

Catálisis heterogénea de biomasa lignocelulósica para obtener Bioetanol

Rafael Torres Robles¹, Estefanía Aguirre Álvarez¹ y Roberto García de León²

Universidad Politécnica de Pachuca (UPP)¹, Instituto Mexicano del Petróleo-Gerencia de Refinación²
Zempoala, Hgo.; Mex.¹
rafaeltorres@upp.edu.mx

Abstract— The bases and characterization of the lignocellulosic biomass (inulin) used are given. This material is subject to a hydrolysis with various catalysts: ion exchange resin with function of benzoic acid, titanium oxide-phase anatase and activated alumina. The catalyst selected is that which produces the most sugar from which an alcoholic fermentation is made to obtain bioethanol using *saccharomyces cerevisiae* as a biocatalyst. The catalyst that gave the syrup with the highest content of reducing sugars was the resin. With this syrup the bio-conversion to ethanol was performed. Results of alcoholic fermentation and microorganism / substrate yield are given.

Keywords: *Ethanol, lignocellulosic biomass, inulin, acid hydrolysis, catalysts*

Resumen— Se dan las bases y la caracterización de biomasa lignocelulósica (inulina) utilizada, ésta se somete a una hidrólisis con diversos catalizadores: resina de intercambio iónico con función de ácido benzoico, óxido de titano-fase anatasa y alúmina activada. Se selecciona el catalizador que produce la mayor cantidad de azúcares, a partir del cual se lleva a cabo una fermentación alcohólica para obtener bioetanol empleando *saccharomyces cerevisiae* como biocatalizador. El catalizador que dio el jarabe con mayor contenido de azúcares reductores fue la resina. Con éste jarabe se realizó la bio-conversión a etanol. Se dan resultados de la fermentación alcohólica y del rendimiento de microorganismo/sustrato.

Palabras clave: *Etanol, biomasa lignocelulósica, inulina, hidrólisis ácida, catalizadores*

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la humanidad necesita disminuir los niveles de contaminación del medio ambiente que ha causado el calentamiento global y el efecto invernadero. El consumo de combustibles fósiles, entre ellos el petróleo, el carbón y el gas natural, dan lugar a emisiones de dióxido de carbono que contribuyen al calentamiento gradual del planeta. La importancia del desarrollo de biocombustible a nivel mundial surge a partir de varias necesidades, principalmente energéticas, ambientales y sociales. En este ámbito, la sustitución de combustibles basados en petróleo por biocombustibles aumentará la seguridad energética, disminuirá la dependencia frente a la volatilidad de los precios del petróleo; además de minimizar los costos de importaciones de combustibles. (Linayem, 2012).

Los países dependientes de los hidrocarburos, necesitan plantear una visión amplia de sus fuentes de abastecimiento, de regulación y liberación de los mercados energéticos, de apoyo a energías renovables y a la investigación de fuentes alternativas; la búsqueda de energías sustitutivas como son los biocombustibles también es una de ellas.

En el aspecto ambiental, la hipótesis es que el uso de los biocombustibles reducirán la emisión de gases de efecto invernadero, pues el uso de bioetanol como combustible no genera una emisión neta de CO₂ sobre el ambiente; el CO₂ producido en los motores durante la combustión y durante el proceso de obtención de bioetanol, es nuevamente fijado por la biomasa mediante el proceso de fotosíntesis. Además no contiene azufre, uno de los principales causantes de la lluvia ácida. El desarrollo de otros combustibles beneficiará a la sociedad mediante el desarrollo agrícola, contribuyendo a mejorar los ingresos de los agricultores a través de la creación de diversas fuentes de empleo (Bolhman, 2005).

El sector transporte se encuentra fuertemente relacionado con los combustibles fósiles y se considera que el 60 por ciento del consumo de crudo está destinado a este sector. Las emisiones procedentes de éste sector, suponen un 70 por ciento de las emisiones globales de monóxido de carbono y un 19 por ciento de las emisiones globales de dióxido de carbono (CIECO, 2008 y SEMARNAT, 2012).

Por las razones mencionadas, de un tiempo acá se está impulsando el estudio de la producción de bioetanol de segunda generación, el cual es producido a partir de biomasa lignocelulósica residual, la cual está compuesta por dos polímeros de carbohidratos: la celulosa (35- 50 por ciento) y la hemilcelulosa (15-25 por ciento), y un polímero fenólico, la lignina (20-25 por ciento) (Demirbas, 2007, Demirbas, 2008).

En esta investigación la biomasa utilizada para la elaboración de bioetanol es la inulina, la cual es uno de los fructanos más estudiados. Es un polímero con una cadena integrada de moléculas de fructosa conocida como fibra soluble. Su importancia radica en que es utilizada como alimento funcional en la elaboración de yogurt y helados. La producción de etanol combustible a partir de material lignocelulósico se ha convertido en una alternativa interesante en la utilización de este tipo de residuos que podrían abrir nuevos mercados para su revalorización. Para utilizar la inulina como material lignocelulósico que contenga la mayor cantidad de azúcares reductores se realizaron algunos pretratamientos. Estos pretratamientos son físicos, químicos y biológicos: reducción de tamaño, remoción de lignina y la hidrólisis ácida. Posterior a estos tratamientos, la inulina ya es sometida a una fermentación y a una destilación (Taherzadeh y Karini, 2008).

II. DESARROLLOS EXPERIMENTALES

A. Caracterización de la Biomasa Lignocelulósica

La Inulina fue proporcionada por el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP)-Gerencia de Refinación.

