

Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica



Titulación Integral **Tesis**

**MEJORA DEL RENDIMIENTO DE LOS AZÚCARES LIBERADOS POR LA
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL BAGAZO DE SORGO DULCE
EXTRUIDO A TRAVÉS DE UNA MATRIZ DINÁMICA VARIANDO LAS
ENERGÍAS MECÁNICAS ESPECÍFICAS**

Que para obtener el título de:

Ingeniero Químico

Presenta:

Adriana Alamilla Morales 12070480

Asesor:

Dr. Luciano Aguilera Vázquez

	Nombre del documento: Formato para la autorización de impresión		Código: FR-G-ITCM-7.5.1-31
	Referencia a la Norma ISO 9001:2008 7.5.1		Revisión: 2
			Página 1 de 1



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Ciudad Madero

Cd. Madero, Tam., 13/Marzo/2018

ÁREA: **DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
QUÍMICA Y BIOQUÍMICA.**
NO. OFICIO: **T.025/18**
ASUNTO: **AUTORIZACIÓN DE
IMPRESIÓN**

C. ADRIANA ALAMILLA MORALES
No. CTRL. 12070480
P R E S E N T E

De acuerdo al fallo emitido por el Jurado asignado para la revisión de su trabajo profesional, integrado por los siguientes catedráticos:

PRESIDENTE: DR. LUCIANO AGUILERA VÁZQUEZ
SECRETARIO: DR. ERICK HEREDIA OLEA
VOCAL: DRA. SILVIA BEATRIZ BRACHETTI SIBAJA
SUPLENTE: M.I.A. ELVIA CAROLINA HERNANDEZ ROCHA

Y considerando que llena todos los requisitos del reglamento de titulación en vigor del Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, doy a Usted autorización para que proceda a imprimir su trabajo profesional de la **TITULACIÓN INTEGRAL OPCION TESIS.**

"MEJORA DEL RENDIMIENTO DE LOS AZÚCARES LIBERADOS POR LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL BAGAZO DE SORGO DULCE EXTRUIDO A TRAVÉS DE UNA MATRIZ DINÁMICA VARIANDO LAS ENERGÍAS MECÁNICAS ESPECÍFICAS".

Lo hago de su conocimiento para los efectos y fines correspondientes a su examen Profesional, esperando que el logro mismo sea congruente con sus deseos profesionales.

ATENTAMENTE

"POR MI PATRIA Y POR MI BIEN"

M.A. FRANCISCO RAFAEL ARTEAGA FANG
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE
INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA.



c.c. Archivo
FRAF/dahb*



Ave. 1° de Mayo y Sor Juana I. de la Cruz Col. Los Mangos, C.P. 89440 Cd. Madero, Tam.
Tel. (833) 357 48 20. e-mail: itcm@itcm.edu.mx
www.itcm.edu.mx



ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	6
CAPÍTULO 1 ESTADO DEL ARTE.....	8
CAPÍTULO 2 FUNDAMENTO TEÓRICO	11
CAPÍTULO 3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	17
2.1 Materiales	17
2.2 Pretratamiento	18
2.3 Determinación de extractos en biomasa	20
2.4 Determinación de fibra	22
2.5 Carbohidratos Estructurales	26
2.6 Lignina Klason.....	28
2.7 Hidrólisis.....	29
2.8 Fermentación	30
2.9 Determinación de alfa amino nitrógeno (FAN)	31
CAPÍTULO 4 RESULTADOS.....	33
CONCLUSIONES.....	37
RECOMENDACIONES.....	38
REFERENCIAS	39

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Condiciones de extrusión obtenidas de seis diferentes tratamientos con bagazo de sorgo dulce.	16
Tabla 2. Caracterización de la fibra del bagazo de sorgo dulce	31
Tabla 3. Cuantificación de Azúcares por HPLC fermentables obtenidos de la hidrólisis enzimática del tratamiento con las mejores condiciones de extrusión.	32
Tabla 4. Cantidad de nitrógeno soluble (FAN) a través del tiempo durante la fermentación.	32
Tabla 5. Comparativa entre composición de caña de azúcar y bagazo de sorgo dulce.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Planta de sorgo dulce (<i>Sorghum bicolor</i>)	12
Figura 2. Equipo utilizado para los pretratamientos: extrusor de doble tornillo BTSM (Bühler, Suiza), tolva de alimentación de sólidos (K-Tron, Suiza) y bomba de alimentación de líquidos (Bühler, Suiza).	17
Figura 3. Configuraciones de tornillos utilizadas para los 6 diferentes pretratamientos del bagazo de sorgo dulce por extrusión.	18
Figura 4. Tobera Fly acoplada al extrusor BCTM (Bühler AG, Suiza) utilizada para expandir los seis tratamientos de bagazo de sorgo dulce.	18
Figura 5. Esquema aparato soxhlet	19
Figura 6. Concentraciones obtenidas durante la fermentación del bagazo de sorgo dulce extrudido e hidrolizado enzimáticamente.	33

INTRODUCCIÓN

La conjunción de precios al alza de los hidrocarburos y deterioro de la situación geopolítica internacional ha generado cierta sensación de urgencia en los gobiernos. Este problema se ha abordado de formas muy variadas, específicamente en términos de combustibles para el transporte, los investigadores y los gobiernos de todo el mundo están buscando fuentes alternativas de energía para el transporte (Song, 2014). En éste contexto surge el término seguridad energética, que se define como la seguridad de disponibilidad de una oferta adecuada de energía a precios asumibles. Sin embargo, hay otras dimensiones importantes como son la seguridad de las instalaciones, social y medioambiental (Escribano, 2006).

Los combustibles alternos se derivan de fuentes diferentes al petróleo reduciendo la dependencia del mismo y en ocasiones utilizando fuentes renovables. Generalmente se asocian con una menor contaminación que cuando se utiliza gasolina o diésel. Dentro de este grupo se encuentra el gas natural que, aunque es un combustible fósil genera una menor contaminación del aire, algo similar sucede con la electricidad, con la desventaja que para la producción de esta en muchas ocasiones todavía se recurre a fuentes no renovables, debido a que aún no se cuenta con las estaciones suficientes en el país; así como el biodiesel que se obtiene a partir de aceites vegetales. La mejor opción es la generación de hidrógeno, sin embargo, hasta el momento no se ha logrado aplicar en México.

El caso del etanol es diferente, su uso en motores de combustión interna se remonta a 1897 cuando Henry Ford diseñó el modelo T para que funcionará con etanol, pero en 1908 con el incremento en los impuestos al producto se limitó su uso. Esta idea fue retomada durante ambas guerras mundiales. En el caso de México, primero se pretende sustituir los oxigenantes. En un estudio realizado por la Secretaría de Energía y financiado por El Banco Interamericano de Desarrollo (BID) se recomendó un programa gradual de etanol con tres fases, hasta llegar a un 10% en todas las gasolinas en México, como ya se hace en algunos países. Lo anterior permitiría una reducción en la importación de gasolina. De acuerdo a la NOM-086-Sernamat-Sener-SCFI-2005, “especificaciones de los combustibles fósiles para la protección ambiental”, las gasolinas que se consumen en el país deben

contener 2.7% de oxígeno, para lo cual actualmente se utiliza MTBE (metil terbutil éter) y TAME (teramil metil éter), la cantidad aproximada que se requiere de MTBE Y TAME en México es de 23 mil barriles diarios, pero la producción nacional llegó sólo a 10 mil 800 barriles diarios y el resto se cubrió con importaciones (Becerra-Pérez, 2009).

Se utilizan tres tipos de materias primas para la producción a gran escala de etanol de origen biológico (bioetanol): sustancias con alto contenido de sacarosa, sustancias con alto contenido de almidón, sustancias con alto contenido de celulosa. El proceso a partir de almidón es más complejo que a partir de sacarosa porque el almidón debe ser hidrolizado previamente para convertirlos en azúcares. A partir de celulosa es todavía más complejo ya que primero se debe pretratar la materia vegetal para que la celulosa pueda ser luego atacada por las enzimas hidrolizantes. El pretratamiento puede consistir en una combinación de trituración, pirólisis y ataque con ácidos y otras sustancias. Esto es uno de los factores que explican por qué los rendimientos en etanol son altos para la caña de azúcar, mediocres para el maíz y bajos para la madera.

El pretratamiento supone uno de los grandes costes económicos y energéticos del proceso. El pretratamiento es un proceso crucial en la producción de bioetanol, ya que tiene un gran impacto en las siguientes etapas. La hidrólisis enzimática y la fermentación se ven afectadas por factores como la digestibilidad de la celulosa, la toxicidad y la reología del medio, que dependen del tipo de pretratamiento y su efectividad. Los pretratamientos de tipo térmico o termoquímico son hasta el momento los más prometedores para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica debido a su probada efectividad en muchos tipos de biomasa lignocelulósica y a que su tecnología está bien establecida a nivel comercial

La extrusión a diferentes condiciones de esfuerzo mecánico empleando un dado dinámico representa una opción de pretratamiento capaz de aumentar la liberación de azúcares a partir de fuentes de sacarosa. Además de no generar desechos de difícil manejo, esta opción permite tener un proceso continuo de producción a gran escala, dando la alternativa de integrar otros procesos conjuntamente.

