

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

Potencial uso del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*) para obtener  
etanol

Presentado por:

Luzbel Zela Ventura

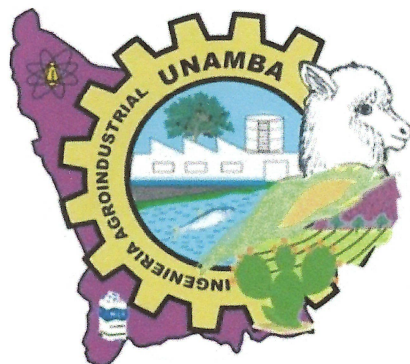
Para optar el Título de Ingeniero Agroindustrial

Abancay, Perú

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

**POTENCIAL USO DEL MATERIAL LIGNOCELULOSICO DE TAYANCA (*Baccharis microphylla*) PARA OBTENER ETANOL**

Presentado por **Luzbel Zela Ventura**, para optar el Título de:  
**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

Sustentado y aprobado el 14 de junio del 2022, ante el jurado evaluador:

**Presidente:**

PhD. Fulgencio Vilcanqui Pérez

**Primer Miembro:**

Ing. Jorge Beltrán Mendoza Cáceres

**Segundo Miembro:**

Mag. Gladys Marilú Castro Pérez

**Asesor (es):**

Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz

PhD. Lizardo Visitación Figueroa

## **Agradecimiento**

*Agradezco a Dios por haber forjado mi camino y haberme dirigido por el sendero correcto, por bendecirme con salud y por haberme otorgado una familia maravillosa, quienes han creído en mí siempre, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio; de igual manera agradezco a la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac por haberme acogido durante mi formación profesional y haberme transmitido sus conocimientos mediante cada docente que hizo parte de este proceso integral de formación.*

*Agradezco a la Universidad Nacional Agraria La Molina y los docentes del departamento de Química por haberme brindado asesoría y así poder realizar este trabajo de investigación, de la misma manera agradezco al Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz principal colaborador de todo este proceso, y a los miembros del jurado por brindarme su tiempo y sus conocimientos.*

**Luzbel Zela Ventura**



## **Dedicatoria**

*Dedico este trabajo de investigación a mi familia, en especial a mi madre, a quien le debo toda mi vida, quien me apoyo incondicionalmente inculcándome valores, hábitos y buenos sentimientos, y a la memoria de mi padre quien me guía desde donde este.*

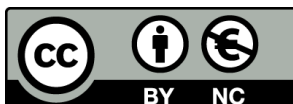
*Luzbel Zela Ventura*



“Potencial uso del material lignocelulosico de tayanca (*Baccharis microphylla*) para obtener etanol”

Línea de investigación: Caracterización, desarrollo de procesos e innovación en la Agroindustria

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>CAPÍTULO I</b> .....	4
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	4
1.1 Descripción del problema .....	4
1.2 Enunciado del Problema .....	5
1.2.1 Problema general .....	5
1.2.2 Problemas específicos .....	5
1.2.3 Justificación de la investigación .....	6
<b>CAPÍTULO II</b> .....	7
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	7
2.1 Objetivos de la investigación .....	7
2.2.1 Objetivo general .....	7
2.2.2 Objetivos específicos .....	7
2.2 Hipótesis de la investigación .....	7
2.2.3 Hipótesis general .....	7
2.2.4 Hipótesis específicas .....	7
2.3 Operacionalización de variables .....	8
<b>CAPÍTULO III</b> .....	9
<b>MARCO TEÓRICO REFERENCIAL</b> .....	9
3.1 Antecedentes .....	9
3.2 Marco teórico .....	12
3.2.1 Tayanca ( <i>Baccharis microphylla</i> ) .....	12
3.2.1.1 Clasificación taxonómica de la tayanca .....	12
3.2.1.2 Descripción Botánica .....	12
3.2.1.3 Usos .....	13
3.2.2 Biocombustible .....	13
3.2.3 Fuentes de obtención de etanol .....	14
3.2.3.1 Biomasa Lignocelulósica .....	15
3.2.4 Composición de materiales lignocelulósicos .....	17
3.2.5 Proceso de obtención de etanol .....	19
3.2.6 Transformación de lignocelulosa a biocombustible .....	20
3.2.7 Pretratamiento .....	20
3.2.7.1 Pretratamientos físicos .....	21
3.2.7.2 Hidrólisis a presión o autohidrólisis .....	21

