y 9:1 v:v respectivamente.

Cuadro 6.3 Rendimientos de glucosa para la tercera etapa experimental.

Relación celulasa:celobiasa (v:v)	Concentración de NaOH	
	1,00%	1,25%
5:1	54,47	54,47
5:1	60,71	56,55
7:1	54,47	60,71
7:1	58,63	60,71
9:1	50,31	54,47
9:1	50,31	58,63

En el Cuadro 6.3 se muestran los rendimientos de glucosa para esta etapa con su repetición. Al realizar el análisis estadístico, se obtiene que ni la relación celulasa:celobiasa, ni la concentración de hidróxido de sodio en el pretratamiento de la fibra del rastrojo de la piña son significativas. La interacción entre las dos variables tampoco es significativa. Los resultados del análisis de varianza se presentan en el Cuadro 6.4.

El rendimiento promedio para la concentración de NaOH de 1,00% es de 54,82% y para la concentración de 1,25% es de 57,59%. Por otra parte, el rendimiento para la relación v:v celulasa:celobiasa de 5:1 correspondiente a una concentración de celulasa de 10 FPU/g es de 56,55% en promedio, para la concentración de 15 FPU/g es de 58,63% (relación de enzimas 7:1) y para la concentración de 20 FPU/g es de 53,43% (relación de enzimas 9:1).

Cuadro 6.4 Análisis de Varianza.

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F_{calc}	F_{0,05}
Relación celulasa:celobiasa (v:v)	54,75	2	27,37	4,22	5,14
Concentración de NaOH	23,05	1	23,05	3,56	5,99
Interacción	37,46	2	18,73	2,89	5,14
Dentro del grupo	38,90	6	6,48		
Total	154,15	11			

El rendimiento de glucosa para la concentración de celulasa de 20 FPU/g es menor que los rendimientos de glucosa para las concentraciones de celulasa de 15 FPU/g y 10 FPU/g. Illanes (1994) citado por Torres (2009) menciona que entre mayor es la concentración de enzima, el proceso de hidrólisis es más rápido, sin embargo, según Tolan y Foody (1999), hay un límite superior en cuanto a la conversión de materiales lignocelulósicos. En este punto, la accesibilidad de la enzima a la celulosa es limitada, por lo que aunque se agregue un volumen mayor de enzima, los rendimientos no aumentan.

Al no ser significativa la concentración de hidróxido de sodio en el rendimiento de glucosa en el proceso de hidrólisis, se trabajará en la siguiente etapa con una concentración de 1,00%. En cuanto a la relación celulasa:celobiasa se utilizará un nivel intermedio, en este caso 15 FPU/g que corresponde a una relación de 7:1. Villegas (2010), al trabajar con bagazo de caña obtuvo que con una relación celulasa:celobiasa 5:1 mejoraron los rendimientos de etanol. Tropper (2010), también trabajó con bagazo de caña, y obtuvo un rendimiento máximo de 53,98% de glucosa al utilizar una relación de enzimas de 5:1 después de 40 horas de hidrólisis y una concentración de sustrato de 45 g/L.

6.5 Sacarificación y fermentación simultáneas: cuarta etapa experimental

6.5.1 Concentración de glucosa y pentosas al inicio de la fermentación

En la etapa anterior se definieron las condiciones a utilizar para la fermentación y la consecuente producción de etanol. Las condiciones utilizadas son: para el pretratamiento, una concentración de hidróxido de sodio de 1,00% (m/v) y en la etapa de hidrólisis una

concentración de celulasa de 15 FPU/g de rastrojo seco pretratado y una relación celulasa:celobiasa de 7:1 (v:v). Las demás condiciones se detallaron en la sección 5.7.

En el Cuadro 6.5 se muestran las concentraciones de glucosa y los rendimientos al inicio de la fermentación.

Cuadro 6.5 Concentración y rendimientos de glucosa al inicio de la fermentación.

Concentración de Rastrojo (g/L)	Concentración de glucosa (g/L)	Rendimiento (%)	Varianza	Desviación estándar
25,10	13,91	55,43	1,38	1,17
25,10	14,33	57,09		
35,10	19,56	55,73	21,52	4,64
35,10	17,26	49,17		
50,30	25,31	50,33	0	0
50,30	25,31	50,33		

Los rendimientos de glucosa son menores para la concentración de rastrojo de 50 g/L. En la Figura 6.8 se observa que hay una tendencia lineal al aumento de la concentración de glucosa con el aumento de la concentración de rastrojo. Sin embargo, si se hace una gráfica del rendimiento de glucosa contra la concentración de rastrojo, la tendencia es a la disminución del rendimiento como se muestra en la Figura 6.9.

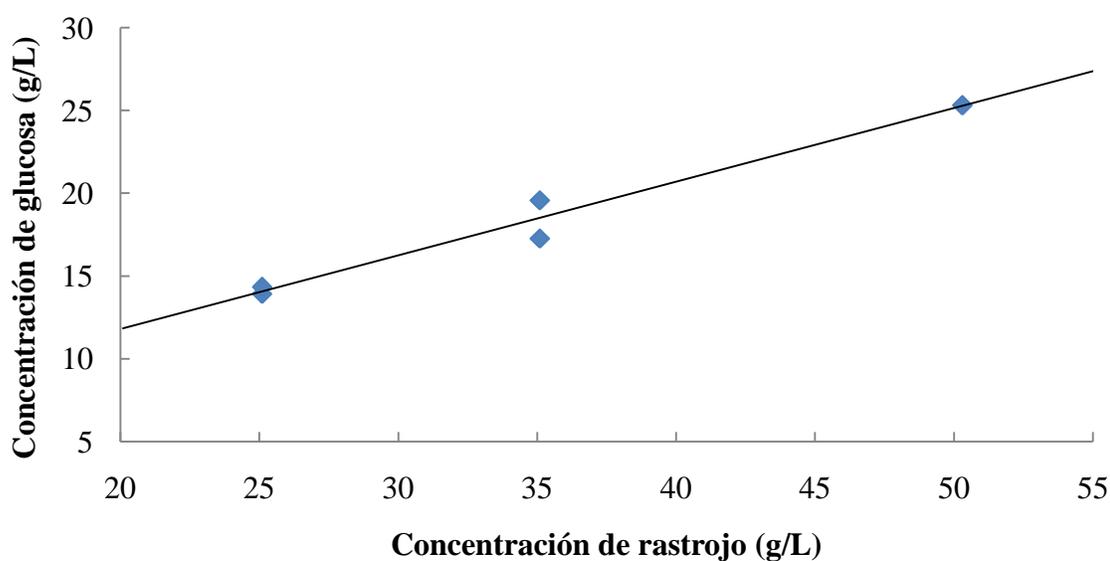


Figura 6.8 Concentración de glucosa en el tiempo cero de fermentación.

Esto sucede porque el aumento en la concentración de rastrojo no implica un aumento de la misma magnitud en la concentración de glucosa, por lo que los rendimientos disminuyen al aumentar la concentración del sustrato.

Las concentraciones promedio de glucosa para la concentración de rastrojo de 25,10 g/L es de 14,12 g/L, para la concentración de 35,10 g/L es de 18,41 g/L y para la concentración de 50,30 g/L es de 25,31 g/L.