CAPÍTULO 1 ESTADO DEL ARTE

Para la obtención de etanol con fines de combustible se han explorado múltiples opciones entre las que destacan raíces, granos almidonosos y caldos azucarados, como la caña de azúcar.

A partir de caldos dulces. La producción de etanol a partir de caldos dulces, como son de caña de azúcar, remolacha y sorgo; es una de las tecnologías más sencillas de implementar, sin embargo, en el caso de la remolacha México no cuenta con las condiciones para el crecimiento de la misma y para el uso de caña de azúcar se tienen varias políticas alrededor que hacen que no pueda ser considerado una alternativa; el caldo de sorgo puede ser una opción ya que se tienen zonas importantes cuyas características de tierra y clima pueden dar lugar a estos cultivos energéticos.

A partir de almidón. En el caso de utilizar fuentes de almidón como granos y tubérculos se enfrenta a dos situaciones, se puede afectar la seguridad alimentaria al utilizar cultivos destinados para la alimentación humana o animal, para el desarrollo de biocombustibles, también al dejar de usar zonas destinadas a cosechas alimentarias, para su uso enfocado a la producción de almidón como materia prima de bioetanol. Especialmente en el caso de México, a diferencia de Estados Unidos, el utilizar maíz tendría un impacto muy importante en este punto. Un cultivo que ha sido ampliamente estudiado y propuesto para México es el sorgo (Chuck-Hernández, 2009).

A partir de material lignocelulósico. En rubro es muy amplio a considerar ya que se puede utilizar todo el desecho agroindustrial de tal forma que se asegure el aprovechamiento integral del cultivo seleccionado.

El interés por el uso de materiales lignocelulósicos como materia prima en procesos de transformación por microorganismos es importante desde hace varias décadas. Entre las razones fundamentales se tienen que:

- La materia lignocelulósica es el producto agroindustrial de mayor abundancia.

- Es una fuente de materia prima renovable, por constituir una parte estructural en el reino vegetal.

- Los materiales lignocelulósicos son menos costosos que los materiales convencionalmente utilizados para producir etanol.

La biomasa lignocelulósica es menos costosa que los materiales convencionalmente utilizados para producir etanol. Entre los materiales lignocelulósicos más utilizados o estudiados para la obtención de este alcohol se hallan los residuales agrícolas y forestales. Entre los residuos agrícolas, se encuentran los de la industria azucarera, siendo el bagazo de la caña de azúcar, el material más utilizado y estudiado debido a que es abundante, renovable y de bajo costo. La paja de caña de azúcar está en fase de estudios previos para determinar su factibilidad.

En la industria del maíz molido se reportan estudios con la fibra de maíz que representa una fuente renovable que está disponible en cantidades significativas y debe servir potencialmente como una materia prima para la producción de alcohol grado combustible. Otros residuos menos estudiados de esta industria son las hojas, tallos y mazorcas.

Tradicionalmente, la paja y la cáscara de arroz se queman unidas con otros residuos agroindustriales. Estos residuos, a largo plazo, podrían convertirse en fuente de biomasa para soportar el crecimiento sustancial de la industria del etanol en Estados Unidos, unido a los residuos de la industria del maíz. El material residual de la cosecha de mandioca puede ser usado en la producción de etanol, para obtener rendimientos aceptables. Otros desechos

agrícolas estudiados son: la paja de trigo, los tallos de girasol, los tallos de tabaco, las cáscaras de maní y los residuos de la industria de la naranja, entre otros.

Entre los desechos forestales que se pueden utilizar se encuentran: la madera subutilizada, residuos leñosos, maderas corrompidas, exceso de árboles nuevos y pequeños árboles. También se pueden explotar los árboles de rápido crecimiento, los arbustos y algunas hierbas.

Los sorgos dulces pueden alcanzar rendimientos de tallo de 35 a 50 ton/ha una cantidad de biomasa considerable, característica importante en un cultivo cuyos fines se encaminan a la producción de biocombustibles, principalmente de etanol. De acuerdo con (Sanjuan et al., 2007), los datos del Balance Nacional Energético de México mostraron que la biomasa participó con el 3.4% en la estructura de la energía del país en el 2004, un porcentaje muy bajo comparado con el 90.6% que representaron los hidrocarburos fósiles en el mismo año. Lo cual nos indica el gran espacio de oportunidad que tiene la biomasa como materia prima, si se piensa en la obtención de combustibles a partir de fuentes renovables.

El proyecto se centra en el análisis de la potencialización de la hidrólisis enzimática que puede generar el pasar las muestras por un pretratamiento de extrusión con cambios de la energía mecánica, así como diferentes configuraciones en los tornillos utilizando una matriz dinámica. Buscando obtener bioetanol de segunda generación, para su uso como un biocombustible que ayude a satisfacer la creciente demanda de este producto que actualmente es únicamente compensada por los obtenidos de orígenes fósiles. La metodología por seguir será una hidrólisis enzimática para la conversión de la celulosa y hemicelulosa contenidos en el sorgo a carbohidratos de 5 y 6 carbonos para posteriormente realizar una fermentación alcohólica usando diversas cepas de levaduras capaces de convertir dichos azúcares en etanol.

CAPÍTULO 2 FUNDAMENTO TEÓRICO

El aumento en el calentamiento global es debido en gran medida a los gases de efecto invernadero, provocados por el excesivo uso de combustibles fósiles para transportación humana. Con el fin de disminuir los efectos dañinos del uso de los derivados de petróleo; se propone la producción de bioetanol como carburante para motores de combustión interna, para sustituirlo parcial o totalmente. El remplazo gradual de la gasolina por etanol en los vehículos automotores está requiriendo el desarrollo de procesos de bajo costo. La estrategia actual se basa en la utilización de materias primas abundantes que permitan reducir dichos costos como es el material lignocelulolítico.

México es un país muy diverso, donde es posible encontrar especies vegetales endémicas e introducidas que pueden utilizarse en la generación de biocombustibles, a su vez, el gobierno federal promueve esto sin descuidar la seguridad alimentaria y el aprovechamiento eficiente de materia prima derivada de las actividades agrícolas, forestales y pecuarias; así como aquella derivada de algas y procesos enzimáticos y biotecnológicos. Es necesario identificar especies vegetales que muestren potencial para producir biodiesel y etanol, con lo cual se evitará el uso de cultivos básicos para la alimentación humana en la industria de los biocombustibles tal como se estipula en la ley de bioenergéticos (Revelles-Saucedo, et al. 2010). En este contexto se pueden utilizar desechos generales o bien generar cultivos dedicados como el sorgo dulce.

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor*) (Figura 1) pertenece a la familia de las gramíneas, tiene una altura de 1 a 2 m, presenta inflorescencias en panojas compactas, semicompactas

o semilaxas, con espiguillas que nacen a pares, una fértil y la otra estéril. Sus semillas de 3 mm, esféricas y oblongas, de color negro, rojizo y amarillento. Tiene un sistema radicular que puede llegar en terrenos permeables a 2 m de profundidad. Las flores tienen estambres y pistilos. El valor energético del grano de sorgo es un poco inferior al del maíz. Se puede estimar como media 1.08 UF/kg.



Figura 1. Planta de sorgo dulce (*Sorghum bicolor*)

Comparándolo con el grano de maíz, el de sorgo es generalmente un poco más rico en proteínas, pero más pobre en materia grasa. Derivado de estas características, el cultivo de sorgo ha cobrado interés como un cultivo bioenergético, de los que se utiliza toda la planta para la fabricación de biocarburantes.

En este contexto, el sorgo dulce representa una alternativa forrajera, y pueden diferenciarse variedades aptas para producción de grano y aquellas útiles para la obtención de forrajes. Además, algunas variedades son consideradas doble propósito, ya que son cultivadas para producción de forraje y obtención de grano. En ambientes donde la disponibilidad de agua es limitada, el sorgo puede superar al maíz en rendimiento de materia seca y valor nutritivo del forraje ya que requiere 25% menos de agua (Nava-Berumen et al., 2017). Es considerado la mejor opción para la producción de bioetanol en lugar de maíz y caña de azúcar ya que (Williams-Alanís et al., 2017):

- Es tolerante a sequía, salinidad, altas temperaturas y suelos inundados
- Ciclo de crecimiento relativamente corto

- Muy buena adaptación
- Su siembra a partir de semilla es fácil y barata
- Se adapta a cosecha mecanizada
- Es uno de los cultivos de mayor eficiencia en el uso de la radicación solar

Junto con todo lo anterior el cultivo puede ser utilizado integralmente para producción de etanol pudiendo usarse tanto grano, caldo y bagazo. La selección y generación de variedades es una etapa muy importante para lograr altos rendimientos de etanol (Williams-Alanis et al. 2017).