Se realizó una digestión ácida de la inulina; determinando contenido de azúcares totales y reductores, Lignina total (lignina tanto soluble (LSA) como insoluble en ácido (LIA)) y cuantificación de azúcares (fructosa, glucosa) mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Se determinaron humedad, biomasa seca y porcentaje de cenizas de inulina.

El contenido total de azúcares y lignina de la inulina se determinó utilizando la técnica especificada en el Manual de técnicas analíticas para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos establecido por el laboratorio analítico del IMP.

Realizando una hidrólisis ácida se determinaron la concentración de LSA, azúcares reductores (DNS), azúcares Totales (fenol-sulfúrico) y el perfil de carbohidratos mediante HPLC.

La humedad y los sólidos totales en la inulina se determinaron en una termo-balanza a 105 °C. Por otro lado, la LSA y LIA se determinaron en un espectrofotómetro UV-visible. La lignina total presente en la muestra de la inulina se determina simplemente sumando la LSA y la LIA (Manual de Fundamentos y Técnicas de Análisis de Alimentos, 2007)

Los azúcares reductores se determinaron empleando el Método Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Manual de Fundamentos y Técnicas de Análisis de Alimentos, 2007)). Los azúcares totales se determinaron utilizando el método fenol sulfúrico. La identificación de los azúcares se realizó empleando también HPLC.

B. Catálisis Heterogénea

La hidrólisis de inulina se realizó por catálisis heterogénea utilizando tres catalizadores diferentes:

- 1.- Resina de intercambio iónico con función de ácido sulfónico (DOWEX HCR-W2),
- 2.- Óxido de Titanio TiO₂ fase anatasa
- 3.- Alúmina activada

La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor tipo por lotes semi-automatizado (Ver Figura 1) a diversas condiciones, en el que se coloca la cantidad de 400 mg de inulina y 200 mg de catalizador, en un volumen de agua destilada de 25 ml, agitándose a 150 rpm. La hidrólisis se realizó a cinco diferentes temperaturas: 110, 100, 80, 60 y 40°C.

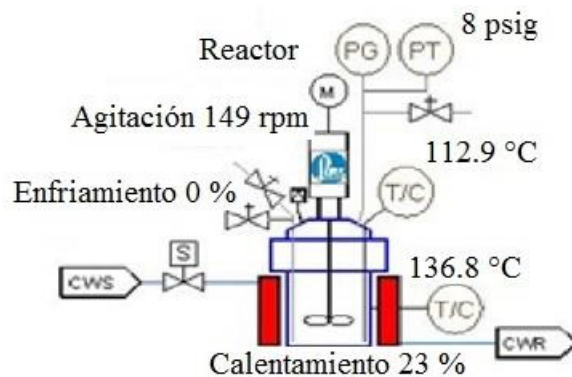


Fig. 1. Esquema del reactor tipo Parr, operado por lotes.

Al término de la reacción, el reactor se enfría a temperatura ambiente para condensar el medio reaccionante y disminuir la presión; posteriormente, cada una de las muestras obtenidas del reactor (a sus diversas condiciones) fueron filtradas al vacío, obteniendo un volumen final filtrado y así se realizaron los análisis correspondientes de cualificación y cuantificación de azúcares presentes de la biomasa lignocelulósica (jarabe). Se realizó una curva patrón de fenol-sulfúrico; de cada una de las reacciones y se determinó el porcentaje de azúcares totales (AT) utilizando el Método de fenol- sulfúrico. También se realizó una curva patrón DNS; de esta manera se determinó el porcentaje de azúcares reductores (AR). Se realizó un análisis HPLC, para rectificar los métodos anteriores, con un blanco que no contenía catalizador alguno.

C. Fermentación

Para la producción de bioetanol a partir de inulina, la fermentación se realiza con levadura: *saccharomyces cerevisiae*, utilizando el líquido rico en azúcares proveniente de la sacarificación como sustrato. Se busca con ello convertir los azúcares extraídos del jarabe de inulina en etanol. Para ello se prepara un medio de producción y un medio de cultivo (pre inóculo). El medio de producción es básicamente el jarabe proveniente de la hidrólisis de inulina que dio mejores resultados, en cuanto a la cantidad de azúcares; en este medio se utiliza la resina de intercambio iónico con función de ácido sulfónico. El medio de cultivo es una solución con varios compuestos que se necesitan para el crecimiento de la levadura. Se prepararon 80 ml de pre-inóculo con la composición descrita en la Tabla 1. El medio de cultivo se realiza en un matraz de 40 ml (por duplicado), se ajustan ambos matraces a pH 5 y se esterilizan en un autoclave a 121 ° C, durante 15 min. Posteriormente, se inoculan los medios con la levadura y se incuban en un baño de agua a 30 ° C y 150 rpm durante 12.5 horas.

Tabla I. Composición del medio de cultivo de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*.

Especie	Concentración, mg/l
Glucosa	10
Extracto de levadura	0.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.16
KH ₂ PO ₄	2

El volumen de 40 mililitros (ml) de jarabe proveniente de la hidrólisis se colocó en un matraz de 40 ml, se le adicionó extracto de levadura en concentración de 2 g/l y 100.7 g de glucosa. Ambos medios de producción se ajustaron a pH de 5 y se esterizaron en una autoclave a 121 °C durante 15 min.

Después de 12.5 horas de incubación de los medios de cultivo, se centrifugó el contenido de ambos y el líquido se vertió en los dos medios de producción, un inóculo en cada medio de producción. Ambos matraces se mantuvieron en un baño de agua a 30 °C y 150 rpm durante 120 horas (5 días). Se tomó 1 ml de muestra cada cierto tiempo y se le determinaron el contenido de azúcares reductores y de etanol en cada uno de los medios de producción.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Caracterización de la Inulina

Los porcentajes de cenizas, humedad y biomasa seca en la inulina aparecen en la Tabla 2.