3.2.7.3	Pretratamientos químicos .....	22
3.2.7.4	Tratamientos fisicoquímicos.....	22
3.2.7.5	pretratamiento biológico.....	24
3.2.8	Hidrólisis química y enzimática.....	24
3.2.9	Microorganismos productores de celulosa.....	25
3.2.10	Actividad enzimática: celulasas .....	26
3.2.11	Bioetanol lignocelulósico.....	27
3.3	Marco conceptual.....	27
<b>CAPÍTULO IV.....</b>		<b>29</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>		<b>29</b>
4.1	Tipo y nivel de investigación.....	29
4.2	Diseño de investigación .....	29
4.3	Población y muestra.....	29
4.4	Procedimiento .....	30
4.5	Técnica e instrumentos .....	34
4.6	Análisis estadístico .....	35
<b>CAPÍTULO V .....</b>		<b>37</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>		<b>37</b>
5.1	Análisis de resultados .....	37
5.1.1	Caracterización del material lignocelulosico de tayanca.....	37
5.1.2	Pretratamiento.....	38
5.1.3	Hidrólisis enzimática (formación de azúcares reductores).....	39
5.1.4	Influencia de la relación enzima sustrato y tiempo de hidrólisis en la producción de azúcares reductores.....	40
5.1.5	Porcentaje de hidrolisis del material lignocelulósico de tayanca .....	42
<b>CAPÍTULO VI.....</b>		<b>45</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>		<b>45</b>
6.1	Conclusiones .....	45
6.2	Recomendaciones .....	45
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>46</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>58</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> — Variable descriptivo.....	8
<b>Tabla 2</b> — Descripción de las variables .....	8
<b>Tabla 3</b> — Clasificación taxonómica de la tayanca ( <i>Baccharis microphylla</i> ).....	12
<b>Tabla 4</b> — Clasificación de biocombustibles por generación .....	14
<b>Tabla 5</b> — Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas comunes y basuras .....	19
<b>Tabla 6</b> — Ejemplos de pretratamiento para materiales lignocelulósicos.....	21
<b>Tabla 7</b> — Presenta diversos estudios para la obtención de etanol a partir de diversos materiales lignocelulósicos .....	27
<b>Tabla 8</b> — Técnicas analíticas para la caracterización del material lignoceluloso de tayanca ( <i>Baccharis microphylla</i> ) .....	31
<b>Tabla 9</b> — Diseño factorial 3x 3 para la hidrólisis enzimática de tayanca .....	36
<b>Tabla 10</b> — Caracterización del material lignocelulósico de tayanca.....	37
<b>Tabla 11</b> — Caracterización del material lignocelulósico de tayanca pretratado .....	38
<b>Tabla 12</b> — Producción de azúcares reductores.....	40
<b>Tabla 13</b> — Caracterización del material lignocelulósico de tayanca sometida a hidrólisis enzimática.....	42
<b>Tabla 14</b> — Porcentaje de hidrólisis del material lignocelulósico de tayanca con relación enzima:sustrato 1/50 (p/v) .....	43
<b>Tabla 15</b> — Materiales, equipo y reactivo.....	59
<b>Tabla 16</b> — Materiales, equipo y reactivos .....	59
<b>Tabla 17</b> — Materiales, equipo y reactivos .....	60
<b>Tabla 18</b> — Materiales, equipo y reactivos .....	62
<b>Tabla 19</b> — Materiales, equipo y reactivos .....	63
<b>Tabla 20</b> — Materiales, equipo y reactivos .....	64
<b>Tabla 21</b> — Materiales, equipo y reactivos .....	66
<b>Tabla 22</b> — Relación enzima sustrato (E/S) 1:10 p/v sobre la hidrólisis enzimática del material lignoceluloso de tayanca.....	69