La biomasa del sorgo dulce queda en el “bagazo de sorgo” que contiene celulosa dentro de una estructura físicoquímica conocida como sustrato lignocelulósico. La celulosa es el polímero natural más abundante en la naturaleza que representa del 40-60% de la pared celular de los vegetales; es un polímero lineal que consta de unidades de D-anhidroglucopiranosas unidas por enlaces beta-1-4-glucosídicos. La celulosa es policristalina, puesto que sus fibras poseen zonas cristalinas (altamente ordenadas) incrustadas en zonas amorfas. Por otra parte, la lignina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza llegando a representar del 10-30% del peso del vegetal. Es un polímero amorfo tridimensional de origen fenólico (Varela-Almanza et al. 2014). En el caso específico del “bagazo de sorgo dulce” en un estudio realizado por Apolinar-Hidalgo et al. (2015) se observó que el contenido mínimo de lignina presente es 20.48, llegando a alcanzar valores hasta de 21.89% en tanto que los valores de celulosa van desde 41 hasta 43%.

La hidrólisis o sacarificación enzimática de la celulosa es un paso crítico en la generación de etanol a partir de material lignocelulósico y depende de factores como la accesibilidad de la celulosa, cristalinidad y tamaño del cristal, grado de polimerización, área superficial disponible del sustrato y la barrera de lignina tanto en términos de contenido y distribución, contenido de hemicelulosa, tamaño de partícula, porosidad y grosor de la pared celular, entre otros. (Zhang et al. 2011; Yan et al. 2015). Los pretratamientos físicos y químicos son necesarios para incrementar el área superficial y mejorar el acceso de la celulosa para la hidrólisis enzimática (Zhang et al. 2011), entre estos se puede nombrar pulverización, pirólisis, explosión con vapor, amino, dióxido de carbono,

ozonólisis, hidrólisis alcalina, deslignificación oxidativa (Varela-Almanza et al. 2014). En todo caso, se debe tener cuidado en mantener el balance adecuado entre rendimiento de etanol y costo de producción.

La extrusión ha probado su utilidad para procesamiento de biomasa, levadura gastada, granos gastados de destilería, cáscara de frutas entre otras. Se puede utilizar en el procesamiento de materiales celulósicos y ricos en fibra dando lugar a la descomposición de su estructura química y mejorando o bien logrado su aplicación como materia prima de alimentación humana o de animales. La separación y corte de la fibra se debe a las fuerzas de compresión y cizalla generados por la configuración seleccionada de los tornillos (Mościcki y Wójtowicz, 2011).

Los extrusores se pueden clasificar de forma general en dos tipos (a) simples o sencillos y (b) dobles. Las principales características de estos dos tipos de extrusores son

Extrusor Tornillo Simple: Se puede clasificar con base a diferentes características como es seco o húmedo, segmentado o continuo. Desde el punto de vista práctico y aplicado la clasificación con base en la cizalla suele ser la más aplicada: formadores en frío, formadores por alta presión, de cocción por baja cizalla, de cocción con alta cizalla. Las ventajas de los extrusores simples con respecto a los dobles es que son mucho más fácil de operar y se requiere menos capacitación para su operación, además de que llegan a costar solo la mitad de lo que cuesta uno de doble tornillo, el ensamblado de los tornillos representa una menor complicación ya que no se requiere la interacción el otro tornillo. Sin embargo, presenta desventajas significativas como es que no se puede autolimpiarse, menor capacidad de mezclado en relación a uno de doble tornillo, el rango de tamaño de granulometría de la materia prima es muy limitado, no se pueden utilizar harinas o polvos muy fines y en caso que el material sea muy grueso no se logra cocer adecuadamente, además se requiere contar con un preacondicionador.

Extrusor Doble Tornillo: Los requerimientos de productos con formas y tamaños más allá de la capacidad de los extrusores de tornillo simple dio lugar al surgimiento de los extrusores de doble tornillo que se definen como aquellos extrusores que tienen dos tornillos de la misma longitud en el mismo canal. Estos extrusores son mucho más

complicados que los simples, pero al mismo tiempo dan lugar a una mucho mayor flexibilidad y mejor control. Estos son de dos tipos con base en la dirección que giran los tornillos (Riaz, 2001):

- Contra-rotatorios, los tornillos giran en sentido contrario
- Co-rotatorios, los tornillos giran en el mismo sentido

A su vez en cada caso se puede subclasificar como tornillos entrelazados o separados, en este último caso es como si fueran dos tornillos simples lado a lado con una pequeña porción de los barriles en común, de tal forma que no se genera empuje positivo, lo cual si sucede en los tornillos entrelazados dando lugar a un mezclado eficiente.

En el área de alimentos, la extrusión ha incrementado en popularidad por (Guy, 2001):

- Versatilidad ya que se puede dar lugar a un amplio grupo de productos, muchos de los cuales no podrían ser generados fácilmente por otros procesos; la facilidad con la que se puede hacer cambio de ingredientes, condiciones de operación y dado de salida
- Aun cuando la inversión inicial puede ser alta, el proceso se caracteriza por ser de bajo costo y alta productividad
- Calidad del producto, ya que, debido al corto tiempo de exposición, aun cuando se alcanzan altas temperaturas, se logró conservar muchos componentes termolábiles de los alimentos.
- Amigable con el ambiente, ya que es un proceso de baja humedad, que no produce efluentes significativos, reduce el tratamiento de aguas y los niveles de contaminación ambiental.

Estas cualidades del proceso han dado lugar a que su aplicación permee a aplicaciones en otros materiales biológicos con diferentes fines o aplicaciones como es la extracción de compuestos bioactivos o bien como un pretratamiento para la producción de etanol a partir de material lignocelulósico.

Dentro del extrusor de doble tornillo produce cambios físicos y químicos a través del proceso de macro y micromezclado de los componentes, ya que el mezclado involucra una

importante transferencia de energía que juega un papel muy importante en la transformación del material. La transferencia de calor en este proceso puede ser tanto de origen térmico (cuando se utilizan sistema de enfriamiento y calentamiento) como de origen mecánico (el flujo de calor generado cuando el material es cizallado por el movimiento de los tornillos) (Mottaz y Bruyaz 2001). Todo esto puede dar lugar a grandes moléculas como almidón, celulosa y hemicelulosa puede ser fragmentadas por la cizalla que se presenta durante la extrusión y por otra parte estos mismos fragmentos pueden unirse para formar grandes complejos insolubles o compuestos de Maillard (Camire 2001). La celulosa, hemicelulosa y lignina se comportan diferente durante el tratamiento barotermico como la extrusión.

Recientemente se acuñó el termino “blasting extrusión” proceso que comparado con otros como es la modificación térmica o química de materiales muestra una alta eficiencia térmica dinámica, conservación de componentes nutricional termosensibles, bajo costo de operación y fácil de escalar. Todo esto se debe a que este proceso combina múltiples fenómenos físicos como es la alta presión, estrés de cizalla, torque y una alta temperatura, todo en un corto tiempo (Chen et al., 2014). El proceso se ha evaluado en residuos de soya para aumentar fibra dietaria soluble que se atribuye a la intensidad de la energía de calentamiento instantánea además de los fenómenos de cavitación, fricción y compresión por impacto que dan como resultado a nivel microestructural materiales con superficies mas irregulares, gruesas y llenas de espacios generando una mayor área superficial y también interna en los materiales (Chen, 2014; Yan, 2015)

Heredia-Olea, 2013 realizaron un trabajo en el cual se estudió el efecto del tratamiento con ácido clorhídrico o sulfúrico diluido observando un efecto importante por el tipo de ácido, pero al evaluar sólo extrusión se obtuvieron rendimientos similares, pero con la ventaja de que no se genera un efluente contaminante, ni se requiere una etapa de detoxificación posterior al pretratamiento. Estudios posteriores permitieron establecer a través de un diseño de superficie de respuesta cuales eran las mejores condiciones de extrusión que permitieran generar el mayor rendimiento de etanol, llegando a producir hasta 198.1 mL de etanol por kilogramo de bagazo seco.

CAPÍTULO 3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para medir adecuadamente la potencialización de la hidrólisis que genera el usar la extrusión como pretratamiento, se realizó la caracterización de los extrudidos de bagazo de sorgo dulce siguiendo las técnicas empleadas por Heredia-Olea y col. (2012).

La materia prima que se empleó fue un bagazo de sorgo dulce proveniente del Centro de investigación regional noreste (CIRNE) ubicado en la ciudad de Río Bravo en el estado de Tamaulipas. Para la obtención de extractos acuosos y etanólicos, se usó el rotovapor. Dicho equipo permite una evaporación del solvente eficaz y rápida, disminuyendo su punto de ebullición con la ayuda de una variación de presión.

Otro equipo empleado fue el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), para la cuantificación correcta de azúcares, así como para detectar la presencia de etanol y otros compuestos generados por la fermentación. Se empleó una columna de altas temperaturas, usando como fase móvil agua de alta pureza y ácido sulfúrico 5 mm en base acuosa.

2.1 Materiales

El bagazo de sorgo utilizado se obtuvo del Centro de Investigación Regional Noreste (CIRNE) que forma parte del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); ubicado en la Ciudad de Río Bravo en el estado de Tamaulipas. Cabe destacar que durante la siembra el cultivo fue atacado por dos plagas: *Uromyces phaseoli typica* Arth y *Phyllophaga spp.* Este hecho debe ser considerado importante al momento de comparar la caracterización bioquímica del bagazo con datos reportados anteriormente.