Tabla II. Cenizas en la biomasa de la digestión ácida, humedad y biomasa seca de inulina

Porcentaje de Humedad	Porcentaje de Biomasa seca	Porcentaje de Cenizas
4.74	95.26	0.097

La biomasa, es un material con capacidad de absorber humedad del medio que la rodea por lo que contiene grandes y variantes cantidades de humedad. Los resultados de análisis químicos practicados a los residuos lignocelulósicos se reportan típicamente en base seca. Así, es necesario determinar la cantidad de sólidos remanentes después de secar la biomasa.

El contenido de sólidos totales en la biomasa es la cantidad de sólidos remanentes después de que toda la materia volátil ha sido removida por calentamiento de la muestra a 105 °C hasta alcanzar peso constante. De manera inversa, la humedad contenida es una medida de la cantidad de agua (y otros compuestos volátiles a 105 °C) presentes en dicha muestra.

B. Digestión Ácida

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de inulina, a partir de la digestión ácida; esta digestión es un tratamiento que se realizó para determinar diferentes características de la biomasa; la digestión ácida se basa en la descomposición de la inulina, permitiendo que los reactivos ácidos y la temperatura elevada corten los enlaces, liberando la lignina soluble e insoluble y el residuo presente en la muestra, dando como resultado jarabe de inulina de la digestión ácida que contiene sacáridos. El porcentaje en peso de residuo insoluble en ácido (RIA), el de lignina insoluble en ácido (LIA) y el porcentaje de lignina soluble en ácido (LSA) pueden observarse en la Tabla 3.

Tabla III. Porcentaje de RIA, LIA, LSA presentes en el jarabe de la hidrólisis ácida

Porcentaje de RIA	Porcentaje de LIA	Porcentaje de LSA
4.03 ± 0.05	3.00 ± 0.05	9.87 ± 0.05

La cuantificación de lignina presente en la biomasa se determina indirectamente con el peso del residuo sólido remanente después de la hidrólisis completa de los polisacáridos presentes en la inulina. El material insoluble se forma por condensación de la lignina original en condiciones fuertemente ácidas, utilizadas en la hidrólisis, mientras en el hidrolizado líquido se solubiliza una pequeña porción de lignina (lignano), la cual se determina midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS. La lignina total está representada por la lignina soluble y la insoluble en ácido (Lu and John, 2010) y esta tiene un valor de 12.88 ± 0.05 . El valor de la lignina total presente en la muestra de inulina se determina adicionando a la cantidad de lignina soluble en ácido (LSA) la lignina insoluble en ácido (LIA).

Finalizando el procedimiento de la digestión ácida se filtra el jarabe y así se obtiene un líquido color amarillo oscuro, al cual posteriormente se le determinaron azúcares totales y reductores y al mismo tiempo se le practicó un análisis HPLC; los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla IV. Porcentaje de azúcares totales presentes en el jarabe de inulina de la digestión ácida

Abs (nm)	Concentración (mg/ml)	Concentración Real (mg/ml)	Volumen filtrado (ml)	Masa (mg) en el volumen filtrado	Concentración (mg/mgl)	Porcentaje de Azúcares totales
0.518	0.043	0.717	49.5	35.5	0.124	12.42

Para determinar el porcentaje de azúcares totales se utilizó el método fenol- sulfúrico (Dubois et al., 1956). Este método se basa en que los azúcares se deshidratan con el ácido sulfúrico concentrado, formando furfural, que están presentes en el jarabe de inulina, dando origen a la formación de compuestos de coloración amarillosa, cuya intensidad de color es medida en un espectrofotómetro a 490nm y es proporcional a la concentración de azúcares totales presentes en el jarabe de inulina.

De acuerdo a los resultados obtenidos se obtuvo un porcentaje de azúcares totales de 12.42 por ciento, en la parte de caracterización de inulina, utilizando el jarabe de inulina a una dilución de: 60 µl jarabe de digestión ácida Inulina / 940 µl H₂O (Ver Tabla 4).

Los azúcares reductores presentes en el jarabe de inulina, tras la digestión ácida, se determinan aplicando el método DNS, que se tiene como referencia para calcular dicho porcentaje; los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla V. Azúcares reductores presentes en el jarabe de inulina

Abs (nm)	Concentración (mg/ml)	Concentración Real (mg/ml)	Volumen filtrado (ml)	Masa (mg) Volumen Filtrado	Concentración (mg/mg) y porcentaje de azúcares reductores
0.225	0.329	0.548	49.5	27.13	0.095 y 9.49

Al comparar los resultados obtenidos de la digestión ácida, caracterizando la inulina con porcentaje de RIA, porcentaje de LIA, porcentaje de LSA, y los porcentajes de azúcares totales y reductores con los obtenidos por cromatografía de líquidos (HPLC) se observa que estos coinciden, dentro de un margen de

error. Se observa también que respecto al tiempo y áreas arrojadas por el cromatógrafo, en referencia a las áreas de las curvas patrón realizadas con diversos azúcares, estos también son coincidentes (Ver Tabla 6).

El lavado consiste en pesar 1 g de inulina diluido en 10 ml de agua destilada, se agita y se filtra, anotando el volumen filtrado. Se le realiza la determinación de azúcares totales (método Fenol-sulfúrico) y azúcares reductores (método DNS) y la determinación de azúcares mediante HPLC. Los resultados para azúcares totales (AT) aparecen en la Tabla 6 y los de azúcares reductores (AR) en la Tabla 7.