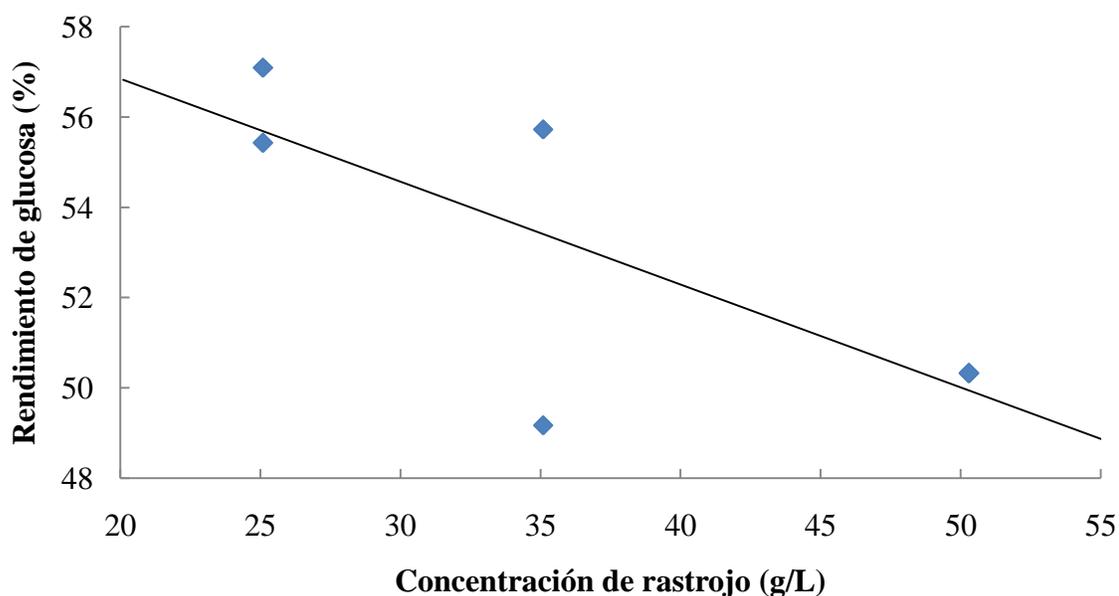


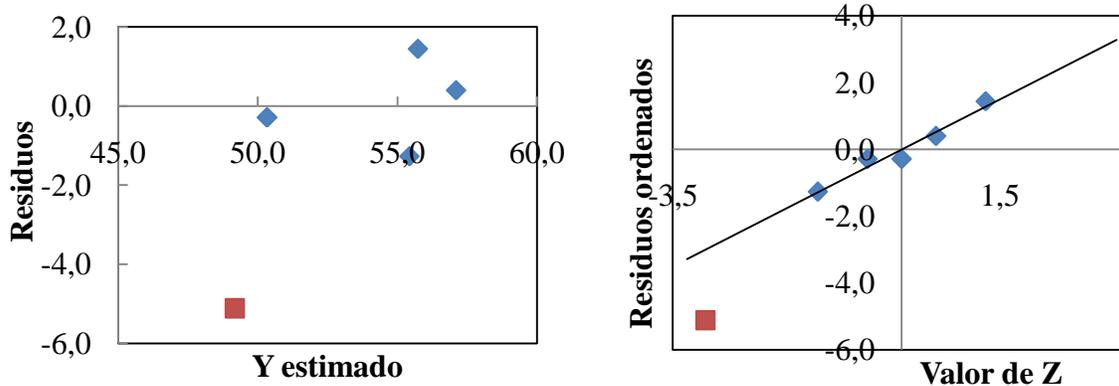
Figura 6.9 Rendimientos de glucosa en el tiempo cero de fermentación.

Si se aplica un ajuste lineal a los datos de la figura anterior, se obtiene el siguiente modelo con un coeficiente de correlación de 0,9016:

$$R_G = -0,2412 \cdot Cn_R + 62,751 \quad (6.1)$$

Donde R se refiere al rendimiento y los subíndices G y R se refieren a glucosa y rastrojo respectivamente.

Para este modelo, no se toma en cuenta el rendimiento de 49,17% ya que como se demostrará con el análisis, se desvía del modelo. Con esta relación se calculan los rendimientos para cada una de las concentraciones de rastrojo en estudio y luego se calculan los residuos. La Figura 6.10 se muestra el gráfico de residuos y el gráfico de normalidad.



a) Gráfico de residuos

b) Gráfico de normalidad

Figura 6.10 Análisis de residuos para el rendimiento de glucosa.

Los productos de la degradación de la hemicelulosa son la xilosa, manosa, ácido acético, galactosa y glucosa. Se determinó la concentración de pentosas al inicio de la fermentación. Los resultados se muestran en el Cuadro 6.6.

Cuadro 6.6 Concentración y rendimiento de pentosas al inicio de la fermentación

Concentración de rastrojo (g/L)	Concentración de pentosas (g/L)	Rendimiento de pentosas (%)
25,10	12,69	50,55
25,10	11,86	47,25
35,10	10,73	30,58
35,10	10,46	29,80
50,30	13,19	26,22
50,30	12,65	25,16

Las concentraciones de pentosas son similares para cada una de las concentraciones de rastrojo. La concentración promedio de pentosas es de 12,27 g/L para la concentración de rastrojo de 25,10 g/L, para la concentración de rastrojo de 35,10 g/L es de 10,60 g/L y para la concentración de 50,30 g/L es de 12,92 g/L. Debido a que los rendimientos se calculan con respecto a la concentración inicial de rastrojo, estos son mayores para la menor concentración (25,10 g/L). En la Figura 6.11 se puede observar esta situación.

Estos resultados hay que verlos con reserva, el hecho de que las concentraciones de pentosas se mantengan constantes puede responder al siguiente motivo, entre otros. Se puede observar en la Figura 6.12 que hay tejido parenquimático junto a los haces de fibras que aporta una concentración inicial de pentosas, debido a que el nivel de agitación es bajo no hay un

desprendimiento eficaz del material parenquimático que produzca un aumento en la concentración de pentosas con el aumento de la concentración de sustrato. Al aumentar la cantidad de rastrojo, el sistema de agitación es menos efectivo. La concentración de pentosas y el aumento de la concentración de rastrojo no fueron proporcionales, razón por la cual se obtienen estos resultados. Se ha reportado que algunas levaduras pueden fermentar la xilosa logrando obtener rendimientos cercanos al teórico de 0,51 g etanol/g xilosa (Chu & Lee, 2007).

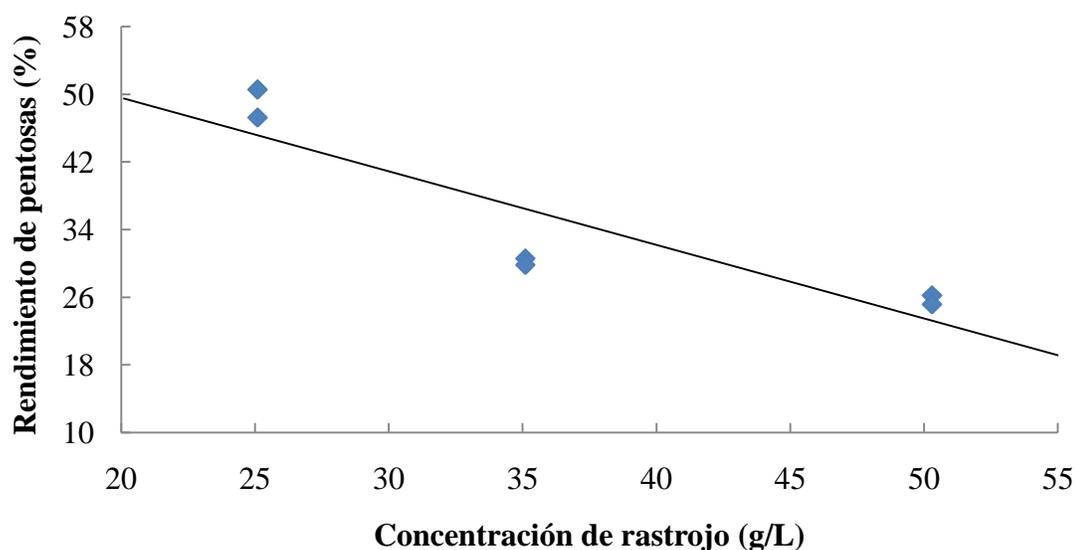
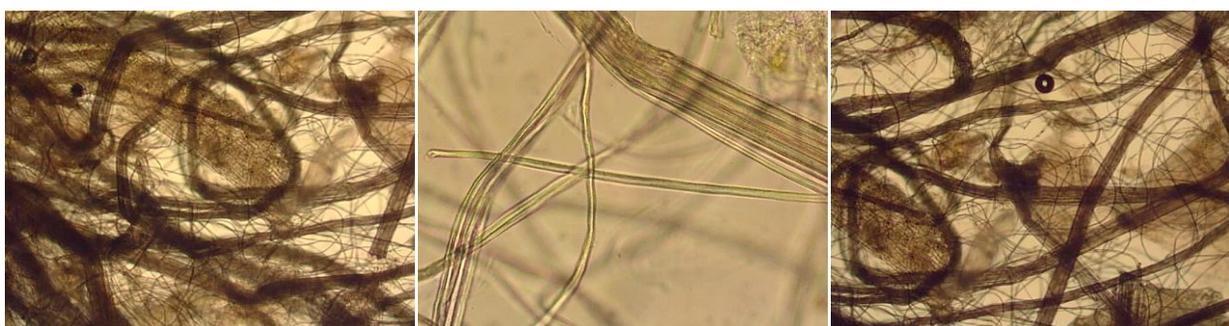


Figura 6.11 Rendimientos de pentosas al inicio de la fermentación.

En la Figura 6.12 se muestran micrografías de la biomasa pretratada para esta etapa. En ellas se observan los haces de fibras y tejido parenquimático, material que aporta pentosas. Mejorar las condiciones de lavado puede contribuir a que las fibras estén más limpias en cuanto al tejido parenquimático.



a) Aumento 4X

b) Aumento 10X

c) Aumento 4X

Figura 6.122 Micrografías de la fibra pretratada con 1,00% (m/v) de NaOH.

6.5.2 Etanol

El tiempo de hidrólisis fue de 25 horas, después de este tiempo se procedió a agregar los nutrientes y la levadura para dar inicio a la etapa de fermentación. En el Cuadro 6.7 se muestra la concentración de etanol.