2.2 Pretratamiento

El bagazo de sorgo previamente triturado en un molino de martillos fue sometido a un proceso de extrusión termoplástica utilizando un extrusor Bühler de doble tornillo (Figura 2). El bagazo fue administrado a una tasa de alimentación constante de 7.4 kg/h. Se obtuvieron seis diferentes tratamientos donde se variaron la temperatura del cañón del extrusor, la humedad mediante la dosificación de agua dentro del cañón (Tabla 1) y la configuración de los tornillos del extrusor (Figura 3).



Figura 2. Equipo utilizado para los pretratamientos: extrusor de doble tornillo BTSM (Bühler, Suiza), tolva de alimentación de sólidos (K-Tron, Suiza) y bomba de alimentación de líquidos (Bühler, Suiza).

Tabla 1. Condiciones de extrusión obtenidas de seis diferentes tratamientos con bagazo de sorgo dulce.

Tratamiento	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Presión de la placa (bar)	77.5	77.1	71.9	87.9	90.8	112.0
Esfuerzo Mecánico (Wh/kg)	1108.7	518.1	878.2	554.3	961.3	943.9
Velocidad tornillos (rpm)	201.0	201.1	201.0	201.0	201.1	201.0
Torque relativo	95.8	47.4	75.8	45.4	90.8	90.2
Temperatura de carcasa (°C)	125.3	186.4	136.5	185.0	128.9	118.6
Temperatura de producto (°C)	101.0	94.3	116.1	97.4	109.0	86.7
Humedad de trabajo (%)	39.7	26.0	28.5	24.2	25.7	28.8

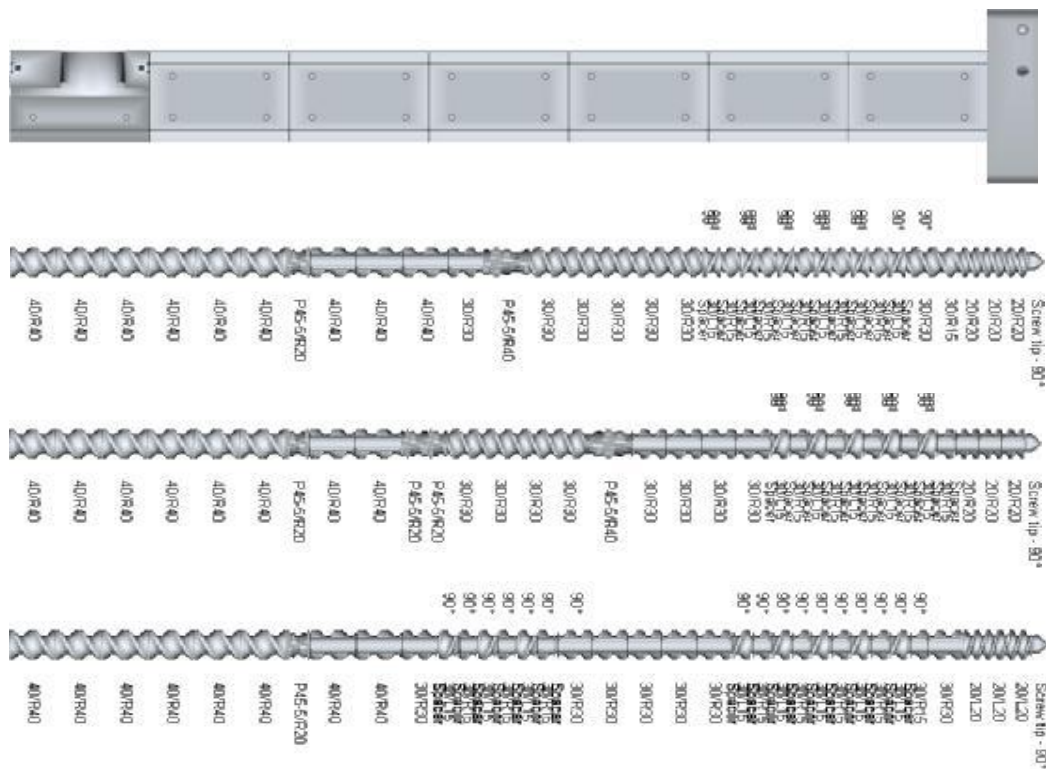


Figura 3. Configuraciones de tornillos utilizadas para los 6 diferentes pretratamientos del bagazo de sorgo dulce por extrusión.

Asimismo, se utilizó la tobera FLY (Figura 4) del extrusor la cual es una pieza única desarrollada por la compañía Bühler AG (Uzwil, Suiza), que permite disminuir la distancia entre el dado y los tornillos evitando retener la energía mecánica en la punta del cañón y expulsando la materia prima por el dado a gran velocidad.

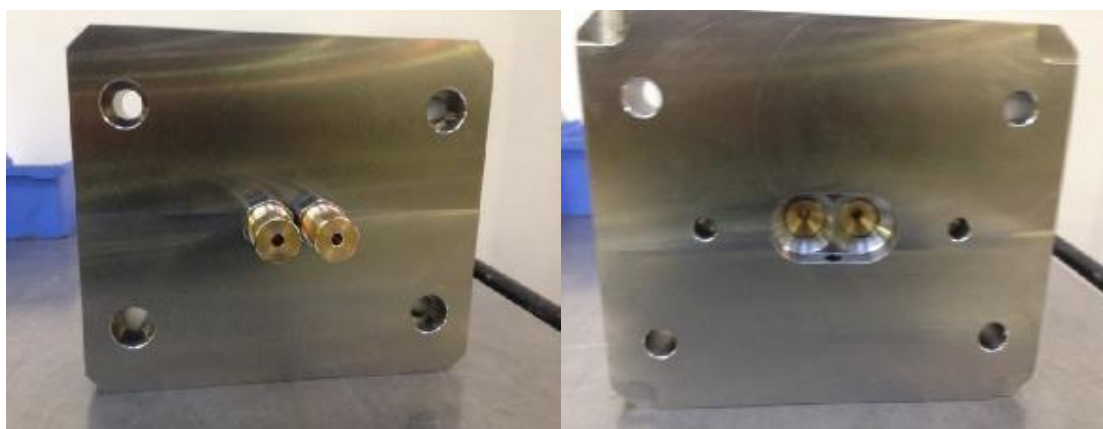


Figura 4. Tobera Fly acoplada al extrusor BCTM (Bühler AG, Suiza) utilizada para expandir los seis tratamientos de bagazo de sorgo dulce.

2.3 Determinación de extractos en biomasa

Esta técnica se realiza para remover compuestos no estructurales de la biomasa que puede causar interferencias en las demás determinaciones analíticas. Este procedimiento utiliza dos extracciones para remover materiales solubles en agua y en etanol. Los materiales solubles en agua incluyen material inorgánico (proveniente de suelos, o fertilizantes), azúcares no estructurales, material nitrogenado y otros. La fracción soluble en etanol incluye pigmentos (clorofila), ceras y otros componentes menores.

Preparación del aparato soxhlet para extracción

1. Secar los matraces balón en estufa al menos 12 horas a 105 °C. Sacar de la estufa y dejar enfriar a temperatura ambiente en el desecador. Posteriormente agregar las perlas de ebullición o las barras magnéticas, etiquetar los matraces balón y pesarlos.

2. Agregar de 3-10 gramos de la muestra en el cartucho de celulosa previamente tarado. La cantidad de muestra va a depender de la densidad aparente del sólido. La altura de la biomasa no debe exceder la altura del sifón, de lo contrario se producen extracciones incompletas. Marcar los cartuchos de celulosa con lápiz para su identificación.

3. Ensamblar el aparato de extracción. Insertar el cartucho en el tubo soxhlet.

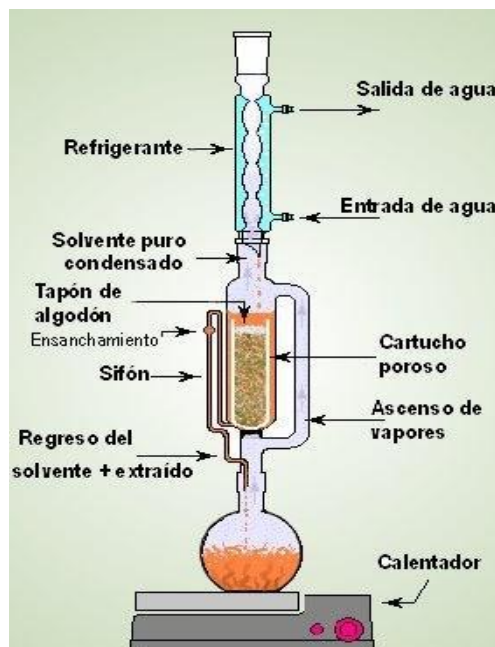


Figura 5. Esquema aparato soxhlet

Extractos solubles en agua

1. Añadir 190 mL de agua grado HPLC a un matraz balón previamente tarado. Colocar el matraz balón en el aparato soxhlet. Prender la parrilla de calentamiento y ajustar el calor para que ocurran 4-5 ciclos por hora (300-350°C y 100 rpm).

2. Reflujar por 6-24 horas, (preferentemente 20 horas). El tiempo de reflujo depende de la velocidad de extracción de los componentes de la muestra, de la temperatura de los condensadores, y del tiempo entre ciclo y ciclo de extracción.