Tabla VI. Porcentaje de azúcares en el jarabe de inulina empleando HPLC

Prueba	Tiempo, min	Área	Relación	Concentración mg/ml	Masa mg	Concentración mg/ml	Porcentaje de Azúcares Reductores
1	5.708	279.3	0.149	0.152	7.59	0.026	2.65
2	7.591	2076.0	1.106	0.384	19.22	0.067	6.72
4 Alanina	12.585	1876.5	-	-	-	-	9.37

Tabla VII. Porcentaje de AT, en jarabe de inulina por lavado

Abs. nm	Concentración a Dilución Real, mg/ml	Concentración Real, mg/ml	Volumen de filtrado, ml	Biomasa en el volumen de filtrado, mg	Porcentaje de Azúcares totales
0.521	0.036	72.18	9.5	685.7	64.78

El análisis HPLC que se practicó al lavado de inulina demuestra que esta biomasa está compuesta de fructosa y glucosa.

La comparación de los resultados entre los azúcares presentes en el jarabe de inulina de la digestión ácida y el lavado se muestra en la Tabla 8; en ella se observa que en la digestión ácida los porcentajes de azúcares totales y reductores son menores al del lavado, donde se presentó una mayor cantidad de estos; lo anterior es debido a que la hidrólisis ácida es un tratamiento muy agresivo que propicia la desintegración de los componentes de la inulina, dando como resultado una menor cantidad de azúcares; mientras que el lavado del producto de la hidrólisis permite la liberación de mayor cantidad de azúcares.

Tabla VIII. Porcentaje de AT y AR en digestión ácida y en lavado de inulina (Desv. Estándar = +/- 0.05)

Porcentaje de	Digestión Ácida	Lavado
AT	12.42	64.78
AR	9.49	6.49
HPLC-AR	9.37	6.23

A continuación se presentan los resultados de la catálisis heterogénea para los diferentes catalizadores empleados: Para la resina de intercambio iónico con función de ácido sulfónico se muestran en la Figura 2, para el dióxido de titanio fase anatasa en la Figura 3 y para la alúmina activada en la Figura 4. La catálisis heterogénea utilizando como catalizador alúmina activada, también fue realizada en el reactor tipo Parr, ya mencionado.

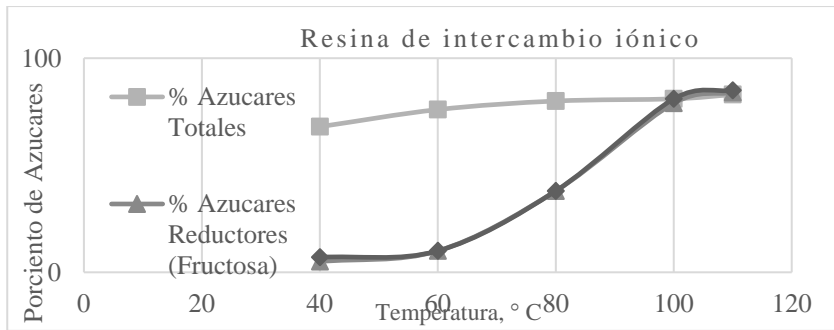


Fig. 2. Porcentaje de AT y AR en jarabe de inulina respecto al incremento de temperatura

Los resultados del porcentaje de azúcares totales y reductores en jarabe de inulina utilizando como catalizador la alúmina se muestran en la Figura 4; en ésta misma figura se puede observar que variando la temperatura hay una reacción positiva hacia el porcentaje de azúcares que es de 80.

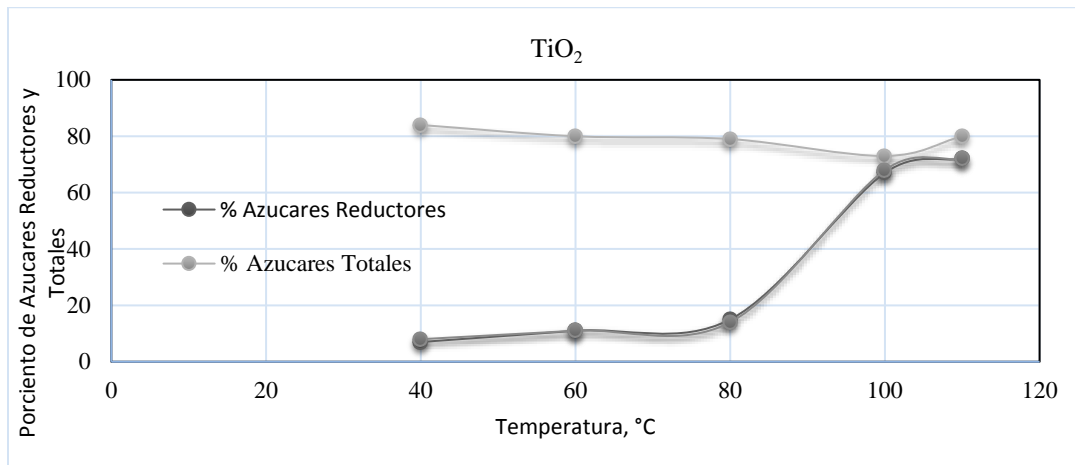


Fig. 3. Porcentaje de AT y AR respecto al aumento de temperatura con catalizador TiO₂