<b>Tabla 23</b> — Relación enzima sustrato (E/S) 1:50 p/v sobre la hidrolisis enzimática del material lignocelulosico de tayanca.....	70
<b>Tabla 24</b> — Relación enzima sustrato (E/S) 1:200 p/v sobre la hidrolisis enzimática del material lignocelulosico de tayanca.....	71
<b>Tabla 25</b> — Azucares reductores del hidrolizado del material lignocelulosico de tayanca ....	74
<b>Tabla 26</b> — Análisis de la varianza.....	76
<b>Tabla 27</b> — Tabla de Análisis de varianza.....	76
<b>Tabla 28</b> — Prueba Tukey para la relación E/S .....	76
<b>Tabla 29</b> — Prueba Tukey para el tiempo .....	77
<b>Tabla 30</b> — Tukey para la relación enzima sustrato vs tiempo.....	78



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> — Estructura general de la biomasa lignocelulosica .....	15
<b>Figura 2</b> — Esquema de las etapas de obtención de etanol.....	19
<b>Figura 3</b> — Cambio estructural del material lignocelulósico luego de un pretratamiento...20	
<b>Figura 4</b> — Mecanismo de acción enzimática para transformar celulosa a glucosa.....	26
<b>Figura 5</b> — Diagrama de flujo para obtener etanol a partir de tayanca ( <i>Baccharis microphylla</i> ) .....	30
<b>Figura 6</b> — Tayanca molida .....	31
<b>Figura 7</b> — Curva de calibración de azúcares reductores .....	33
<b>Figura 8</b> — Formación de azúcares reductores en función al tiempo .....	39
<b>Figura 9</b> — Intervalo de azucars reductores vs relación Enzima/Sustrato .....	41
<b>Figura 10</b> — Intervalos de azucars reductores vs tiempo.....	41
<b>Figura 11</b> — Proceso de secado y molienda de la muestra .....	59
<b>Figura 12</b> — Determinación del peso de la muestra seca .....	60
<b>Figura 13</b> — Determinación de cenizas .....	61
<b>Figura 14</b> — Determinación de extractos.....	63
<b>Figura 15</b> — Determinación de celulosa .....	65
<b>Figura 16</b> — Determinación de holocelulosa.....	67
<b>Figura 17</b> — Explosión de vapor .....	68
<b>Figura 18</b> — Muestra de tayanca después del pretratamiento.....	68
<b>Figura 19</b> — Fase líquida tras la hidrólisis.....	69
<b>Figura 20</b> — Fase sólida tras la hidrólisis .....	69
<b>Figura 21</b> — Relación enzima sustrato (E/S p/v) sobre la hidrolisis enzimática del material lignocelulosico de tayanca.....	70
<b>Figura 22</b> — Relación enzima sustrato (E/S p/v) sobre la hidrolisis enzimática del material lignocelulosico de tayanca.....	71
<b>Figura 23</b> — Relación enzima sustrato (E/S) sobre la hidrolisis enzimática del material lignocelulosico de tayanca.....	72
<b>Figura 24</b> — Fibra del material lignocelulósico de tayanca después de la hidrólisis.....	72

<b>Figura 25</b> — Curva de calibración de azúcares reductores .....	73
<b>Figura 26</b> — Relación E/S sobre la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico de tayanca .....	74
<b>Figura 27</b> — Gráfico de Enzima/Sustrato vs % Azúcares reductores.....	77
<b>Figura 28</b> — Gráfico de tiempo vs % Azúcares reductores .....	78



## INTRODUCCIÓN

Actualmente el consumo mundial de combustibles fósiles ha ido incrementando, y como consecuencia a ello se han generado problemas fundamentales como el deterioro del medio ambiente y el agotamiento de estos recursos no renovables, lo que nos obliga a buscar fuentes alternativas como el uso de biocombustibles, tal es el caso de bioetanol (Arellano, 2015).

Debido a ello ha surgido la necesidad de velar por la integridad del medio ambiente, preservar los recursos no renovables y maximizar el potencial uso de productos agrícolas que en gran parte pertenecen a biomasa lignocelulósica rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa entre 75-80 %, los cuales, pese a su difícil degradación, es posible mediante procesos químicos, físicos y/o biológicos desdoblarlos en azúcares monosacáridos para su posterior conversión a etanol (Sanchez *et al*, 2010).