3. Cuando ha finalizado la extracción, apagar la parrilla de calentamiento y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Extractos solubles en etanol

1. Agregar 190 mL de etanol puro a un matraz balón previamente tarado para la extracción con etanol. Colocar el mismo en el aparato soxhlet, ajustar el calor administrado por la parrilla de calentamiento para lograr 6-10 ciclos por hora (260°C y 100 rpm).
2. Reflujar 16- 24 horas. Preferentemente 24 horas.
3. Cuando el tiempo de reflujo ha finalizado, apagar la parrilla de calentamiento y dejar enfriar a temperatura ambiente.
4. Remover los cartuchos y extraer los sólidos a un filtro de celulosa en un embudo buchner. Lavar los sólidos con 100 mL de etanol absoluto. Permitir que se sequen por filtración a vacío o por aire seco.

Remoción del solvente de extracción

1. Transferir el contenido del matraz balón soxhlet a un matraz balón tarado del equipo de rotovapor para su extracción completa.
2. Rotovapor con baño a 60 °C y una presión de vacío de 72 nm para agua, la temperatura del condensador se fija en 5 °C. En el caso del etanol se fija el baño también a 60 °C.
3. Colocar el matraz balón de rotovapor en estufa a 45 °C por 24 horas. Enfriar en desecador a temperatura ambiente. Pesar.

2.4 Determinación de fibra

El análisis de fibra consta de dos partes principales, digestión ácida y neutra con soluciones detergentes, es por ello por lo que a la prueba se le conoce como análisis de fibra detergente.

Preparación de soluciones:

Solución neutro detergente: poner 450 mL de agua destilada en un vaso de precipitados y colocar agitador magnético, agitar en parrilla de calentamiento magnética. Agregar los reactivos: Lauril sulfato de sodio 30 g; ácido etilendiaminotetraacético 18.61 g; borato sodio decahidratado 6.81 g; fosfato dibásico de sodio 4.56 g. Calentar si es necesario para favorecer la dilución. Agregar 540 mL de agua con cuidado de no formar espuma. Cuando se haya agregado tres cuartos del agua, agregar el trietilenglicol 10 mL. Dejar en reposo una noche para permitir que la espuma desaparezca.

Solución ácida detergente: mezclar 1 L de ácido sulfúrico 1N con bromuro de hexadeciltrimetilamonio 20 g.

Preparación de la muestra

1. La materia prima se seca a 50-60 °C durante 3-4 h, hasta obtener la pérdida mínima del 85% de humedad. Se debe trabajar la muestra libre de extracto acuoso y etanólico.
2. Moler el material seco hasta que el tamaño de partícula sea menor a 1 mm.
3. Guardar en un recipiente de muestra etiquetado, que no permita que vuelva a adquirir humedad del ambiente.

Preparación de los crisoles gooch

1. Secar el crisol limpio en horno a 105 °C durante una noche, o hasta peso constante. Dejar enfriar en desecador.
2. Pesar en balanza analítica y registrar.
3. La limpieza de los crisoles sucios se realiza con mufla a 575 °C por 3-4 horas. Si la velocidad de filtración disminuye, entonces se procede a agregarle solución sulfocrómica durante una noche. Se enjuaga con agua bidestilada.

Determinación de fibra neutra detergente (FND)

1. Pesar de 0.45 a 0.55 g de muestra acondicionada (libre de extracto acuoso y etanólico) y pasar a vasos berzelius.
2. Agregar 0.5 g de sulfito de sodio a cada muestra.
3. Colocar 50 mL de solución neutro detergente a cada vaso.
4. Colocar en parrilla de calentamiento a 300 °C por 5 minutos. La muestra deberá refluarse, para ello, los vasos berzelius se tapan con cápsulas de porcelana con hielo que servirá para condensar los vapores.
5. Retirar de la parrilla de calentamiento y colocar 2 mL de solución de amilasa termoresistente 5 mL/100 mL Termamyl de la marca NOVOZYMES. Si se realiza la prueba con otra enzima diferente o con un lote nuevo, se debe realizar la medición de la actividad de amilasa.
6. Colocar nuevamente en parrilla de calentamiento a 250 °C y dejar refluarse por una hora. A los 7 minutos de calentamiento se deben lavar las paredes de los vasos con solución neutro detergente, utilizando el mismo volumen para cada vaso.
7. A los 30-40 minutos de iniciado el reflujo, calentar agua destilada a ebullición.
8. Cumplida la hora de reflujo se procede al filtrado de la muestra.
9. Se vierten 5-10 mL de agua hirviendo en los crisoles, a modo de precalentamiento y acondicionamiento de los mismos. Utilizar vacío para remover el agua de los crisoles. Cerrar llave de vacío.
10. Decantar el contenido de los vasos berzelius a los crisoles gooch previamente secos y tarados. Lavar los vasos con agua hirviendo para pasar todo el contenido del vaso al crisol. Filtrar agua con vacío y volver a cerrar la llave.
11. Agregar a la muestra en crisol, 30 mL de agua hirviendo y agregar 2 mL de solución de alfa amilasa. Dejar reaccionar durante 45-60 segundos y filtrar con vacío.

12. Verter 30-40 mL de agua hirviendo a cada crisol. Se deja reposar 2 minutos en remojo y se filtra con vacío. Repetir lavado una vez más.
13. Llenar crisol con 30-40 mL de acetona grado reactivo, dejar reposar 2 minutos y filtrar con vacío. Repetir lavado una vez más.
14. Filtrar muestra con vacío. Para remover la mayor parte del líquido, dejar cada muestra filtrando por 20-30 segundos con vacío.
15. Llevar los crisoles gooch a estufa a 105 °C durante la noche. Enfriar en desecador y pesar.

Determinación de fibra ácido detergente (FAD)

1. Pesar materia prima acondicionada 0.9-1.1 g y colocar en vasos berzelius.
2. Agregar 100 mL de solución ácida detergente, a temperatura ambiente. Colocar los vasos berzelius tapados con cápsulas con hielo (para que condensen los vapores) sobre una parrilla de calentamiento a 300 °C.
3. Calentar para que hiervan en 5-10 minutos. Reducir el calor en caso de excesivo espumeo.
4. Reflujar por 60 minutos desde que empieza a hervir. A los 30 minutos de hervor lavar las paredes de los vasos berzelius con solución ácida detergente.
5. Remover los vasos de la parrilla de calentamiento, mezclar con un leve movimiento circular y dejar decantar 30-60 segundos.
6. Precalentar los crisoles previamente tarados con agua en ebullición.
7. Decantar el contenido de los vasos berzelius en los crisoles gooch y filtrar al vacío. Pasar cuantitativamente el contenido con agua hirviendo.
8. Lavar con 30-40 mL de agua hirviendo, remojar durante 2 minutos y filtrar con vacío. Realizar el lavado dos veces.

9. Lavar con 30 mL de acetona, remojar por 2 minutos y filtrar al vacío. Repetir dos veces este lavado.
10. Secar los crisoles en horno a 105 °C durante toda la noche.
11. Colocarlos en desecador y pesar.

Determinación de lignina y cenizas

1. Los crisoles gooch que contienen los residuos de la determinación FAD se colocan sobre kitasatos y se le agrega la mitad de su volumen de ácido sulfúrico al 72%.
2. Mezclar con varilla de vidrio para humedecer todas las partículas. Se deja digerir por 3 horas.
3. Se coloca ácido sulfúrico cada hora. Al cumplirse el tiempo, se filtra por vacío y se lavan los residuos con agua caliente.
4. Secar en estufa a 105 °C toda una noche y pesar en caliente.
5. Llevar a mufla a 525 °C por 4 horas, posteriormente colocar en estufa a 105 °C toda la noche, y pesar en caliente. La lignina se calcula como la diferencia de peso entre el residuo digerido y seco; y el residuo calcinado.

2.5 Carbohidratos estructurales

Los carbohidratos y la lignina son componentes mayoritarios de las muestras de biomasa por lo tanto deben ser caracterizados exhaustivamente. Los carbohidratos pueden ser clasificados en estructurales y no estructurales. Los carbohidratos estructurales están unidos en la matriz de biomasa, perteneciendo y formando parte de la pared celular; mientras que los carbohidratos no estructurales pueden ser removidos por procesos de extracción o pasos de lavados y se secretan como metabolitos de la planta.

Esta técnica se realiza con muestras de biomasa libre de extractos acuosos y etanolicos; y consiste en dos hidrolisis para fraccionar la biomasa en formas solubles que pueden ser detectadas y cuantificadas más fácilmente (monómeros determinados por HPLC).