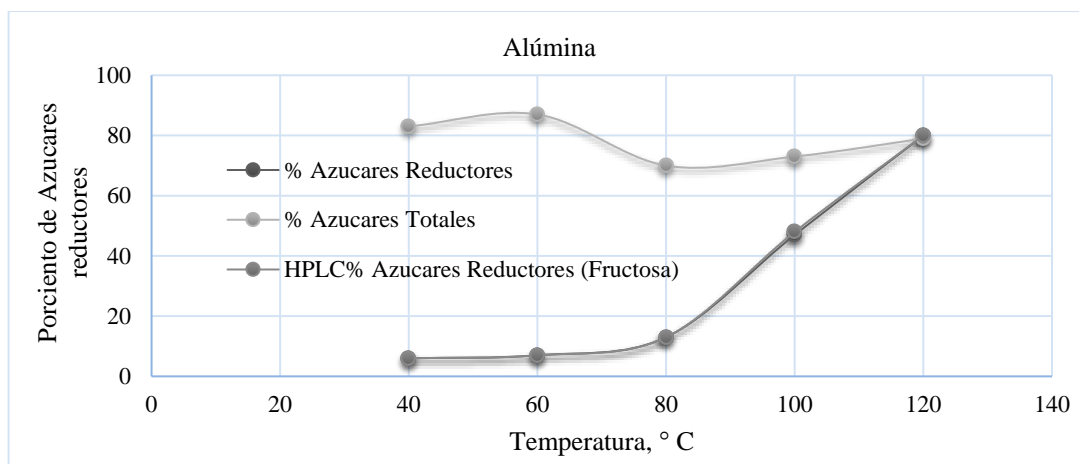


Fig. 4. Porcentaje de AT y AR respecto al incremento de temperatura, con alúmina

La Tabla 9 muestra los resultados de HPLC para el porcentaje de azúcares reductores, practicado a la inulina, la cantidad de éste compuesto es la suma de las cantidades de fructosa y glucosa a 110 o C.

La Tabla 10 muestra los porcentajes de azúcares totales y azúcares reductores, determinados por HPLC a temperaturas que van desde 40 hasta 110 o C. Los azúcares reductores fueron también determinados por el método de Fenol-Sulfúrico; las discrepancias observadas fueron solo a la temperatura de 100 o C y están dentro del error experimental.

Tabla IX. Porcentaje de azúcares reductores, mediante HPLC

110 ° C	Tiempo, min	Área	Porcentaje de Azúcares reductores
Fructosa	7.55	3106	84.98
Alanina	13.93	1688	

Al utilizar la resina de intercambio iónico, en la catálisis heterogénea, se obtiene un alto porcentaje de azúcares reductores: fructosa 85 por ciento, lo cual demuestra ser un tratamiento efectivo en el jarabe de inulina, por el efecto del aumento de temperatura; ello resulta muy eficiente en la hidrólisis de inulina. El método para la despolimerización de lignina, intenta romper por hidrólisis (y en presencia de un catalizador ácido y/o básico en la mayoría de los casos) los principales enlaces C-O presentes en la lignina.

Tabla X. Porcentaje de AT y AR presentes en el jarabe de inulina, a diferentes temperaturas (°C)

Condiciones	T, ° C	Porcentaje de Azúcares reductores	Porcentaje de Azúcares totales	Porcentaje de Azúcares totales-Vía HPLC
Tiempo, 2 h	110	85	83	84
Inulina, 400 mg	100	81	81	79
Catalizador, 200 mg	80	38	80	38
Agua, 25 ml	60	10	76	10
	40	7	68	5

Sazanov y col. (2012) han estudiado ampliamente diversos parámetros que influyen en el proceso de hidrólisis de lignina, entre ellos: las transformaciones termoquímicas de la lignina, determinando la estabilidad térmica de los diferentes enlaces que presenta la lignina (intramoleculares e intermoleculares); la solubilidad de la lignina en el sistema de reacción es otro factor que influye en el rendimiento de este proceso; así, han sido estudiados diversos parámetros reológicos para diferentes mezclas de lignina determinando los efectos en la solubilidad y finalmente se ha realizado un estudio sobre los cambios morfológicos experimentados por la lignina durante el proceso de hidrólisis (Lu and John, 2010), Sazanov et al. 2012; Sazanov et al. 2011).

Tabla XI. Porcentaje de azúcares, mediante HPLC-Catalizador T₂O₂

Compuesto	Tiempo, min	Área	Concentración mg/ml	Masa, mg	Concentración, mg/mg	Porcentaje de Azúcares Reductores
Fructosa	6.208	279.3	0.151	7.6	0.026	2.65
Glucosa	7.591	2076	0.384	19.2	0.067	6.71
Alanina	12.585	1876.5				9.37

Tabla XII. Porcentaje de AT y AR en jarabe de inulina. Catalizador: TiO₂ a diferentes temperaturas

Condiciones	T ° C	Porcentaje de AR	Porcentaje de AT	HPLC Porcentaje de azúcares (Fructosa y Glucosa)
Tiempo: 2 h Agua: 25 ml Inulina: 400 mg Catalizador: 200 mg	110	77	80	72
	100	67	73	68
	80	15	79	14
	60	11	80	11
	40	7	84	8

De acuerdo al resultado por HPLC, se encuentra que la inulina está conformada por fructosa en mayor porcentaje y glucosa en muy poca concentración. Los resultados obtenidos en la catálisis heterogénea realizada en el reactor Parr, para el dióxido de titanio fase anatasa, se muestran en las Tablas 11 y 12. La Tabla 12 también muestra que los resultados obtenidos en la catálisis heterogénea con catalizador de dióxido de titanio en fase anatasa, que se observa una gran cantidad de azúcares totales y reductores, desde una temperatura de 40 hasta 110 ° C, con un mayor porcentaje de AR: 72 por ciento en la temperatura más elevada.