El material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, aunque, el principal obstáculo para su uso es la falta de una tecnología asequible para la obtención de celulosa y su posterior conversión en bioetanol. El uso de biocombustibles ayuda a disminuir de forma considerable la acumulación de gases de efecto invernadero y evita el uso de combustibles contaminantes (Lynd *et al*, 2017)

Una forma de obtener bioetanol es mediante la fermentación de azúcares solubles provenientes de materiales vegetales ricos en azúcar, mediante el uso de levaduras y/o bacterias. El alcohol de segunda generación (llamado así por la fermentación de azúcares obtenidos a partir de biomasa vegetal) ha sido considerado como un remplazo al uso de recursos fósiles, además se puede elaborar de manera continua y renovable.

Una opción atractiva es la obtención a partir de materiales lignocelulósicos, siendo su mayor ventaja no competir directamente al consumo humano y animal lo que permite explotar grandes cantidades de biomasa. La gran biodiversidad vegetal que posee nuestro país puede ser empleada para la obtención de la materia prima además de impulsar un progreso económico y tecnológico. Bajo esta premisa, se propone estudiar el potencial uso del material lignocelulósico de tayanca sometido a hidrólisis enzimática para obtener etanol.



## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial uso del material lignoceluloso de tayanca (*Baccharis microphylla*) con la intención de obtener etanol mediante la hidrólisis enzimática. Se trabajó en tres etapas. En la primera etapa se tomó una muestra representativa del material lignoceluloso de Tayanca y se caracterizó la materia prima, en cuanto al contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, a través de las técnicas TAPPI. En la segunda etapa se realizó el pretratamiento del material lignoceluloso por explosión de vapor en un reactor de acero inoxidable a una presión de 0.69 a 4.83 MPa y a una temperatura de 160 - 260 °C. En la tercera etapa, la muestra fue sometida a hidrólisis enzimática usando el complejo enzimático celulasa Cellic CTec2 incubándose por (24, 36 y 48) horas a 50°C con relación enzima sustrato 1/10, 1/50 y 1/200 p/v, con la finalidad de evaluar el mayor porcentaje de azúcares reductores liberados. En la primera etapa que comprende la caracterización del material lignoceluloso se obtuvo 22.01 % de lignina, 41.46 % de celulosa, 18.44 % de hemicelulosa, 5.01 % de humedad y 3.95 % de cenizas. En la segunda etapa que es el pretratamiento, el porcentaje de lignina resultó 20.07 %, de celulosa 43.32 % y hemicelulosa 15.17 %. En la tercera etapa que comprende el hidrólisis enzimático se obtuvo para la relación enzima sustrato (E/S) 1/50 p/v en 24 horas de incubación 0.5581 % de azúcares reductores siendo el tratamiento con mayor porcentaje de azúcares reductores en comparación con la relación enzima sustrato (E/S) 1/10 p/v y 1/200 p/v que fue de 0.3885 % y 0.4781 % respectivamente. Se pudo determinar el porcentaje de hidrólisis alcanzado en el presente trabajo que fue de 12.77 % para celulosa y 4.89 % para holocelulosa. El material lignoceluloso de tayanca contiene bajo porcentaje de azúcares reductores por ende no es posible obtener etanol a partir de la lignocelulosa de tayanca.

**Palabras clave:** *Hidrólisis enzimática, celulasa, explosión de vapor, etanol.*

## ABSTRACT

The objective of this research work was to evaluate the potential use of lignocellulosic material from tayanca (*Baccharis microphylla*) with the intention of obtaining ethanol through enzymatic hydrolysis. It worked in three stages. In the first stage, a representative sample of the lignocellulosic material from tayanca was taken and the raw material was characterized in terms of cellulose, hemicellulose and lignin content, through TAPPI techniques. In the second stage, the pretreatment of the lignocellulosic material was carried out by steam explosion in a stainless steel reactor at a pressure of 0.69 to 4.83 MPa and at a temperature of 160 - 260 °C. In the third stage, the sample was subjected to enzymatic hydrolysis using the Cellic CTec2 cellulase enzyme complex, incubating for (24, 36 and 48) hours at 50°C with an enzyme-substrate ratio of 1/10, 1/50 and 1/200 p/v, with the purpose of evaluating the highest percentage of reducing sugars released. In the first stage, which includes the characterization of the lignocellulosic material, 22.01 % lignin, 41.46 % cellulose, 18.44 % hemicellulose, 5.01 % moisture and 3.95 % ash were obtained. In the second stage, which is the pretreatment, the percentage of lignin was 20.07 %, cellulose 43.32 % and hemicellulose 15.17 %. In the third stage, which includes enzymatic hydrolysis, 0.5581 % of reducing sugars were obtained for the enzyme substrate ratio (E/S) 1/50 p/v in 24 hours of incubation, being the treatment with the highest percentage of reducing sugars compared to the treatment with the highest percentage of reducing sugars. enzyme substrate ratio (E/S) 1/10 p/v and 1/200 p/v which was 0.3885% and 0.4781 % respectively. The percentage of hydrolysis reached in the present work was 12.77 % for cellulose and 4.89 % for holocellulose.