Preparación de la muestra

1. Pesar 300.0 ± 10.0 mg de muestra (mínimo por duplicado) y colocar en un tubo de presión.
2. Agregar 3.00 ± 0.01 mL de ácido sulfúrico al 72% a cada tubo de presión. Mezclar con varilla por un minuto o hasta que toda la muestra se haya humedecido. También puede utilizarse vortex.
3. Colocar el tubo de presión en un baño de agua a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e incubar por 60 ± 5 minutos. Mezclar cada 5-10 minutos con varilla sin remover el tubo del baño de agua.
4. Simultáneamente al hidrolizado, preparar estándares de recuperación, los cuales se utilizarán en concentraciones aproximadamente iguales a las esperadas. Estos estándares se utilizan para corregir los datos obtenidos en la cuantificación por HPLC, debido a que muchos azúcares en medios ácidos y con calor son degradados a otros compuestos.
5. Después de completar los 60 minutos de hidrolizado, remover los tubos del agua y diluir el ácido al 4% agregando 84 ± 0.04 mL de agua HPLC. Cerrar los tubos y mezclar por inversión varias veces o con vortex.
6. A los 10 mL de estándar de recuperación agregar 348 mL de ácido al 72%. Transferir este a un tubo de presión, o a un frasco de vidrio para realizar la hidrólisis en autoclave junto con las muestras.
7. Colocar los tubos en autoclave junto con el tubo de estándares de recuperación, por una hora a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando se completa el ciclo, sacar los tubos y dejar enfriar a temperatura ambiente antes de abrirlos, para evitar proyecciones y pérdida de muestra.

Analizar la muestra hidrolizada para determinar lignina insoluble

1. Filtrar al vacío las muestras autoclaveadas a través de los filtros gooch previamente preparados y pesados. Capturar el filtrado en kitsatos.
2. Transferir una alícuota de 50 mL en tubos de centrifuga, y guardar en congelación para determinar azúcares por HPLC y contenido de acetilo.
3. Utilizar agua desionizada para transferir cuantitativamente todo el contenido del tubo de presión a los filtros Gooch. Lavar los sólidos con 50 mL de agua destilada caliente.

4. Secar los filtros gooch con los residuos a 105 °C hasta peso constante.
5. Retirar los filtros de la estufa, colocarlos en desecador para enfriarlos y pesar.
6. Colocar los filtros en mufla a 575 °C por 24 horas.
7. Remover cuidadosamente los filtros gooch de la mufla con pinzas y colocar en desecador un tiempo igual al que se dejó inicialmente los filtros gooch limpios. Pesar los filtros con el residuo de cenizas.

Analizar la muestra para determinar los carbohidratos estructurales

1. Preparar una serie de estándares de calibración de los azúcares que quieren ser cuantificados.
2. Utilizar la alícuota congelada de la muestra hidrolizada, descongelar, mezclar por vortex y neutralizar con carbonato de calcio hasta un pH de 5-6 preferentemente, con un máximo de 9. Decantar la muestra, centrifugar a 4500 rpm por 3-5 minutos y tomar del sobrenadante una muestra para ser pasada por el HPLC previo filtrado por membranas de 0.2 mm. Las muestras pueden ser refrigeradas por 3-4 días.
3. Analizar muestras y estándares. Se utiliza una columna Aminex 87P a 80-85 °C, a un flujo de 0.6 mL/min.

Analizar las muestras para determinar acetato

1. Determinar el contenido de acetato en una columna Aminex 87H, con fase móvil de ácido sulfúrico 5mM filtrada y sonicada. Las condiciones de operación son de 60°C, 0.6 mL/min. La corrida es de 45 minutos.
 2. El rango de la curva de calibración recomendado es de 0.02-0.5 mg/mL.
- 2.6 Lignina Klason

La determinación de la lignina en los pastos por el método de FAD presenta el gran inconveniente de que disuelve hasta un 50% de su contenido, por lo cual en vista de que el valor determinado por FAD subestima el contenido real, se debe determinar el valor de la lignina por el método de Klason.

1. Pesar 1.0 ± 0.05 g de muestra preparada y colocar en un tubo de 20x150 mm. Cada muestra se debe correr por duplicado como mínimo.

2. Agregar 15 mL de ácido sulfúrico 72%, refrigerado a 4 °C. Mezclar con varilla de vidrio por un minuto, o hasta que la muestra este totalmente humedecida. Se puede utilizar vortex.
3. Hidrolizar la muestra por 2 horas a temperatura ambiente (20 °C aproximadamente), agitar cada 15 minutos para asegurar la mezcla homogénea.
4. Transferir el hidrolizado a un matraz erlenmeyer y diluir hasta el 3% de la concentración del ácido con 560 mL de agua destilada. Transferir cuantitativamente todo el contenido del tubo
5. Colocar el matraz en parrilla de calentamiento y reflujo. Calentar hasta ebullición y dejar ebullicir por 4 horas $\pm$ 5 minutos.
6. Al finalizar las cuatro horas lavar el condensador con una pequeña cantidad de agua destilada antes de desarmar el aparato.
7. Filtrar con vacío la solución hidrolizada a través de un filtro gooch previamente acondicionado (secado y tarado).
8. Utilizar agua caliente para pasar cuantitativamente el contenido del matraz erlenmeyer hacia el filtro gooch, y para lavar el residuo filtrado al vacío hasta eliminar todo el ácido.
9. Secar el filtro gooch y su contenido a 105 °C por dos horas o hasta peso constante.
10. Enfriar en desecador y pesar, tomar el peso correspondiente al filtro, las cenizas y la lignina ácido insoluble.
11. Colocar el filtro en mufla a 575 ± 25 °C por un mínimo de 3 horas o hasta que todo el carbono se haya combustionado.
12. Enfriar en desecador, y anotar el peso correspondiente al filtro gooch y las cenizas ácidas.

2.7 Hidrólisis

Proceso catalizado por enzimas denominadas celulasas, cuyo propósito es la degradación de la celulosa. El uso de pre-tratamientos, facilita el desarrollo de esta etapa. Cabe destacar que en la mayoría de procesos existe un primordial interés por los azúcares provenientes de la celulosa, sin embargo, la tendencia actual es el aprovechamiento integral de la biomasa, y en especial de otros azúcares como las pentosas, provenientes de la

hemicelulosa, conllevando al uso de enzimas que actúen sobre dichas sustancias como es el caso de las xilanasas y las xilasas.

- 1.- Utilizar muestra con extractos
 - 2.- Determinar la humedad de la muestra por triplicado.
 - 3.- Pesar 10% de sólidos en base seca de 250 mL
 - 4.- Añadir las enzimas Novozymes Cellic CTec2 y HTec2. De la primera se agrega el 5.4% (g de enzima/ g de celulosa); y de la segunda un 6% (g de enzima/ g de celulosa). Recomendado por Novozymes.
 - 5.- Completar 250 mL de volumen final restando la muestra y las enzimas.
 - 6.- Incubar a 28 °C con agitación de 150 rpm por 24 horas.
- * Nota: Se utiliza benzoato de sodio como conservador por ser más manejable que la azida de sodio.

2.8 Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso biológico en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares) para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono en forma de gas y unas moléculas de trifosfato de adenosina que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico.

Preparación de levadura

- 1.- Preparar 250 mL de medio YM y esterilizarlo.
- 2.- Inocular una muestra de levadura en el medio antes preparado.
- 3.- Colocar en la incubadora a 28 °C con 150 rpm; por 24 horas para permitir el crecimiento de la levadura.
- 4.- Separar el medio en tubos para centrifuga estériles de 50 mL.

5.- Centrifugar a 4500 rpm por 5 min a 4 °C para la separación del pellet de levadura. Una vez formado el pellet retirar el sobrenadante y concentrarlo en un mismo tubo.

6.- Tomar 100 µl de levadura y colocarlos en un micro tubo de centrifuga estéril. Añadir 900 µl de agua estéril. Agitar vigorosamente. (Dilución 100/1000)

7.- Con esta dilución repetir el proceso para obtener una dilución 10/100. Repetir una tercera vez para obtener la dilución 1/1000.

8.- Tomar un par de gotas de esta última dilución para realizar el conteo de levaduras. Colocar las gotas en una cámara de Neubauer. Contar 16 cuadros para obtener el promedio de crecimiento de la levadura.

* Nota: Con los grados brix se puede calcular la cantidad que se debe añadir a la fermentación.

Fermentación alcohólica

1.- Pasteurizar los matraces usados en la hidrólisis para eliminar el benzoato de sodio.

2.- Añadir la levadura previamente preparada y contada.

3.- Colocar el equipo de fermentación previamente esterilizado.

4.- Incubar por 48 horas a 28 °C.

5.- Tomar muestra a 0, 12, 24 y 48 horas.

2.9 Determinación de alfa amino nitrógeno (FAN)

Determinar el contenido de aminoácidos libres o péptidos pequeños (de dos a tres aminoácidos) mediante la reacción con ninhidrina. Este reactivo forma con los grupos aminos una sustancia color violeta, la cual se lee por espectroscopia uv-vis.

Preparación de Reactivos

1. Reactivo de ninhidrina

Mezclar 10 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, 6 g KH_2PO_4 , 0.5 g indiatitriona y 0.3 g de fructuosa. Esta mezcla se afora a 100 mL con agua y se ajusta el pH a 6.6-6.8. Se almacena en frasco ámbar a una temperatura de 5 °C. Permanece estable 2 semanas bajo estas condiciones.

2. Solución de dilución

Disolver 2 g de KIO_3 en 600 mL de agua destilada y agregar 400 mL de EtOH. Almacenar a 5 °C.

3. Solución patrón de glicina

107.2 mg de glicina aforar a 100 mL con agua destilada. Almacenar a 0 °C.