Una de las metodologías más utilizadas para la hidrólisis y despolimerización de lignina es el tratamiento en presencia de bases y catalizadores básicos. Como resultado de la despolimerización catalizada por bases, se obtiene una mezcla compleja de compuestos (variedad de pesos moleculares), que requiere ser separada de manera eficiente para que el proceso de despolimerización sea mejor aprovechado. Se ha reportado un estudio detallado con procedimientos para separar los principales monómeros generados durante este proceso, mediante la combinación de técnicas como, extracción líquido-líquido, destilación, cromatografía y cristalización (Vigneault et al., 2007).

Para comparar los resultados obtenidos con los tres catalizadores, se realizó una prueba en blanco en el reactor. Los resultados de esta prueba se muestran en las Tablas 13, 14 y 15 y en la Figura 5.

Tabla XIII. Porcentaje de azúcares totales y reductores en jarabe de inulina sin catalizador

Temperatura, ° C	DNA	FENOL	HPLC
	Porcentaje de Azúcares Reductores	Porcentaje de Azúcares Totales	Porcentaje de AR
120	57	84	58
110	46	82	44

Tabla XIV. Porcentaje de AR a 110 o C por HPLC, sin usar catalizador

110 ° C	Tiempo (min)	Área	Porcentaje de AR	Porcentaje de Azúcares Reductores
Fructuosa	6.389	2892	37.9	44.8
Glucosa	7.89	440	6.9	
Alanina	10.987	1571	-	

Tabla XV. Porcentaje de AR a 120 o C por HPLC, sin usar catalizador

110 ° C	Tiempo (min)	Área	Porcentaje de AR	Porcentaje de Azucares Reductores
Fructuosa	6.389	2892	37.9	44.8
Glucosa	7.89	440	6.9	
Alanina	10.987	1571	-	

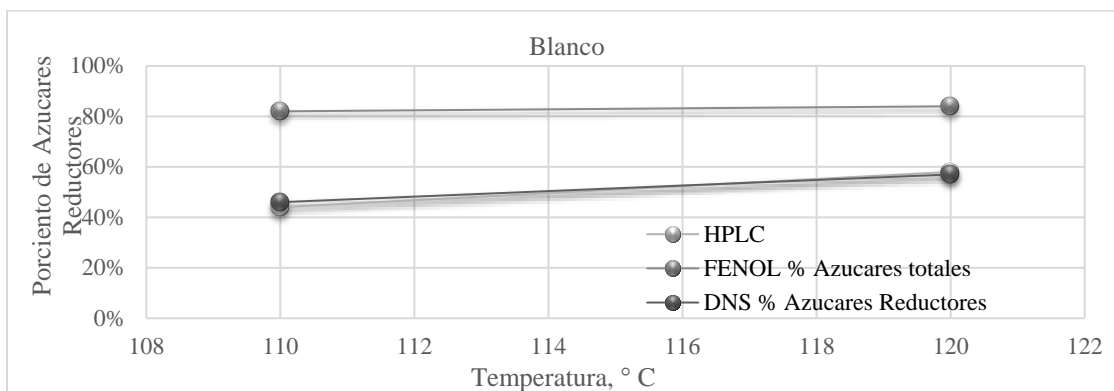


Fig. 5. AT vs AR (Porcentaje) a diferentes temperaturas sin utilizar catalizador

Las velocidades de algunas reacciones químicas se ven modificadas por la presencia de alguna sustancia que permanece inalterada al final del proceso. Dependiendo de las condiciones del tratamiento como lo son: temperatura, presión, tiempo y movimiento del reactor, la biomasa y la presencia de catalizadores ácidos, la naturaleza y la concentración de sus compuestos, se puede favorecer la producción de azucares aunque en menor concentración. La comparación entre los tres catalizadores empleados se muestra en la Figura 6.

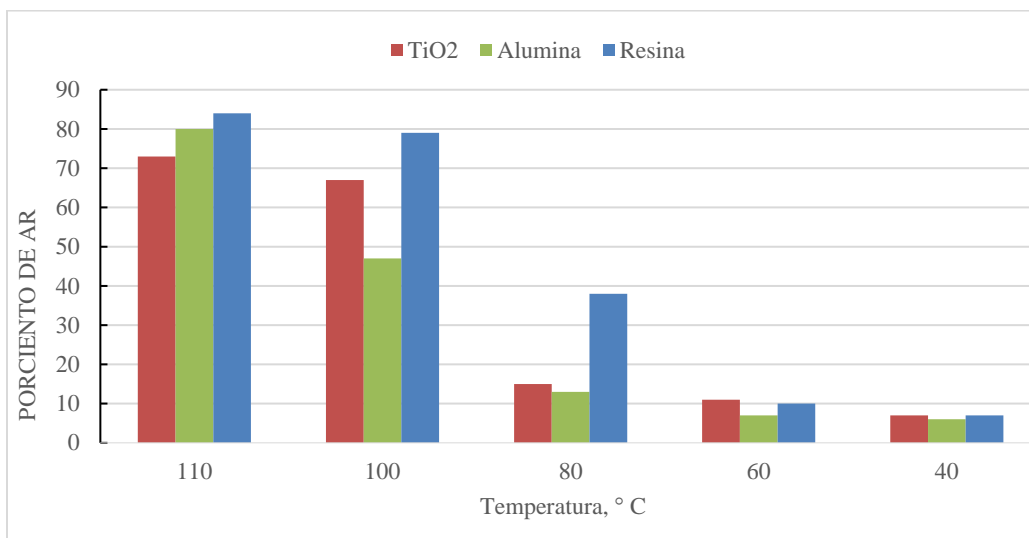


Fig. 6. Hidrolisis de Inulina de los tres catalizadores

Al comparar resultados, con respecto a la cantidad de azúcares formados, la resina de intercambio iónico con función de ácido sulfónico a 110 ° C alcanza la mayor cantidad de estos azúcares, expresándose en forma de fructosa.