Cuadro 6.7 Concentración de etanol para las diferentes concentraciones de rastrojo.

Concentración de rastrojo (g/L)	Concentración de etanol (%v/v)
25,10	2,00
25,10	1,80
35,10	1,80
35,10	1,80
50,30	2,00
50,30	1,80

Se obtiene una concentración promedio de etanol de 1,87% (v/v), que es una concentración baja si se compara con resultados obtenidos del orden de 7% a 8% con otras fuentes de carbohidratos utilizadas en la industria.

Las concentraciones de glucosa y azúcares reductores al finalizar la sacarificación y fermentación simultáneas son en promedio de 0,36 g/L y 1,43 g/L para la concentración de rastrojo de 25,10 g/L; 0,42 g/L y 1,19 g/L para la concentración de 35,10 g/L y de 2,47 g/L y 4,90 g/L para la concentración de sustrato de 50,30 g/L, por lo que prácticamente toda la glucosa se consumió en la etapa de fermentación. En el Cuadro 6.8 se presentan estos resultados.

Cuadro 6.8 Concentración de glucosa y azúcares reductores al finalizar la fermentación.

Concentración de rastrojo (g/L)	Concentración de glucosa (g/L)	Concentración de azúcares reductores (g/L)
25,10	0,36	1,42
25,10	0,36	1,44
35,10	0,39	1,12
35,10	0,44	1,25
50,30	0,59	1,17
50,30	4,34	8,63

6.6 Evaluación del efecto de la presencia de clorofila en el proceso de fermentación: quinta etapa experimental.

El objetivo de esta etapa es determinar si la presencia de clorofila tiene efecto en la hidrólisis y fermentación simultáneas del rastrojo de la piña. Los experimentos se realizaron con una concentración de sustrato de 35 g/L como se describe en la sección 5.8.

La clorofila es el pigmento verde de las plantas y desempeña un papel importante en el proceso de la fotosíntesis. En el Cuadro 6.9 se presentan las concentraciones y rendimientos de glucosa y pentosas al inicio de la fermentación. La concentración y rendimiento respecto a glucosa para las muestras cuyo líquido fue centrifugado para eliminar la mayor cantidad de clorofila posible son en promedio de 16,77 g/L y 47,90% respectivamente. En cuanto a las pentosas, la concentración y rendimiento promedio son de 8,98 g/L y 25,63%.

Cuadro 6.9 Concentración y rendimiento de glucosa y pentosas al inicio de la fermentación.

Muestra	Glucosa		Pentosas	
	Concentración (g/L)	Rendimiento (%)	Concentración (g/L)	Rendimientos (%)
Líquido centrifugado	17,32	49,47	10,37	29,61
	16,25	46,42	8,14	23,24
	16,74	47,80	8,42	24,06
Promedio	16,77	47,90	8,98	25,63
Líquido sin centrifugar	15,67	44,75	7,66	21,88
	16,84	48,08	8,43	24,07
	14,89	42,53	7,82	22,35
Promedio	15,80	45,12	7,97	22,76

Las muestras a las cuales se les agregó el líquido producto de la extracción de la fibra sin centrifugar, tienen una concentración promedio de glucosa de 15,80 g/L y un rendimiento de 45,12%. La concentración de pentosas promedio es de 7,97 g/L para un rendimiento de 22,76%.

Para determinar si hay diferencia significativa entre los dos tratamientos se realiza una prueba *t-student*. De esta prueba se encuentra que no hay una diferencia significativa en las concentraciones y rendimientos de glucosa al utilizar el líquido centrifugado o sin centrifugar. Los resultados de esta prueba se presentan en el Cuadro 6.10.

Cuadro 6.10 Resultados de la prueba de *t-student* del rendimiento de glucosa en las muestras de la quinta etapa experimental.

Parámetro	Valor
Promedio Líquido centrifugado	47,90
Promedio Líquido sin centrifugar	45,12
Varianza promedio	5,07
Grados de libertad	4
Estadístico t	1,51
Valor crítico de t (una cola)	2,13

Para los rendimientos de pentosas también se realiza una prueba *t-student* para determinar si hay alguna diferencia, estadísticamente significativa, entre la presencia de clorofila en el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas y la ausencia de la misma. El resultado indica que no hay diferencia significativa entre los dos tratamientos. Los resultados de esta prueba se presentan en el Cuadro B.23.

Se encontró que la concentración de etanol es igual para todas las muestras. Se obtuvo una concentración de etanol de 0,8% v/v para todas las muestras. Al finalizar el proceso de fermentación, se determinó la concentración de azúcares reductores en las muestras (Cuadro B.22). La concentración promedio es de 1,43 g/L para las muestras cuyo líquido fue centrifugado y de 1,35 g/L para las muestras que se hidrolizaron y fermentaron con la clorofila en disolución. El remanente de azúcares reductores es bajo.

Según los resultados anteriores, no hay diferencia en los rendimientos de glucosa, pentosas y producción de etanol al estar presente la clorofila en el proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- ◆ Al pretratar el rastrojo de la piña por un tiempo de 20, 30 y 40 minutos con concentraciones de NaOH de 0,75%, 1,00%, 1,25% y 1,50% (m/v) a una temperatura de 120 °C y 1,5 kg/cm², estadísticamente, ni el tiempo ni la concentración de NaOH son significativos respecto a la concentración y rendimientos de glucosa. Los mayores rendimientos de glucosa se alcanzan a 20 y 30 minutos de pretratamiento.
- ◆ No hay diferencia estadística entre utilizar una concentración de 1,00% y 1,25% de hidróxido de sodio en el pretratamiento de las fibras del rastrojo de piña. Este resultado se refuerza con el análisis anatómico mediante las micrografías.
- ◆ Estadísticamente, no hay diferencia entre utilizar una relación celulasa:celobiasa (v:v) de 5:1, 7:1 y 9:1 en la hidrólisis del rastrojo de la piña.
- ◆ Al aumentar la concentración de rastrojo hay un aumento en la concentración de glucosa. Para una concentración de 25,10 g/L la concentración de glucosa promedio es de 14,12 g/L, para la concentración de 35,10 g/L es de 18,41 g/L y para la concentración de 50,30 g/L es de 25,31 g/L con una concentración de celulasa de 15 FPU/g y una relación celulasa:celobiasa de 7:1 (v:v). Contrario a lo anterior, el rendimiento de glucosa disminuye debido a que el aumento en la concentración de glucosa no es de la misma magnitud que el aumento en la concentración de sustrato.
- ◆ Los rendimientos de pentosas disminuyen al aumentar la concentración de rastrojo en la hidrólisis, para la concentración de rastrojo de 25,10 g/L el rendimiento fue de 48,9%, para la concentración de 35,10 g/L de 30,19% y para la concentración de 50,3 g/L fue de 25,69%.
- ◆ Al realizar la sacarificación y fermentación simultáneas de diferentes concentraciones de rastrojo se obtuvo una concentración promedio de etanol de 1,87 % v/v.
- ◆ Estadísticamente, no hay diferencia al realizar el proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas con la presencia de clorofila o sin ella.
- ◆ Se obtuvo una concentración de etanol de 0,8% v/v tanto para las muestras cuyo líquido fue centrifugado como para las que tenían la clorofila en disolución.

- ◆ Aunque se alcanzaron altos rendimientos de glucosa, las concentraciones de etanol son bajas comparadas con las concentraciones que se obtienen con otros materiales en la industria.

7.2 RECOMENDACIONES

- ◆ Realizar la extracción de las fibras del rastrojo de la piña utilizando una desfibradora.
- ◆ Realizar estudios pretratando el material con otros tipos de pretratamiento como agua caliente y explosión con vapor y comparar los resultados con los obtenidos con hidróxido de sodio diluido.
- ◆ Utilizar otro método para la cuantificación de la concentración de etanol como cromatografía.
- ◆ Mejorar la etapa de lavado con el fin de eliminar la mayor cantidad de parénquima posible sin perder grandes cantidades de fibra y utilizar otro sistema de agitación.
- ◆ Utilizar un microorganismo capaz de fermentar la xilosa para determinar si los rendimientos de la producción de etanol a partir del rastrojo de la piña aumentan.