4. Solución de trabajo de glicina

Tomar 1 mL de solución patrón de glicina y aforar a 100 mL con agua destilada.

- 1.- Usar las muestras tomadas a diferentes horas de la fermentación.
- 2.- Tomar 2 mL de cada tubo y añadir 1 mL de solución de ninhidrina.
- 3.- Calentar los tubos por 16 min; posteriormente enfriarlos hasta 20 °C por 20 min.
- 4.- Añadir 5 mL de solución de trabajo.
- 5.- Preparar el blanco de la misma forma, pero sin agregar muestra.
- 6.- Colocar las muestras en celdas para espectrofotómetro.
- 7.- Medir absorbancia a 750 nm.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS

De los 6 tratamientos de extrusión que se probaron se determinó que el tratamiento 1 era el más propicio para trabajar debido a que era el que mostraba los resultados más prometedores de contenido de azúcares disponible para la fermentación. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos durante la caracterización lignocelulosica de la muestra elegida.

Tabla 2. Caracterización del bagazo de sorgo dulce a partir de la metodología empleada por Heredia-Olea et al. (2012) expresado en porcentajes.

Material	Componente	Porcentaje
Extractos	Extractos Solubles en Agua	13.3656 ± 0.297
	Extractos Solubles en Etanol	1.6771 ± 0.0448
Fibra	FND	95.6831 ± 1.8528
	FAD	60.2178 ± 0.2652
	Celulosa	49.1629 ± 1.0311
	Lignina	9.5743 ± 1.0591
	Hemicelulosa	35.4653 ± 1.5978
	Cenizas	1.4806 ± 1.5634
Lignina Klason	Insoluble	16.7771 ± 0.2210
	Soluble	0.5074 ± 0.0384
	Total	17.2845 ± 0.1826

En la Tabla 3 se muestran los azúcares presentes en la muestra después de ser sometida a una hidrólisis enzimática; durante la cual la celulosa, hemicelulosa y lignina fueron convertidos para así facilitar a la levadura el fermentarlos. En esta misma tabla se anexa la eficiencia con la cual se espera cuente cada azúcar para la fermentación.

Tabla 3. Cuantificación de Azúcares por HPLC fermentables obtenidos de la Hidrólisis Enzimática del tratamiento con las mejores condiciones de extrusión.

	Azúcares (mg/g)				
	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Arabinosa/Manosa
Hidrólisis	14.26±0.17	125.83±3.18	58.19±0.01	ND	1.85±0.10
Eficiencia de hidrólisis ¹	NA ²	39.35%	28.68%	ND	7.94%

¹La eficiencia de hidrólisis fue calculada como la cantidad de azúcares hidrolizadas por cada gramo de material en base seca entre la cantidad total del mismo azúcar multiplicada por 100.

²NA significa no aplicable, la cantidad de celobiosa fue adjuntada a la de glucosa multiplicada por el factor de conversión 1.05 para obtener la glucosa monomérica.

³Los azúcares que no fueron detectados por el cromatógrafo fueron reportados como ND.

Los contenidos de FAN durante la fermentación se muestran en la Tabla 4. Para una fermentación completa y rápida dichos niveles deben sobrepasar 150 mg/ L de no ser así se obtienen fermentaciones incompletas e indeseables.

Tabla 4. Cantidad de nitrógeno soluble (FAN) a través del tiempo durante la fermentación.

Tiempo (h)	FAN mg/L
0	184.875
24	153.125
48	135.75
72	117.75

En la figura 6 se muestra la forma en que la cantidad de cada azúcar desciende conforme el etanol se va generando. Cabe denotar que durante las primeras 24 horas no se pudo cuantificar el etanol producido debido a que se encontraba en una concentración aún muy pequeña para ser detectado por la columna empleada. Se puede apreciar también la presencia de ácido acético en cantidades muy mínimas; por lo tanto se puede presumir que es el resultado de los gases producidos durante la fermentación. Sin embargo, algunos autores afirman que la presencia de ácido acético ayuda a que la fermentación se lleve a cabo de forma continua y completa.

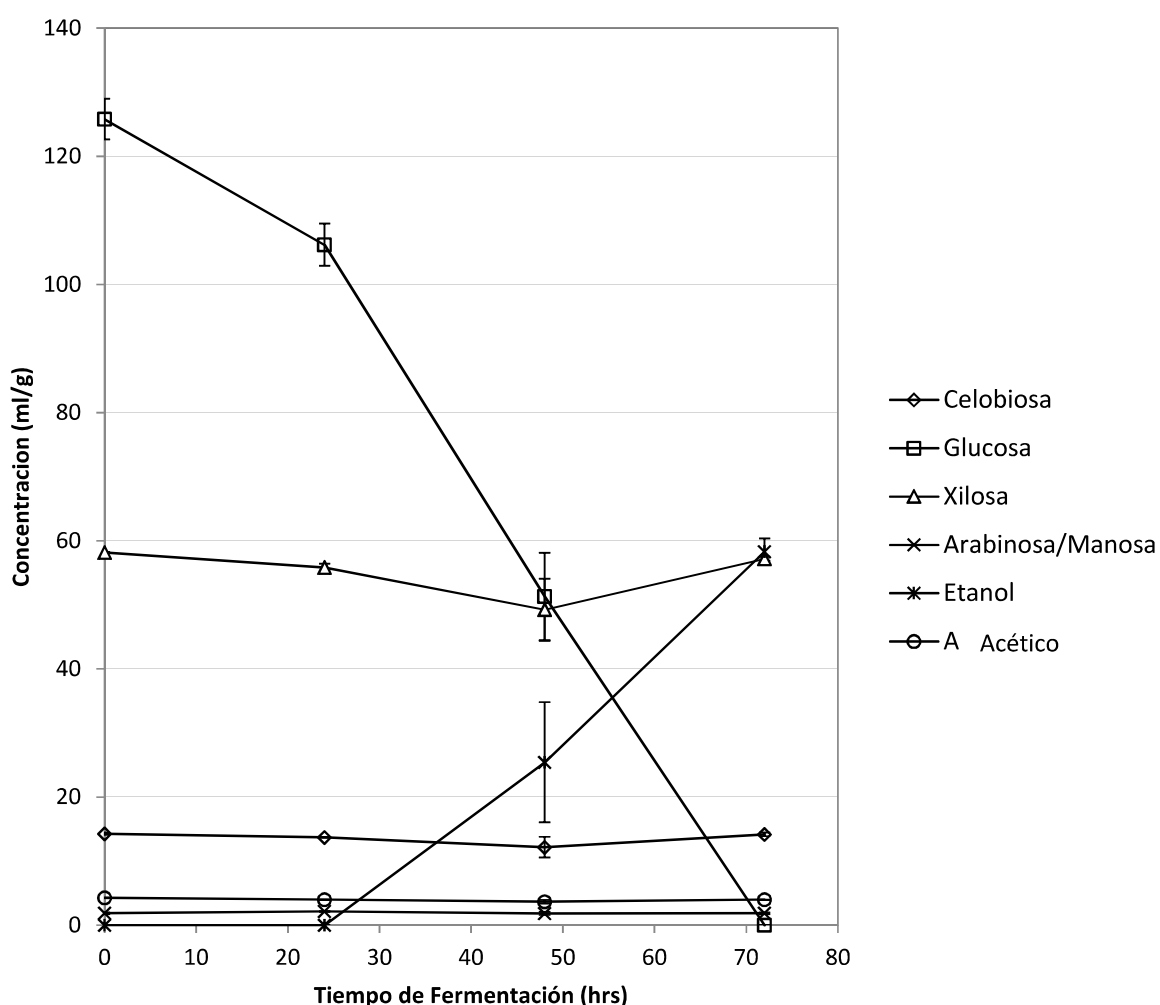


Figura 6. Concentraciones obtenidas durante la fermentación del bagazo de sorgo dulce extrudido e hidrolizado enzimáticamente.

Realizando una tabla comparativa de los resultados obtenidos con los que presenta la caña de azúcar (Tabla 5), que actualmente se presenta como una de las mejores materias primas del proceso.

Tabla 5. Comparativa entre composición de caña de azúcar y bagazo de sorgo dulce.

	Caña de azúcar	Bagazo de sorgo dulce
Glucanos	45.2	32.97 ± 2.23
Xilanos	23.6	18.08 ± 1.17
Arabinanos	2.1	2.09 ± 0.06
Lignina	21.3	16.77 ± 0.22
Extractos	3.9	15.05 ± 0.23
Cenizas	3.4	1.48 ± 1.56

Siguiendo la comparación con la caña de azúcar también se debe mencionar que a esta se le podría dar un uso dentro de la demanda de alimentación, mientras que el bagazo de sorgo dulce ya ha sido empleado para otros procesos y ahora es un residuo.

CONCLUSIONES

Después de realizar todo el proceso experimental se puede concluir que el bagazo de sorgo dulce constituye una buena materia prima para la obtención de etanol de segunda generación. La extrusión como pretratamiento térmico mejora la eficiencia de liberación de los azúcares, sin generar residuos difíciles de manejar y en un proceso continuo que permite tratar grandes cantidades de material lignocelulósico.