Resultados de la Fermentación Alcohólica

La fermentación alcohólica se llevó a cabo utilizando el catalizador: resina intercambio iónico, con función de ácido sulfónico, por duplicado (pruebas I y II). El crecimiento de biomasa se muestra en las Tablas 16 a la 18.

Tabla XVI. Crecimiento de biomasa en fermentación, con jarabe de inulina de mayor porcentaje de AR

Crecimiento de Biomasa (mg/ml)			
Hora muestreo	Experimento	I	II
	Tiempo, h	mg/ml	mg/ml
08:00 am	0	0	0
01:00 pm	5	0.174	0.324
03:00 pm	7	1.073	1.026
05:00 pm	9	1.477	1.560
07:00 pm	11	3.267	3.197
08:00 am	22	4.961	5.031
10:30 am	24.5	6.432	6.798
12:30 pm	26.5	6.934	7.444

Tabla XVII. Consumo de AR por *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación del jarabe de inulina

Concentración de Azúcares reductores		
Experimento	I	II
Tiempo, h	mg/ml	mg/ml
0	19.89	18.83
5	19.09	19.11
7	17.64	18.67
9	17.34	16.01
11	13.65	8.44
22	0.49	0.43
24.5	0.33	0.29
26.5	0.23	0.24

Tabla XVIII. Consumo de AT por *S. cerevisiae* durante la fermentación del jarabe de inulina

Consumo de Azúcares Totales	Experimento I	Experimento II
Tiempo, h	mg/ml	mg/ml
0	20.17	18.29
5	15.47	18.27
7	14.72	17.28
9	14.42	14.22
11	9.49	7.17
22	1.37	1.11
24.5	1.01	0.87
26.5	0.82	0.82

La Figura 7 muestra que la concentración de etanol alcanza un máximo, a un tiempo de 22 horas de reacción, de aproximadamente 6 mg/ml; ello se puede deber a: 1. Se ha terminado el sustrato (jarabe de inulina), que contiene los azucres o 2. La actividad de la *Saccharomyces cerevisiae* se ve disminuida.

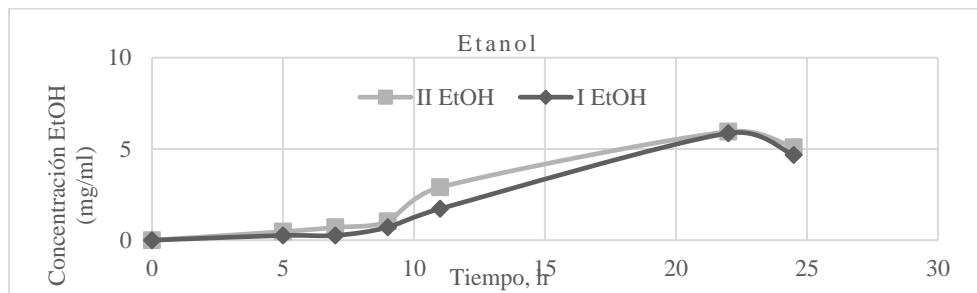


Fig. 7. Concentración de etanol (mg/ml) respecto al tiempo de fermentación

La Figura 8 muestra los resultados finales del proceso de fermentación alcohólica. La inulina bajo catálisis heterogénea presentó gran cantidad de azucres totales y reductores, el crecimiento de biomasa fue exponencial. Se obtuvo etanol a un concentración inicial de 0.261 mg/ml y 0.472 mg/ml (I) y concentración final de 4.67 mg/ml y 5.09 mg/ml (II), al realizar la prueba por duplicado (muestras I y II). Con un rendimiento de etanol/sustrato=0.305 (I) y seguido del duplicado con un rendimiento de EtOH/sustrato=0.309 (II), lo cual muestra una reproducibilidad satisfactoria en las pruebas experimentales realizadas. Al terminar la fermentación, se observa que hay una disminución en la concentración de etanol después de que alcanza un máximo a las 26.5 horas de bioreacción. Esto pudo deberse a: i) El microorganismo productor del etanol consumió la fuente de carbón, o sea el jarabe de inulina y así ya no es posible producir más bioetanol y ii) La actividad del microorganismo terminó, es decir tuvo cada una de sus etapas desde latencia en el medio de cultivo rico en azucres, la etapa exponencial, la adaptación y finalmente la muerte, por lo que ya no hubo microorganismo que siguiera con el proceso de producción de bioetanol.