NOMENCLATURA

<i>A</i>	Absorbancia	Adimensional
<i>C_n</i>	Concentración	(g/L)
<i>R</i>	Coefficiente de correlación	Adimensional
<i>V</i>	Volumen	ml
<i>R</i>	Rendimiento	%
<i>m</i>	masa	g
Subíndices		
<i>G</i>	Referente a glucosa	
<i>R</i>	Referente a rastrojo	
<i>P</i>	Referente a pentosas	
<i>X</i>	Referente a xilosa	
<i>s.m</i>	Referente a la solución madre	
1	Referente a la curva de calibración 1	
2	Referente a la curva de calibración 2	
3	Referente a la curva de calibración 3	

BIBLIOGRAFÍA

- Adney, B., & Baker, J. (1996). Measurement of Cellulase Activities. Laboratory Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* , 101, 4851-4861.
- Amador, J.L. (2009). *Evaluación del efecto del tamaño de partícula, tiempo de pretratamiento y concentración de hidróxido de sodio en la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar*. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica
- Araya, R. (1998). *Utilización del rastrojo de piña (Ananas comusus) para la obtención de pulpa para la fabricación de papel*. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Balat, M. (2010). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review (Versión electrónica). *Energy Conversion and Management* .
- Barrientos, O., & Porras, S. (Febrero de 2010). Sector Agropecuario: Cadena productiva de piña: políticas y acciones. *Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria, SEPSA, Ministerio de Agricultura y Ganadería* . San José, Costa Rica: Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Chu, B., & Lee, H. (2007). Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnology Advances* , 25, 425-441.
- De la Cruz, J., & García, H. (s.f.). *Operaciones de Postcosecha de la piña*. Recuperado el 15 de mayo de 2010, de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: <http://www.fao.org/inpho/content/compand/text/ch33s/AE614s01.htm>.
- Elizondo, A. (30 de marzo de 2009). Análisis del mercado de la piña. *Servicio de información de Inteligencia de Mercados: Boletín Informativo* . San José, San José, Costa Rica: Centro Nacional de Producción.
- Fernández, S. (2009). *Hidrólisis enzimática de un material lignocelulósico para obtener azúcares fermentables*. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

- Foyle, T., Jennings, L., & Mulcahy, P. (2007). Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresource Technology*, 98, 3026-3036.
- Fuentes, J. (2001). *Iniciación a la Botánica*. Madrid: Ediciones Mundi Prensa.
- Gírio, F., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101, 4775–4800.
- Gutiérrez, T. (27 de Junio de 2009). Ratas afectan producción de piña, arroz y azúcar. *La prensa Libre*.
- Hendricks, A., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10-18.
- Howard, R., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 602-619.
- Illanes, A. (1994). *Biotecnología de enzimas*. Valparaíso: Ediciones Universitarias de la Universidad Católica de Valparaíso.
- Kumar, P., Barret, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, 3713-3729.
- Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M., Rooney, D., & Walker, G. (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, 156, 395-403.
- Lozanoff, J., Heinichen, S., Marchi, G., & Risso, E. (2007). *Bioenergía: Revisión de tecnologías emergentes*. Buenos Aires: Observatorio de Políticas Públicas.
- MINAET, MAG, & PROAGROIN. (2009). *Evaluación del impacto ambiental generado por la eliminación del rastrojo de piña a través de su incorporación al suelo*. San José. Costa Rica.
- Nlewem, K. C., & Thrash, M. E. (2010). Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass. *Bioresource Technology*, 101, 5426-5430.
- Ovando, S., & Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. (U. J. Tabasco, Ed.) *Universidad y Ciencia*, 21 (042), 113-122.

- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74, 25-33.
- Picado, D.; Vásquez, G. (2004). Propuesta y evaluación de un manejo tecnológico sostenible en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* L). Trabajo de Graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo con el grado de Licenciatura, Universidad EARTH, Costa Rica.
- Quesada, K., Alvarado, P., Sibaja, R., & Vega, J. (2005). Utilización de las fibras del rastrojo de piña (*Ananas comosus*, variedad champaka) como material de refuerzo en resinas de poliéster. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 6 (2), 158-179.
- REN21. (2010). Renewables Global Status Report.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1-11.
- Torres, J.F.(2009). *Evaluación del rendimiento de la hidrólisis enzimática de la celulosa a glucosa, con pretratamiento alcalino*. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Tropper, N. (2010). *Evaluación del efecto de la concentración de hidróxido de sodio, relación de enzimas, tiempo de hidrólisis y la concentración de un sustrato de bagazo de caña en la hidrólisis y fermentación de un sistema integrado*. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Villegas, M. (2010). *Evaluación del efecto del tamaño de partícula, concentración de enzimas y tiempo en la hidrólisis y fermentación integradas para la producción de etanol*. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Zhu, L. (2005). *Fundamentals study of structural features affecting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass*. Tesis para optar por el grado de doctorado en Filosofía, Facultad de Ingeniería Química, Texas A&M University, Texas, Estados Unidos.

APÉNDICES

APÉNDICE A

DATOS EXPERIMENTALES

Cuadro A.1 Datos para la elaboración de la solución madre de glucosa para el método de Trinder (Primera y Quinta etapa).

Dato	Valor
Masa de glucosa seca (g)	1,002
Volumen de aforo (L)	1,00

Cuadro A.2 Datos para la curva de calibración para la determinación de glucosa mediante el método de Trinder (Primera y Quinta Etapa).

Muestra	$V_{s.m}$ (mL)	V_{aforo} (mL)	Absorbancia (adim)
1	5	100	0,011
2	10		0,029
3	20		0,054
4	30		0,079
5	40		0,107
6	50		0,127

Cuadro A.3 Datos para la elaboración de la curva de calibración para determinar azúcares reductores mediante el método de Nelson Somogyi para la determinación de la actividad de la celulasa.

Concentración de azúcares reductores (g/L)	Absorbancia (Adim)
0,005	0,071
0,010	0,156
0,015	0,232
0,020	0,351
0,025	0,364
0,030	0,430
0,035	0,480

Cuadro A.4 Datos para la elaboración de la curva de calibración para determinar pentosas mediante el método de Bial modificado por Horecker.

Concentración de xilosa (g /L)	Absorbancia (Adim)
0,005	0,205
0,010	0,624
0,015	0,802
0,020	1,432
0,025	1,858

Cuadro A.5 Datos para la construcción de la curva de calibración de etanol a 20 °C.

Conc. Etanol (%v/v)	Índice de refracción
0	1,3330
0,10	1,3331
0,50	1,3334
1,00	1,3335
1,99	1,3340
2,99	1,3345
3,98	1,3350
4,98	1,3355
5,97	1,3360
6,97	1,3365
7,96	1,3370
8,96	1,3375
9,95	1,3380

Cuadro A.6 Resultados para la medición de la actividad de la celulasa empleando el método de Nelson Somogyi. Absorbancias medidas con un factor de dilución de 13,33.

Concentración de la enzima (mL enzima/mL buffer)	Absorbancias, adim	
	Repetición 1	Repetición 2
0,0018	0,104	0,096
0,0025	0,163	0,136
0,0075	0,261	0,272
0,0200	0,511	0,518

Cuadro A.7 Datos para la determinación de humedad de las muestras de rastrojo.

Muestra	Masa inicial (g)	Masa final (g)
1	10,060	1,406
2	10,400	1,435
3	10,370	1,339

Cuadro A.8 Datos para la determinación del porcentaje de cenizas del rastrojo de la piña.

Muestra	Masa inicio (g)	Masa crisol+muestra a 105 °C (g)	Masa crisol (g)	Masa final crisol+muestra a 580°C (g)
1	2,109	35,275	34,917	34,964
2	2,012	35,193	34,920	34,950

Cuadro A.9 Datos para la determinación de la solubilidad del rastrojo de la piña en agua caliente.

Muestra	Masa inicio (g)	Masa crisol (g)	Masa final crisol+muestra (g)
1	2,01	31,189	31,449
2	2,08	30,502	30,720

Cuadro A.10 Datos para la determinación de la solubilidad del rastrojo de la piña en agua fría.

Muestra	Masa inicio (g)	Masa crisol (g)	Masa final crisol+muestra (g)
1	2,01	31,189	31,413
2	2,15	30,502	30,720

Cuadro A.11 Datos para la determinación de la solubilidad del rastrojo de la piña en etanol/ciclohexano.

Muestra	Masa inicio (g)	Masa crisol (g)	Masa final crisol+muestra (g)
1	2,081	24,973	25,214

Cuadro A.12 Datos para la determinación del porcentaje de lignina presente en el rastrojo de la piña.

Muestra	Masa inicio (g)	Masa crisol (g)	Masa final crisol+muestra (g)
1	4,022	33,451	33,496

Cuadro A.13 Datos para la determinación del contenido de holocelulosa del rastrojo de la piña.

Muestra	Masa inicio (g)	Masa muestra libre de extractos (g)	Masa crisol (g)	Masa final crisol+muestra (g)
1	10,022	0,827	30,501	31,047

Cuadro A.14 Condiciones utilizadas para la primer etapa experimental.

Condición	Valor
Masa de rastrojo (g)	1,10
Volumen de agua (mL)	95,0
Volumen de buffer (mL)	5,0
Volumen de celulasa (mL)	0,233
Volumen de celobiasa (mL)	0,078
Concentración de rastrojo (g/L)	11,0
Concentración de enzima (FPU/g)	10,0

Cuadro A.15 Absorbancias obtenidas para la determinación de glucosa mediante el método de Trinder en la primera etapa experimental con un factor de dilución de 20.