**Keywords:** *Enzymatic hydrolysis, Cellulose, steam explosion, etanol.*



## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1 Descripción del problema

El consumo mundial de combustibles fósiles representa el 85,2 % del total en 2017. El 34.2 % corresponde al petróleo, el 23,4 % al gas natural, y el 27,6 % al carbón. Las energías renovables (eólica y solar principalmente) representan el 3,6 % (Iranzo, 2016). Tres sectores concentran la mayor parte del consumo que representan un total de 75.80 % del consumo final de energía útil: transporte 33.5 %; industria 27.90 %; y residencial 14.40 %; El transporte se ha convertido en el principal consumidor de energía, que se obtiene de la quema de combustibles mayoritariamente fósiles y genera emisiones gaseosas contaminantes. En el caso de Perú el consumo de energía neta para el sector transporte representa el 41.8 %, para el sector residencial el 21,2 %, para el sector industrial el 19,9 %, y para el sector minero el 7,9 %. (MINEM, 2016).

El consumo descontrolado de recursos no renovables y la emisión de dióxido de carbono hacia el ambiente, nos llevan a proponer nuevas formas de producir combustibles que sean renovables y más amigables con el medio ambiente. En tal sentido los biocombustibles se tornan imprescindibles (Rodríguez, 2012).

Se define biocombustibles a cualquier combustible que se origine a partir de organismos recientemente vivos o de sus desechos metabólicos, y que su uso disminuya la demanda de combustibles fósiles tradicionales de manera considerable (Carmona, 2007) . Se destacan el biodiesel, el biogás, y el bioetanol, los cuales sustituyen al diésel, gas y gasolinas, respectivamente.

Se plantea como una alternativa de solución a los problemas planteados el uso de biocombustibles de segunda generación. La principal característica de este tipo de biocombustible consiste en la utilización de residuos agrícolas y forestales. Trabajar con residuos hace posible que no se entre en conflicto con las fuentes destinadas a la alimentación (Pezoa, 2010). Además, se disminuye la generación de gases de efecto invernadero por la quema de estos residuos (Ministerio de Energía, 2011).

Estos residuos agrícolas y forestales también son denominados fuentes lignocelulósicas (Pezoa, 2010). Estas fuentes, como describe su nombre, son sustratos compuestos principalmente por lignina, hemicelulosa y celulosa. Las tres representan a grandes polímeros, predominando principalmente la celulosa a causa de la presencia de monómeros de glucosa.



El material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, sin embargo, el principal inconveniente para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para la obtención de estas.

Grandes cantidades de arbustos son generados en la naturaleza, y en muchos casos se desconocen sus potencialidades, estos arbustos son alternativas que hacen necesario que se desarrollen nuevas tecnologías que permitan realizar los procesos necesarios para el aprovechamiento de los mismos. Esto significaría un desarrollo económico, además implicaría reducir la contaminación ambiental y prescindir el consumo de petróleo, es más, para las regiones, podría representar una salida para el sector agrícola del país. Es por esto que se plantea el uso de bioetanol producido a partir del material lignocelulósico, para disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero.

Teniendo en cuenta los arbustos que se generan en nuestra región, buscamos así la forma de aprovechar el material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*) producido en el departamento de Apurímac como una opción para solucionar este dilema, y además dar un valor agregado a esta planta y pueda ser utilizado para la generación de un producto industrial como es el etanol que en la actualidad es empleado como biocombustible. Con el fin de obtener mejores resultados en cuanto al hidrolisis se estudió los parámetros más adecuados tomando en cuenta las variables como el tiempo de hidrolisis y concentración de enzimas. Durante el hidrolisis, por acción de la enzima comercial Novozyme se obtuvo azúcares fermentables para finalmente obtener etanol a partir del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*).