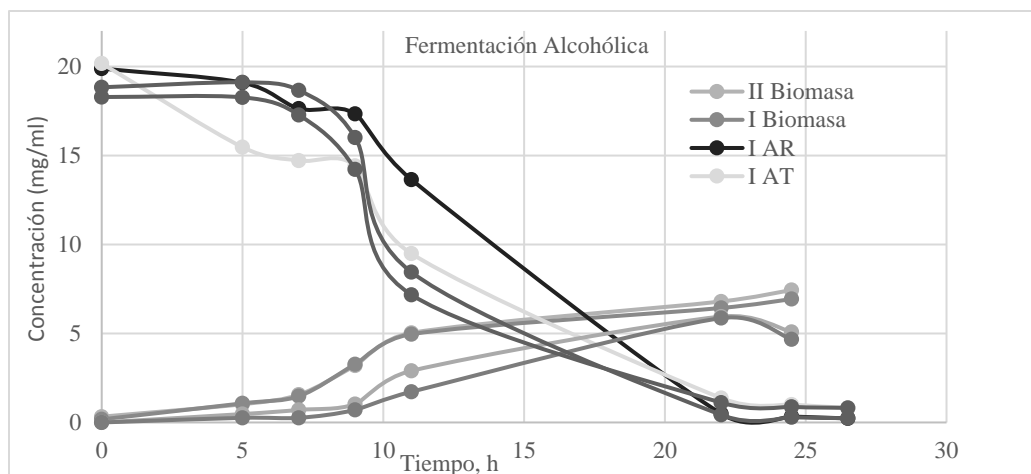


Fig. 8. Resultados finales para la producción de bioetanol

IV. CONCLUSIONES

La inulina es un compuesto que se encuentra de manera natural en muchas especies vegetales, está conformada por cadenas lineales de fructosa y pueden tener o no una unidad terminal de glucosa; tiene aplicaciones en la industria química: materiales bioactivos, farmacéutica, de procesamiento y alimentación (como fibra funcional). A través de esta investigación se evidenció su aplicación en la industria de biocombustibles, con una alta concentración de azúcares susceptibles a la fermentación alcohólica y con un tratamiento previo de hidrólisis con el uso de catalizadores, cumpliéndose con ello el objetivo trazado y comprueba que la hipótesis realizada es cierta.

La función que se perseguía de encontrar un catalizador que obtuviera las mejores cantidades de azúcares fermentables se cumplió. Se formó la cantidad suficiente de jarabe para la producción del producto bioetanol.

La metodología implantada fue validada y demuestra ser una técnica rápida y eficiente en la catálisis heterogénea para determinar el mejor tratamiento para la fermentación de azúcares en la inulina.

La catálisis heterogénea a condiciones de temperatura elevada es un tratamiento positivo para la obtención de mayor porcentaje de azúcares reductores.

Mediante los métodos analíticos DNS, fenol-sulfúrico y HPLC Se determinó cualitativa y cuantitativamente la composición de la inulina mostrando que está compuesta de dos azúcares, principalmente: fructosa y glucosa. Lo anterior se observa con diversos catalizadores a diversas temperaturas, las cuales fluctúan entre 70 y 120 ° C.

El mejor tratamiento para la hidrólisis de inulina se presenta cuando la mayor cantidad de azúcares reductores es obtenida; esto sucede con un porcentaje de 85 por ciento, a una temperatura de 120 ° C, cuando ellos son susceptibles a la fermentación y producción de etanol carburante y cuando el catalizador es la resina de intercambio iónico.

Teniendo en cuenta la necesidad de la sociedad actual por disminuir su dependencia de los combustibles fósiles y de reducir, en la medida de lo posible, las emisiones de gases contaminantes que provocan el efecto invernadero, la producción de biocombustibles a partir de la inulina es una alternativa técnica viable para disminuir con los problemas ambientales que perjudican al ambiente.

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido vislumbrar un posible esquema de bioproceso para la producción de bioetanol a partir de fuentes de carbono económicas; se recomienda continuar con el desarrollo biotecnológico del bioproceso, realizando los estudios económicos pertinentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Bohlmann GM. (2006). Process economic considerations for production of ethanol from biomass feedstocks. *Ind Biotechnol*, 2:14–20.
- CIECO (2008). Análisis integrado de las tecnologías, el ciclo de vida y la sustentabilidad de las opciones y escenarios para el aprovechamiento de la bioenergía en México. Centro de Investigaciones en Ecosistemas.
- Demirbas A. (2007). Producing and using bioethanol as an automotive fuel. *Energy Source B*. 2:391–401.
- Demirbas A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Convers Manage* 49:2106–16.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28:3, 350-356

- Linayem A, Ricke. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Process in energy and combustion. Science.* (38)
- Lu, F. & John, R. (2010). Lignin. In S. Run-Cang, *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biochemical and Biofuels* (First ed., pp. 169-207). Amsterdam: Elsevier B.V
- Manual de Fundamentos y Técnicas de Análisis de Alimentos (2007). <https://www.scribd.com/doc/42854211/>
- Resina de intercambio iónico DOWEX, Agosto (2005). URL [<http://www.lenntech.es/productos/Dowex-Resins/Dowex-HCR-W2/Dowex-HCR-W2/index.html>]
- Sazanov, Y.N., Popova, E.N., Sumerskii, I.V., Mokeev, M.V., Kulikova, E.M., Litvinova, L.S., (2012). Thermochemical transformations of hydrolysis lignin. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 83 (9), 1607-1614.
- Sazanov, Y.N., Krutov, S.M., Griбанov, A.V., Spirina, T.N., Kulikova, E.M., Fedorova, G.N, (2011). Problems of solubility of hydrolysis lignin. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 84 (7), 1238-1245.
- SEMARNAT (2012). Programa Nacional para la Prevención y Gestión Integral de Residuos (PNPGIR) 2009-2012.
- Taherzadeh MJ, Karimi K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int J Mol Sci*; 9:1621–51.
- Vigneault, A., Johnson, D.K. & Chornet, E. (2007). Base-catalyzed depolymerization of lignin: Separation of monomers. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 85, 906-916.