Muestra	Concentración de NaOH (%m/v)	Absorbancia	
		Repetición 1	Repetición 2
1	0,00	0,038	0,043
2	0,25	0,052	0,049
3	0,50	0,051	0,038
4	0,50	0,057	0,034
5	0,75	0,076	0,059
6	1,00	0,080	0,069
7	1,00	0,099	0,095
8	1,25	0,077	0,079
9	1,25	0,078	0,076
10	1,50	0,089	0,089
11	1,75	0,082	0,071
12	2,00	0,068	0,071

Cuadro A.16 Condiciones utilizadas en la segunda etapa experimental.

Condición	Valor
Masa de rastrojo (g)	0,51
Volumen de agua (mL)	48,0
Volumen de buffer (mL)	2,5
Volumen de celulasa (mL)	0,120
Volumen de celobiasa (mL)	0,040
Concentración de rastrojo (g/L)	10,00
Concentración de enzima (FPU/g)	10,00

Cuadro A.17 Absorbancias obtenidas por el método de Trinder para las muestras de la segunda etapa experimental con un factor de dilución de 20. Tiempo de pretratamiento: 10 minutos.

Muestra	Concentración NaOH (%m/v)	Absorbancia (adim)	
		Repetición 1	Repetición 2
1	1,00	0,079	0,073
2	1,00	0,042	-
3	1,25	0,059	0,092
4	1,50	0,076	0,069
5	1,50	-	0,079

Cuadro A.18 Absorbancias obtenidas por el método de Trinder para las muestras de la segunda etapa experimental con un factor de dilución de 10. Tiempo de pretratamiento: 20 minutos.

Muestra	Concentración NaOH (%m/v)	Absorbancia (adim)	
		Repetición 1	Repetición 2
1	0,75	0,130	0,129
2	0,75	0,115	0,116
3	1,00	0,146	0,126
4	1,00	0,113	0,097
5	1,25	0,191	0,155
6	1,25	0,144	0,125
7	1,50	0,125	0,118
8	1,50	0,144	0,125

Cuadro A.19 Absorbancias obtenidas por el método de Trinder para las muestras de la segunda etapa experimental con un factor de dilución de 10. Tiempo de pretratamiento: 30 minutos.

Muestra	Concentración NaOH (%m/v)	Absorbancia (adim)	
		Repetición 1	Repetición 2
1	0,75	0,158	0,167
2	0,75	0,140	0,143
3	1,00	0,180	0,179
4	1,00	0,178	0,168
5	1,25	0,121	0,108
6	1,25	0,120	0,119
7	1,50	0,160	0,154
8	1,50	0,143	0,130

Cuadro A.20 Absorbancias obtenidas por el método de Trinder para las muestras de la segunda etapa experimental con un factor de dilución de 10. Tiempo de pretratamiento: 40 minutos.

Muestra	Concentración NaOH (%m/v)	Absorbancia (adim)	
		Repetición 1	Repetición 2
1	0,75	0,112	0,109
2	0,75	0,151	0,134
3	1,00	0,102	0,130
4	1,00	0,154	0,146
5	1,25	0,151	0,153
6	1,25	0,144	0,145
7	1,50	0,151	0,164
8	1,50	0,157	0,154

Cuadro A.21 Condiciones experimentales utilizadas en la tercera etapa experimental.

Condición	Valor
Masa de rastrojo (g)	1,03
Volumen de agua (mL)	95
Volumen de buffer (mL)	5
Volumen de celobiasa (mL)	0,05
Concentración de rastrojo (g/L)	10,3

Cuadro A.22 Volumen de celulasa utilizado en la tercera etapa experimental.

Concentración de celulasa (FPU/g)	Volumen de celulasa (mL)
10	0,240
15	0,360
20	0,480

Cuadro A.23 Absorbancias obtenidas por el método de Trinder para las muestras de la tercera etapa experimental con un factor de dilución de 50.

Muestra	Concentración NaOH (%m/v)	Concentración de celulasa (FPU/g)	Absorbancia (adim)
1	1,00	10	0,028
2	1,00	10	0,031
3	1,25	10	0,028
4	1,25	10	0,029
5	1,00	15	0,028
6	1,00	15	0,030
7	1,25	15	0,031
8	1,25	15	0,031
9	1,00	20	0,026
10	1,00	20	0,026
11	1,25	20	0,028
12	1,25	20	0,030

Cuadro A.24 Condiciones utilizadas en la cuarta etapa experimental.

C_{nR} (g/L)	Masa rastrojo seco pretratado (g)	V celulasa (mL)	Concentración de celulasa (FPU/g)	V celobiasa (mL)	V agua (mL)	V buffer (mL)
25,10	7,53	2,6	15	0,376	283	14
35,10	10,54	3,7	15	0,527	282	14
50,30	15,14	5,2	15	0,757	281	14

Cuadro A.25 Absorbancias obtenidas con el método de Trinder para las muestras de la cuarta etapa experimental en el tiempo cero de la fermentación con un factor de dilución de 50 y en el caldo de fermentación con un factor de dilución de 2,5.

Concentración de rastrojo (g/L)	Inicio de la Fermentación	
	Absorbancia	
	Repetición 1	Repetición 2
25,10	0,058	0,055
25,10	0,061	0,056
35,10	0,084	0,083
35,10	0,071	0,074
50,30	0,110	0,112
50,30	0,113	0,109

Cuadro A.26 Absorbancias obtenidas mediante el método de Bial modificado por Horecker para las muestras de la cuarta etapa experimental en el tiempo cero de la fermentación para un factor de dilución de 800.

Concentración de rastrojo (g/L)	Absorbancia	
	Absorbancia	
	Repetición 1	Repetición 2
25,10	1,339	0,861
25,10	1,311	0,719
35,10	0,953	0,845
35,10	0,884	0,858
50,30	1,147	1,156
50,30	1,105	1,088

Cuadro A.27 Absorbancias obtenidas mediante el método de Nelson Somogyi para las muestras de la cuarta etapa experimental al finalizar la fermentación con un factor de dilución de 100 y por el método de Trinder para un factor de dilución de 2,5.

Concentración de rastrojo (g/L)	Glucosa		Azúcares reductores	
	Absorbancia		Absorbancia	
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 1	Repetición 2
25,10	0,024	0,024	0,183	0,379
25,10	0,026	0,023	0,206	0,292
35,10	0,024	0,031	0,261	0,292
35,10	0,029	0,035	0,264	0,282
50,30	0,047	0,046	0,384	0,358
50,30	0,208	0,187	0,531	0,531

Cuadro A.28 Índice de refracción medido a 20 C de las muestras destiladas de la cuarta etapa experimental.

Concentración de rastrojo (g/L)	Índice de refracción
25,10	1,3340
25,10	1,3339
35,10	1,3339
35,10	1,3339
50,30	1,3340
50,30	1,3340

Cuadro A.29 Condiciones utilizadas en la quinta etapa experimental.

Cn_R (g/L)	Masa rastrojo seco pretratado (g)	V celulasa (mL)	Concentración de celulasa (FPU/g)	V celobiasa (mL)	V Líquido (mL)	V buffer (mL)
35,01	10,547	3,7	15	0,525	282	15

Cuadro A.30 Absorbancias obtenidas para las muestras de la quinta etapa experimental en el tiempo cero de la fermentación con el método de Trinder con un factor de dilución de 50 y con el método de Bial modificado por Horecker con un factor de dilución de 800.

Muestra	Glucosa		Pentosas	
	Absorbancia (adim)		Absorbancia (adim)	
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 1	Repetición 2
Líquido centrifugado	0,091	0,090	0,846	0,877
	0,085	0,085	0,636	0,628
	0,091	0,084	0,672	0,651
Líquido sin centrifugar	0,081	0,083	0,592	0,574
	0,087	0,089	0,681	0,643
	0,079	0,077	0,589	0,611

Cuadro A.31 Absorbancias obtenidas mediante el método de Nelson Somogyi para las muestras de la cuarta etapa experimental al final de la fermentación para un factor de dilución de 100.

Muestra	Absorbancia	
	Repetición 1	Repetición 2
Líquido centrifugado	0,199	0,195
	0,201	0,200
	0,241	0,229
Líquido sin centridugar	0,177	0,180
	0,201	0,200
	0,225	0,216

Cuadro A.32 Índice de refracción medido a 20 C de las muestras destiladas de la quinta etapa experimental.

Tratamiento	Índice de refracción
Líqu. Centrifugado	1,3334
	1,3334
	1,3334
Líqu. Sin centrifugar	1,3334
	1,3334
	1,3334

APÉNDICE B

RESULTADOS INTERMEDIOS

Cuadro B.1 Datos para la elaboración de la curva de calibración para determinar glucosa mediante el método de Trinder para la primera y quinta etapa experimental.