## 1.2 Enunciado del Problema

### 1.2.1 Problema general

¿Será posible hidrolizar con enzima el material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*) para producir azúcares reductores y obtener etanol?

### 1.2.2 Problemas específicos

- ¿Será posible determinar las características fisicoquímicas del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*)?
- ¿Será posible evaluar el efecto de la relación enzima sustrato y el tiempo de hidrolisis sobre el porcentaje de hidrólisis del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*) para obtener etanol?



### 1.2.3 Justificación de la investigación

La tayanca (*Baccharis microphylla*) es un arbusto que crece en la región de Apurímac, no es aprovechada con fines industriales, crece naturalmente, pero generalmente se encuentran en abundancia en terrenos con escasas de agua y pendiente pronunciada, los tallos, hojas y en sí toda la planta no es utilizada con fines industriales, además, no tiene ninguna propiedad curativa, alimenticia o nutritiva.

En los últimos años el consumo de energía, se ha intensificado progresivamente debido al incremento demográfico mundial.

En la actualidad hablar de biocombustibles es imprescindible. El tema del calentamiento global es de igual forma uno de los más mencionados.

Para solucionar, o por lo menos disminuir temporalmente este grave problema, generaremos energías alternativas como el etanol. Es por ello que se ha propuesto estudiar la obtención de etanol a partir de tayanca que es una fuente lignocelulósico abundante y renovable como materia prima.

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.1 Objetivos de la investigación

##### 2.2.1 Objetivo general

Evaluar la hidrólisis con enzima del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*) para producir azúcares reductores y obtener etanol.

##### 2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar las características fisicoquímicas del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*).
- Evaluar el efecto de la relación enzima sustrato y el tiempo de hidrólisis sobre el porcentaje de hidrólisis del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*) para obtener etanol.

#### 2.2 Hipótesis de la investigación

##### 2.2.3 Hipótesis general

Los parámetros de hidrólisis (concentración de enzimas y temperatura) influyen en la obtención de etanol a partir del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*).

##### 2.2.4 Hipótesis específicas

- Las características fisicoquímicas del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*) son favorable para la obtención de etanol.
- Si el efecto de la relación enzima sustrato y el tiempo de hidrólisis sobre el porcentaje de hidrólisis del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*) son óptimos, entonces es posible obtener etanol.



### 2.3 Operacionalización de variables

**Tabla 1 — Variable descriptivo**

Variable descriptivo	Indicador	Índice
Características fisicoquímicas	Porcentaje de celulosa	%
	Porcentaje de hemicelulosa	%
	Porcentaje de lignina	%

**Tabla 2 — Descripción de las variables**

Variables	Indicador	Índice
VARIABLE INDEPENDIENTE		
Relación enzima/sustrato (E/S) v/p	Concentración de enzima	ml/g
Tiempo de hidrólisis	Tiempo	Horas
VARIABLE DEPENDIENTE		
Porcentaje de hidrólisis	Contenido de azúcares reductores	mg
	Porcentaje de celulosa	%