Las condiciones más propicias para implementar a la extrusión como pretratamiento efectivo será un alto valor de energía mecánica con temperaturas superiores a 100 °C, que generen un torque superior a 95 y arroje un producto con humedad alta.

Los pretratamientos ácidos generarán mejores rendimientos, pero es necesario evaluar el consumo de agua que requiere, los requerimientos energéticos, así como la generación de moléculas indeseables.

Actualmente ya existen plantas que utilizan este proceso, pero aún no se emplea para la obtención de cantidades industriales. Dentro de nuestro país este proceso únicamente se practica a escala laboratorio. Esto debido a que la obtención de combustibles se encuentra cubierta por un monopolio que impide que los biocombustibles sean tomados en cuenta para satisfacer la demanda.

RECOMENDACIONES

En base a los resultados se recomienda seguir realizando ensayos para determinar los límites de energía mecánica específica en los cuales se puede obtener la mayor eficiencia de azúcares hidrolizados enzimáticamente. Así mismo, se recomienda utilizar la misma tecnología en otras matrices vegetales para evaluar la eficiencia de hidrólisis con diferentes composiciones estructurales. Del mismo modo se pueden realizar más estudios con el dado dinámico para mejorar la eficiencia de hidrólisis de hemicelulosa. También se recomienda pretratar sorgo dulce sin el ataque de plagas, ya que es posible que la baja eficiencia de conversión de azúcares pueda haberse debido a los compuestos generados por el hongo que infestó a los tallos.

Una gran cantidad de azúcares C5 quedaron remanentes después de las fermentaciones. Se recomienda utilizar una cepa que pueda metabolizar estos azúcares para generar una mayor cantidad de etanol al final de la fermentación. Otra opción es considerar un co-cultivo en el cual dos levaduras puedan fermentar en su totalidad los azúcares si es que no se encuentra una cepa que pueda consumir hexosas y pentosas.

Por último, se puede recomendar el uso de un microorganismo que pueda aprovechar los azúcares remanentes de la fermentación para transformarlos en un analito de interés diferente al etanol. Una opción es la producción de xilitol utilizando bacterias, el cual puede ser purificado y utilizado como un edulcorante.

REFERENCIAS

- Bansal P, Hall M, Realff MJ, Lee JH, Bommarius AS: Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnol Adv* 2009, 27: 833-848. 10.1016/j.biotechadv.2009.06.005
- Camire M.E. (2001). Extrusion and Nutritional Quality. En: *Extrusion Cooking: Technologies and Applications*. Editado por: R. Guy. CRC Press. Cambridge, Inglaterra. PP 108-130
- Chen Y., Ye R., Yin L., Zhang N., (2014). Novel Blasting Extrusion Processing Improved the Physicochemical Properties of Soluble Dietary Fiber from Soybean Residue and *In vivo* Evaluation. *J. Food Eng.* 120:1-8
- Escribano G., 2006. Seguridad Energética: Conceptos, Escenarios e Implicaciones para España y la UE. Documento de Trabajo (DT) 33/2006. Real Instituto Elcano de Estudios Internacionales y Estratégicos.
- Guy R., (2001) Introduction. En: *Extrusion Cooking: Technologies and Applications*. Editado por: R. Guy. CRC Press. Cambridge, Inglaterra. PP 1-3
- Häkkinen M., Valkonen M.J., Westerholm-Parvinen A., Aro N., Arvas M., Vitikainen M., Penttilä M., Saloheimo M., Pakula T.M., 2014. Screening of Candidate Regulators for Cellulase and Hemicellulase Production in *Trichoderma reesei* and Identification of a Factor Essential for Cellulase Production. *Biotechn. for Biofuels* 7:14
- Henrissat B: Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose* 1994, 1: 169-196. 10.1007/BF00813506
- Himmel M.E, Ding, SY, Johnson, DK, Adney, WS, NimLos, MR, Brady, JW, Foust, TD: Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*. 2007, 315: 804-807. 10.1126/science.1137016
- Jafari Y., Amiri H., Kamiri K. (2016). Acetone Pretreatment for Improvement of Acetone, Butanol and Ethanol Production from Sweet Sorghum Bagasse. *Appl. Ener.* 168:216-225
- Jorgensen H., Kristensen J.B., Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuel Bioprod Bioresour.* 2007, 1: 119-134. 10.1002/bbb.4
- Kamm B, Kamm M: Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004, 64: 137-145. 10.1007/s00253-003-1537-7
- Kumar R, Wyman CE: Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol Prog* 2009, 25: 302-314. 10.1002/btpr.102View
- Kurian J.K., Minu A.K., Banerji A., Kishore V.V.N. Bioconversion of hemicellulose hydrolysate of sweet sorghum bagasse to ethanol by using *Pichia stipitis* NCIM 3497 and *Debaryomyces hansenii* sp. *Bioresources*, 2010, 5(4): 2404-2416.
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS: Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, 66: 506-739. 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002

- Marx S., Ndaba B., Chiyanzu I., Scharbort C. 2014. Fuel Ethanol Production from Sweet Sorghum Bagasse using Microwave Irradiation. *Biomass and Bioener.* 65:145-150
- Matsakas L., Christakopoulos P. 2013. Fermentation of Liquefacted Hydrothermally Pretreated Sweet Sorghum Bagasse to Ethanol at High-Solids Content. *Biores. Techn.* 127:202-208
- Mościcki L., Wójtowicz A. 2011. Extrusion-Cooking in Waste Management and Paper Pulp Processing. En: *Extrusion-Cooking Techniques: Applications, Theory and Sustainability*. Editado por: L. Mościcki. Editorial Wiley-VCH, Weinheim, Alemania. PP 159-166
- Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzaple M, Ladisch M: Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 2005, 96: 673-686. 10.1016/j.biortech.2004.06.025
- Mottaz J., Bruyas L. (2001). Optimised Thermal Performance in Extrusion. En: *Extrusion Cooking: Technologies and Applications*. Editado por: R. Guy. CRC Press. Cambrige, Inglaterra. PP 51-82
- Nava-Berumen C.A., Rosales-Serna R., Jiménez-Ocampo R., Carrete-Carreón F.O., Domínguez-Martínez P.A., Murrillo-Ortiz M. 2017. Rendimiento y Valor Nutricional de Tres Variedades de Sorgo Dulce Cultivadas en Cuatro Ambientes de Durango. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 8(2):147-155
- Potencial para la Producción de Biocombustibles Líquidos en Durango, México. *Rev. Mex. C. Agric.* 1:45-54
- Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J. Jr, Hallett J.P., Leak D.J., Liotta C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*. 2006, 311: 484-489. 10.1126/science.1114736
- Reveles-Saucedo F.O., Rosales-Serna, R., Nava-Berúmen C.A., Delgado-Licón E., Cuéllar-Robles I., Carrete-Carreón F.O., Ríos-Saucedo J.C. (2014) Identificación de Especies Vegetales con
- Riaz M.N. 2001. Selecting the Right Extruder. . En: *Extrusion Cooking: Technologies and Applications*. Editado por: R. Guy. CRC Press. Cambrige, Inglaterra. PP 29-50
- Rodrigues A.C. (17 de Julio de 2015). ELSEVIER. Recuperado el 7 de Octubre de 2016, de ELSEVIER: www.elsevier.com/locate/emt
- Song Q., Winter W.T., Bujanovic B.M, Amidon T. Nanofibrillated Cellulose (NFC): A High-Value Co-Product that Improves the Economics of Cellulosic Ethanol Production. *Energies*. 2014 7:607-618.
- Varela-Almanza K.M., Corona-González R.I., Arriola-Guevara E., Guatemala-Morales G.M., Pelayo-Ortiz C. 2014. Obtención de Azúcares Fermentables por Hidrólisis de Bagazo de *Agave tequilana* Weber. *Memorias del XXXV Encuentro Nacional de la AMIDIQ*. 1086-1091
- Williams-Alanís E., Zavala-García F., Arcos-Cavazos G., Rodríguez-Vaquez M.delC., Olivares-Sáenz E. 2017. Características Agronómicas Asociadas a la Producción de Bioetanol en Genotipos de Sorgo Dulce. *Agron. Mesoam*. 28(3):549-563

Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol.* 2005, 96: 1959-1966. 10.1016/j.biortech.2005.01.010

Yang B, Wyman CE: Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuel Bioprod Bioresour* 2008, 2: 26-40. 10.1002/bbb.49

Yan Z., Li J., Li S., Chang S., Cui T., Jiang Y., Cong G., Yu M., Zhang L. 2015. Impact of Lignin Removal on the Enzymatic Hydrolysis of Fermented Sweet Sorghum Bagasse. *Appl. Ener.* 160:641-647

Yan X., Ye R., Chen Y., (2015 a). Blasting Extrusion Processing: The Increase of Soluble Dietary Fiber Content and Extraction of Soluble-Fiber Polysaccharides from Wheat Bran. *Food Chem.* 180:106-115

Zhang J., Ma X., Yu J., Zhang X., Tan, T. 2011. The Effects of Four Different Pretreatments on Enzymatic Hydrolysis of Sweet Sorghum Bagasse. *Biores. Techn.* 102:4585-4589

Zhang Y.H.P, Lynd LR: Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng* 2004, 88: 797-824. 10.1002/bit.20282