Muestra	Concentración de la solución madre (g/L)	Concentración (g/L)	Absorbancia (adim)
1	1,00	0,05	0,011
2		0,10	0,029
3		0,20	0,054
4		0,30	0,079
5		0,40	0,107
6		0,50	0,127

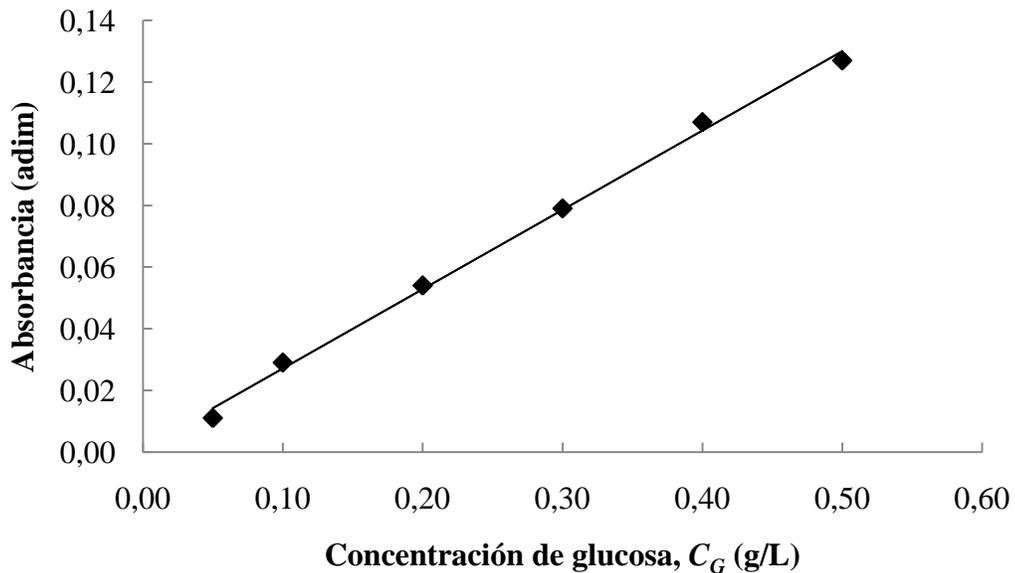


Figura B.1 Curva de calibración para la determinación de glucosa mediante el método de Trinder para la primera y quinta etapa experimental.

Cuadro B.2 Valores de los parámetros de la ecuación de mejor ajuste para la curva de calibración del método de Trinder para la primera y quinta etapa experimental.

Pendiente (L/g)	Intercepto	R^2
0,257	0,0014	0,9968

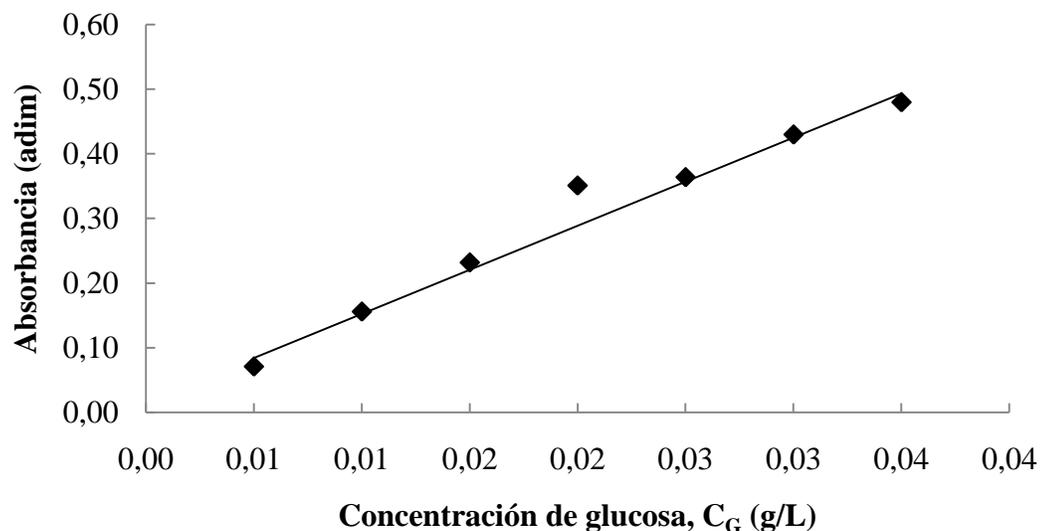


Figura B.2 Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores mediante el método de Nelson Somogyi.

Cuadro B.3 Valores de los parámetros de la ecuación de mejor ajuste para la curva de calibración del método de Nelson Somogyi.

Pendiente (L/g)	Intercepto	r^2
13,621	0,0164	0,9956

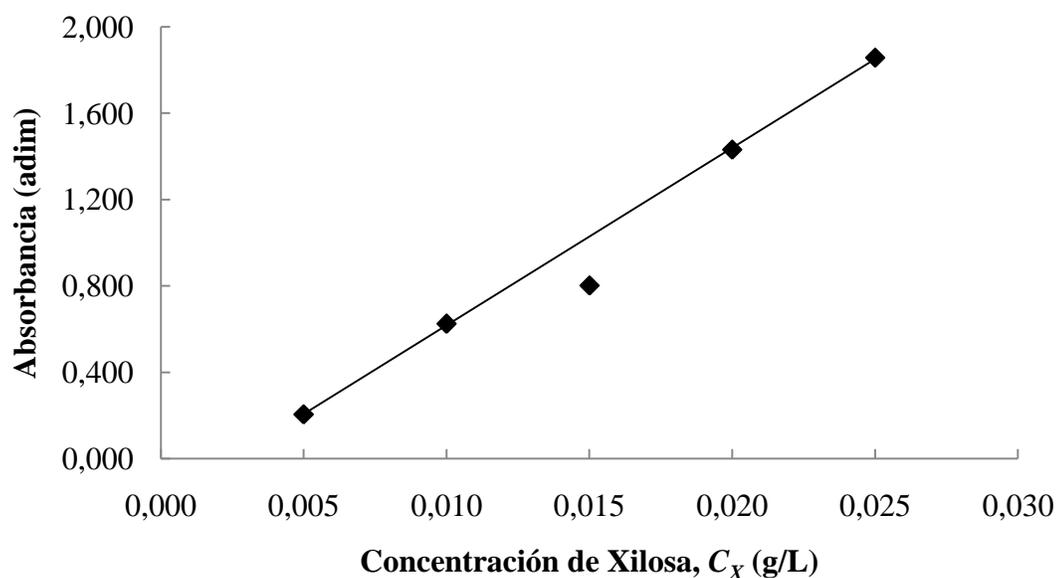


Figura B.3 Curva de calibración para la determinación de pentosas mediante el método de Bial modificado por Horecker.

Cuadro B.4 Valores de los parámetros de la ecuación de mejor ajuste para la curva de calibración del método de Bial modificado por Horecker.

Pendiente (L/g)	Intercepto	r^2
82,27	-0,2047	0,9999

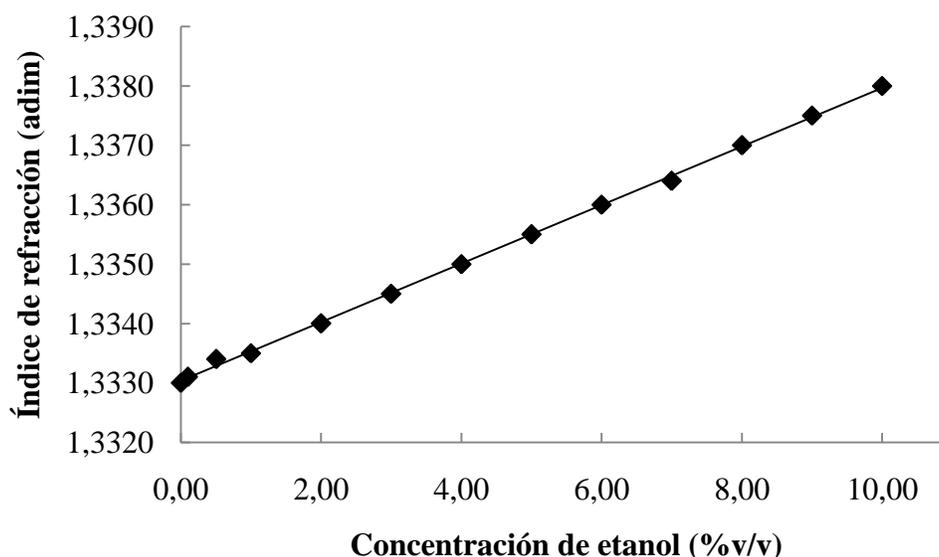


Figura B.4 Curva de calibración para la determinación del porcentaje de etanol.

Cuadro B.5 Valores de los parámetros de la ecuación de mejor ajuste para la curva de calibración para la determinación del porcentaje de etanol.

Pendiente (%v/v)	Intercepto	r^2
0,0005	1,333	0,9993

Cuadro B.6 Resultados para la determinación de la actividad de la celulasa.

Muestra	Concentración (mL enzima/mL buffer)	Absorbancia promedio	Azúcares liberados, mg/0,5 mL de solución de enzima
1	0,0018	0,100	0,61
2	0,0025	0,150	0,98
3	0,0075	0,267	1,84
4	0,0200	0,515	3,66

Cuadro B.7 Valores de los parámetros para determinar la actividad de la celulasa.

Parámetro	Valor
Concentración de enzima que libera 2,00 mg de glucosa (mL enzima/mL buffer)	0,0087
Actividad de la enzima (FPU/g)	43

Cuadro B.8 Humedad del rastrojo de la piña

Muestra	% Humedad	Promedio
1	86,02	86,43
2	86,20	
3	87,08	

Cuadro B.9 Cantidad de cenizas presentes en el rastrojo de la piña.

Muestra	Masa inicial de la muestra en base seca (g)	Masa final de la muestra (g)	% Cenizas	Promedio
1	0,358	0,047	13,14	12,06
2	0,273	0,030	10,99	

Cuadro B.10 Solubilidad del rastrojo de la piña en agua caliente

Muestra	Masa inicial en base seca (g)	Masa final (g)	% Solubilidad	Promedio
1	0,273	0,224	18,06	20,50
2	0,283	0,218	22,94	

Cuadro B.11 Solubilidad del rastrojo de la piña en agua fría.

Muestra	Masa inicial en base seca (g)	Masa final (g)	% Solubilidad	Promedio
1	0,273	0,252	10,45	13,86
2	0,292	0,249	17,28	

Cuadro B.12 Solubilidad del rastrojo de la piña en una mezcla de etanol-ciclohexano.

Muestra	Masa inicial en base seca (g)	Masa final	% Solubilidad
1	0,283	0,241	14,85

Cuadro B.13 Resultados para el porcentaje de lignina en el rastrojo de la piña.

Muestra	Masa inicial en base seca (g)	Masa final (g)	% Lignina
1	0,547	0,0452	8,30

Cuadro B.14 Resultados para el porcentaje de holocelulosa presente en el rastrojo de la piña.

Muestra	Masa de la muestra libre de extractos (g)	Masa de holocelulosa (g)	% Holocelulosa
1	0,827	0,547	66,2

Cuadro B.15 Concentración de glucosa en las muestras de la primera etapa experimental.

Muestra	Concentración de glucosa (g/L)		
	Repetición 1	Repetición 2	Promedio
1	2,85	3,23	3,04
2	3,93	3,70	3,82
3	3,86	2,85	3,35
4	4,32	2,53	3,43
5	5,80	4,48	5,14
6	6,11	5,26	5,68
7	7,59	7,28	7,43
8	5,88	6,03	5,96
9	5,96	5,80	5,88
10	6,81	6,81	6,81
11	6,27	5,41	5,84
12	5,18	5,41	5,30

Cuadro B.16 Rendimientos de glucosa de las muestras de la primera etapa experimental.

Muestra	Rendimiento			Desviación estándar
	Repetición 1	Repetición 2	Promedio	
1	25,87	29,41	27,64	
2	35,77	33,65	34,71	
3	35,06	25,87	30,47	3,00
4	39,30	23,05	31,17	
5	52,74	40,72	46,73	
6	55,56	47,79	51,68	9,50
7	68,99	66,17	67,58	
8	53,44	54,86	54,15	0,50
9	54,15	52,74	53,44	
10	61,93	61,93	61,93	
11	56,98	49,20	53,09	
12	47,08	49,20	48,14	

Cuadro B.17 Concentración y rendimientos de glucosa de las muestras de la segunda etapa experimental para un tiempo de pretratamiento de 10 minutos.

Muestra	Concentración NaOH (%m/v)	Concentración de glucosa(g/L)	Rendimiento (%)
		Promedio	Promedio
1	1,00	7,20	71,97
2	1,00	4,35	43,51
3	1,25	5,77	57,74
4	1,50	6,90	69,04
5	1,50	7,45	74,48

Cuadro B.18 Concentración y rendimientos de glucosa de las muestras de la segunda etapa experimental para un tiempo de pretratamiento de 20 minutos.

Muestra	Concentración NaOH	Concentración de glucosa (g/L)	Rendimiento (%)
	(%m/v)	Promedio	Promedio
1	0,75	5,84	58,37
2	0,75	5,25	52,51
3	1,00	6,11	61,09
4	1,00	4,81	48,12
5	1,25	7,66	76,57
6	1,25	6,05	60,46
7	1,50	5,50	55,02
8	1,50	6,05	60,46

Cuadro B.19 Concentración y rendimientos de glucosa de las muestras de la segunda etapa experimental para un tiempo de pretratamiento de 30 minutos.

Muestra	Concentración de NaOH	Concentración de glucosa	Rendimiento
	(%m/v)	/g/L)	(%)
		Promedio	Promedio
1	0,75	7,22	72,18
2	0,75	6,34	63,39
3	1,00	7,93	72,08
4	1,00	7,66	69,60
5	1,25	5,21	52,09
6	1,25	5,42	54,18
7	1,50	6,99	69,87
8	1,50	6,13	61,30

Cuadro B.20 Concentración y rendimientos de glucosa de las muestras de la segunda etapa experimental para un tiempo de pretratamiento de 40 minutos.

Muestra	Concentración NaOH	Concentración de glucosa	Rendimiento
	(%m/m)	(g/L)	(%)
		Promedio	Promedio
1	0,75	5,04	50,42
2	0,75	6,38	63,81
3	1,00	5,27	52,72
4	1,00	6,69	66,95
5	1,25	7,28	72,80
6	1,25	6,92	69,25
7	1,50	6,78	67,78
8	1,50	6,88	68,83

Cuadro B.21 Concentración de glucosa de las muestras de la tercera etapa experimental.

Muestra	Concentración de glucosa (g/L)
1	5,61
2	6,25
3	5,61
4	5,82
5	5,61
6	6,04
7	6,25
8	6,25
9	5,18
10	5,18
11	5,61
12	6,04

Cuadro B.22 Concentración de azúcares reductores en el caldo de fermentación de las muestras de la quinta etapa experimental.

Muestra	Concentración de azúcares reductores (g/L)		
	Repetición 1	Repetición 2	Promedio
Líquido Centrifugado 1	1,34	1,31	1,33
Líquido Centrifugado 2	1,36	1,35	1,35
Líquido Centrifugado 3	1,65	1,56	1,60
Líquido Sin centrifugar 1	1,18	1,20	1,19
Líquido Sin centrifugar 2	1,36	1,35	1,35
Líquido Sin centrifugar 3	1,53	1,47	1,50

Cuadro B.23 Resultados de la prueba de *t-student* del rendimiento de pentosas en las muestras de la quinta etapa experimental.

Parámetro	Valor
Promedio (Líquido centrifugado)	25,63
Promedio (Líquido sin centrifugar)	22,76
Varianza promedio	6,68
Grados de libertad	4
Estadístico t	1,36
Valor crítico de t (una cola)	2,13

Cuadro B.24 Rendimientos de glucosa calculados con el modelo y residuos para la cuarta etapa experimental.

Cn_R (g/L)	Rendimiento (%)	Rendimiento calculado (%)	Residuos
25,10	55,43	56,70	-1,27
25,10	57,09	56,70	0,40
35,10	55,73	54,28	1,44
50,30	50,33	50,62	-0,29
50,30	50,33	50,62	-0,29
35,10	49,17	54,28	-5,11

APÉNDICE C

MUESTRA DE CÁLCULO

C.1 Cálculo de la ecuación de mejor ajuste para las curvas de calibración de los métodos para determinar glucosa, azúcares reductores, pentosas y etanol.

La ecuación de mejor ajuste para cada uno de los métodos: método de Trinder para cuantificar glucosa, método de Nelson Somogyi para la cuantificar azúcares reductores y el método de Bial modificado por Horecker así como los parámetros de la ecuación para cuantificar el porcentaje de etanol, se obtuvieron mediante el método de mínimos cuadrados utilizando el programa Microsoft Excel.

C.2 Cálculo de la humedad de la muestra de rastrojo de piña.

La humedad del rastrojo de la piña se calcula mediante la ecuación C.1:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_{\text{inicial rastrojo}} - m_{\text{final de rastrojo}}}{m_{\text{inicial de rastrojo}}} \cdot 100 \quad (\text{C.1})$$

Sustituyendo los datos del Cuadro A.7, fila 2, columnas 2 y 3:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{10,400 \text{ g} - 1,435 \text{ g}}{10,400 \text{ g}} \cdot 100 = 86,20 \%$$

Se obtiene el resultado que se reporta en el Cuadro B.8, fila 2 columna 1.

C.3 Cálculo del porcentaje de cenizas del rastrojo de la piña.

El porcentaje de cenizas del rastrojo de la piña se calcula mediante la ecuación C.2:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \cdot 100 \quad (\text{C.2})$$

Sustituyendo los datos del Cuadro B.9, fila 1, columnas 2 y 3:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{0,047 \text{ g}}{0,358 \text{ g}} \cdot 100 = 13,14\%$$

Resultado que se reporta en el Cuadro B.9 fila 1, columna 4.

C.4 Cálculo de los extractos solubles en agua fría, agua caliente o en la mezcla de etanol-ciclohexano.

El porcentaje de extractos solubles en agua fría, agua caliente o en la mezcla etanol-ciclohexano se calcula mediante la ecuación C.3:

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{m_{\text{rastrojo seco al inicio}} - m_{\text{rastrojo final}}}{m_{\text{rastrojo seco al inicio}}} \cdot 100 \quad (\text{C.3})$$

Para la solubilidad en agua caliente, al sustituir los valores del cuadro B.10, fila 1, columnas 2 y 3 se obtiene:

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{0,273 \text{ g} - 0,2240 \text{ g}}{0,273 \text{ g}} \cdot 100 = 18,06\%$$

El resultado se reporta en el cuadro B.10, fila 1, columna 4.

C.5 Cálculo del porcentaje de lignina en el rastrojo de la piña.

El porcentaje de lignina presente en el rastrojo de la piña se calcula mediante la ecuación C.4:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{m_{\text{rastrojo seco al inicio}}}{m_{\text{rastrojo al final}}} \cdot 100 \quad (\text{C.4})$$

Con los datos del Cuadro B.13, fila 1, columnas 2 y 3 se obtiene el siguiente resultado:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{0,547 \text{ g}}{0,0452 \text{ g}} \cdot 100 = 8,30\%$$

Dato que se reporta en el Cuadro B.13, fila 1, columna 4.

C.6 Cálculo de la actividad de la celulasa.

Para calcular la actividad de la enzima se utiliza la ecuación C.5:

$$\text{Actividad de la enzima} = \frac{0,37}{Cn_{\text{enzima que libera 2 mg de glucosa}}} \text{ ml}^{-1} \quad (\text{C.5})$$

Al sustituir el dato del Cuadro B.7, fila 1, columna 2, se obtiene:

$$\text{Actividad de la enzima} = \frac{0,37}{0,0087} \text{ ml}^{-1} = 43 \frac{\text{FPU}}{\text{g}}$$

Este resultado se reporta en el Cuadro B.7, fila 2, columna 2.

C.7 Cálculo del volumen de celulasa a utilizar en cada corrida experimental.

Para calcular el volumen de celulasa a utilizar en cada corrida experimental se utilizó la ecuación C.6:

$$V_{celulasa} = \frac{m_{\text{rastrojo seco pretratado}} \cdot Cn_{\text{celulasa}}}{\text{Actividad de la celulasa}} \quad (\text{C.6})$$

Al sustituir los datos del Cuadro A.21, fila 1, columna 2; Cuadro A.22, fila 2, columna 1 y Cuadro B.7, fila 2, columna 2 se obtiene:

$$V_{celulasa} = \frac{1,03 \text{ g} \cdot 15 \text{ FPU/g}}{43 \text{ FPU/mL}} = 0,360 \text{ mL}$$

El resultado se reporta en el Cuadro A.22, fila 2, columna 2.

C.8 Cálculo de la concentración de rastrojo utilizada en las corridas experimentales.

La concentración del rastrojo se calcula con la ecuación C.7:

$$Cn_R = \frac{m_{\text{rastrojo seco pretratado}}}{V_{H_2O} + V_{\text{Buffer}} + V_{\text{celulasa}} + V_{\text{celobiasa}}} \quad (\text{C.7})$$

Con los datos del Cuadro A.14, filas 1, 2, 3, 4, y 5, columna 2, se obtiene:

$$Cn_R = \frac{1,10 \text{ g}}{(95,0 + 5,0 + 0,233 + 0,078)\text{mL} \cdot \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}}} = 11 \text{ g/L}$$

Resultado que se reporta en el Cuadro A.14, fila 6, columna 2. Las concentraciones de rastrojo utilizadas en las siguientes etapas experimentales se calculan de la misma forma.

C.9 Cálculo de las concentraciones de glucosa, azúcares reductores y pentosas.

El cálculo de las concentraciones de glucosa, azúcares reductores y pentosas de cada una de las muestras en cada etapa experimental se realiza con la ecuación C.8:

$$Cn = \frac{(\text{Absorbancia} \pm \text{Intercepto})}{\text{Pendiente}} \cdot \text{factor de dilución} \quad (\text{C.8})$$

El signo depende del signo del intercepto de la ecuación de mejor ajuste del método. Por ejemplo, para el cálculo de la concentración de glucosa de una de las muestras de la primera etapa experimental, se sustituyen los datos del Cuadro A.15, fila 2, columna 3; Cuadro B.2, fila 1, columnas 1 y 2 se obtiene:

$$Cn_G = \frac{(0,052 - 0,0014) \text{ g}}{0,257 \text{ L}} \cdot 20 = 3,93 \text{ g/L}$$

El resultado se reporta en el Cuadro B.15, fila 2, columna 2.

C.10 Cálculo del rendimiento.

Para calcular el rendimiento de glucosa o pentosas, se utiliza la ecuación C.9:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{Cn}{Cn_R} \cdot 100 \quad (\text{C.9})$$

Donde el numerador es la concentración de glucosa o pentosas según sea el caso. Por ejemplo, al sustituir los datos del Cuadro B.15, fila 3, columna 4; Cuadro A.14. fila 6, columna 2, se obtiene el siguiente rendimiento de glucosa:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{3,35 \text{ g/L}}{11,0 \text{ g/L}} \cdot 100 = 30,47\%$$

El resultado se reporta en el Cuadro B.16, fila 3, columna 4.

C.11 Cálculo de la concentración de etanol

La concentración de etanol se calcula con la ecuación C.10:

$$Cn_{etanol} = \frac{n_D - \text{Intercepto}}{\text{Pendiente}} \quad (\text{C.10})$$

Al sustituir los datos del Cuadro A.30, fila 1, columna 2; Cuadro B.5, fila 1, columnas 1 y 2 se obtiene:

$$Cn_{etanol} = \frac{1,3340 - 1,333}{0,0005} = 2,00 \%$$

El resultado se reporta en el Cuadro 6.4, fila 1, columna 2.

APÉNDICE D

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

D.1 Procedimiento experimental.

A continuación se expone el procedimiento para el pretratamiento del rastrojo, hidrólisis y fermentación del rastrojo de la piña.

1. Extraer la fibra del rastrojo y secarla.
2. Preparar las disoluciones de hidróxido de sodio a las concentraciones (m/v) correspondientes para cada caso.
3. Colocar en erlenmeyer la masa de rastrojo seco que se necesita pretratar, agregar la solución de NaOH a razón de 10mL/g de rastrojo seco. Tapar el erlenmeyer.
4. Colocar el erlenmeyer en el autoclave y calentar hasta 121 °C durante el tiempo establecido.
5. Al concluir el tiempo, bajar la presión del autoclave lentamente antes de abrirlo para sacar las muestras. Una vez que se hayan sacado los erlenmeyer, dejarlos enfriar a temperatura ambiente.
6. Transferir la biomasa pretratada a un beaker. Agregar agua y agitar, pasar el rastrojo pretratado por un colador. Repetir los lavados hasta que el filtrado sea claro. Realizar un último lavado con agua destilada. Secar el rastrojo pretratado para ser utilizado posteriormente en la hidrólisis.
7. Colocar en los erlenmeyer la cantidad de rastrojo seco pretratado correspondiente. Agregar el agua y el buffer de citrato. Tapar los erlenmeyer.
8. Colocar los erlenmeyer en la incubadora, con una agitación de 70 rpm y 50 °C de temperatura.
9. Cuando la temperatura en los erlenmeyer alcance los 50 °C, agregar las enzimas. En este momento inicia el proceso de hidrólisis.
10. Transcurrido el tiempo establecido para la hidrólisis, tomar muestras del líquido para ser analizadas. Si se va a realizar la fermentación, bajar la temperatura de la incubadora a 32 °C. En caso contrario, refrigere las muestras para detener la reacción.

11. Agregar los nutrientes y la levadura para dar inicio al proceso de fermentación. Colocar un tapón con una manguera con el extremo abierto con el fin de permitir el burbujeo.
12. Al finalizar la etapa de fermentación, filtrar o centrifugar la muestra y tomar 2 mL para los respectivos análisis y 50 mL para la determinación de etanol.

D.2 Determinación de humedad

Procedimiento

1. Pesar una muestra de 10 g .
2. Calentar la muestra en un horno gravimétrico a 100°C hasta que el peso de la muestra sea constante.