## CAPÍTULO III

### MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 3.1 Antecedentes

- a) Rodríguez García (2015) a partir de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar (*Saccharum Officinarum L.*)" tuvo como objetivo describir el óptimo tiempo de fermentación y el tratamiento de mayor rendimiento de producción de etanol (ml de etanol/kg de sustrato). Rodríguez menciona que el bagazo de caña está constituido por 41.3% de celulosa, 29.7 % de lignina y 25.5 % de hemicelulosa. El autor empleo el pretratamiento por extracción de vapor a 220°C por 10 minutos el cual se realizó a base a 1.5 kg de tallo de caña de azúcar. Finalmente tuvo como resultado que el tiempo de extracción por vapor a 5.00 min es de 1023.72 ml Etanol.kg de sustrato, y superó estadísticamente al tiempo de extracción por vapor de 10.00 min que es de 658.56 Etanol.kg de sustrato.
- b) Espinoza Alvarado (2015). En su investigación "Obtención de alcohol etílico a partir del almidón de banano (cavendish gigante) en la provincia de el Ooro, el Guabo, 2014". Llevó a cabo la hidrólisis del almidón que se encuentra en el banano verde con el proposito de obtener glucosa fermentable mediante tres tipos de enzimas (Termamyl, Optitherma y glucoamilasa). En esta investigación el autor inicia el hidrolisis con una concentración promedio de 13,42 % de glucosa que dio resultado después de licuar banano verde y agua en una relación de 2:1. Que después de 90 minutos de obtuvo en el hidrolizado concentraciones de 13,1 % de glucosa con la enzima glucoamilasa, 11,02 % con Optitherma y 10,73 % con Termamyl. Con ello determina que el banano verde es una fuente importante de almidón con 21,2 % de hidratos de carbono (celulosa, hemicelulosa, azucares reductores y almidón) los cuales pueden ser hidrolizados a azucares fermentables para la obtención de etanol.
- c) Rodríguez Droguett (2012). Menciona en su trabajo de investigación "Efecto del uso de mezclas de lignocelulosas sobre la producción de etanol de segunda generacion" que el porcentaje de celulosa para el rastrojo de trigo es de 30 %, el porcentaje de lignina es de 15% y el porcentaje de hemicelulosa es de 25 % en peso seco., para el rastrojo de maíz el porcentaje de celulosa representa el 45 %, el porcentaje de lignina 15 % y hemicelulosa el 35 % en peso seco y para el residuo de eucalipto el porcentaje de



celulosa es de 45 %, de lignina 31.3 % y de hemicelulosa 19.2 % en peso seco; después de someter estos tres sustratos a un pretratamiento biológico con hongo de pudrición blanca en un tiempo de 25 días para el rastrojo de trigo, 25 días para el rastrojo de maíz y 45 días para el residuo de eucalipto, obtuvo como resultado 14.66 g/l de glucosa para rastrojo de maíz, 6.14 g/l de glucosa para el rastrojo de trigo y 3.45 g/l de glucosa para el residuo de eucalipto. A partir de estos resultados el autor afirma la existencia de diferencias significativas entre los distintos tipos de sustratos.

- d) Barrios Caballero (2014). En su investigación “Obtención de azúcares reductores por hidrólisis térmica a la piña del *Agave Americana L.*, a utilizarse en la producción de una bebida destilada” menciona que la hidrólisis de la inulina del maguey peruano (*Agave Americana L Agave Americana l*) ha ido aumentando gradualmente a medida que los factores del proceso aumentan (tiempo y temperatura), alcanzando una conversión máxima promedio en ARD de  $7.31 \pm 0.05$  g/100g de mosto (evaluados por el método de Fheling AOAC958.32), a una temperatura de 110°C en 10 horas de autoclave, sin embargo a una temperatura de 120°C en 6, 8 y 10 horas respectivamente la conversión de inulina a ARD, ha sido negativa, ya que ha disminuido, debido al aumento de la temperatura y el tiempo de exposición al calor, el autor explica que esta disminución de ARD en el zumo se debe a que los azúcares han iniciado un proceso de carbonización (adquisición de color negro en el zumo) y posterior desintegración total del azúcar, transformando el sabor dulce inicial en amargo. En el proceso de hidrólisis de ácido diluido a la fibra del *Agave Americana* previo tratamiento por el método hidrotérmico, obtuvo una concentración de 9.28 g/L de azúcares reductores obteniendo un rendimiento de 27.84 % con las variables de estudio de 30 minutos, concentración de ácido ( $H_2SO_4$ ) de 8 % y para la hidrólisis acida diluida realizada al tratamiento seleccionado de expansión por vapor explosión, presento una concentración de azúcares reductores de 9.41 g/L con un rendimiento de 28.23 %, a condiciones de 30 minutos y a una concentración de 8 % de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ).
- e) En el estudio “Aprovechamiento del bagazo de piña para obtener celulosa y bioetanol, 2011” realizaron hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  en dos fases, en la primera fase (hidrólisis fuerte), tomaron una relación residuo/ácido de 1/10 (g/mL de ácido) y utilizan  $H_2SO_4$  Al 72%, este procedimiento se lleva a cabo en un matraz esférico a una temperatura de 30°C durante 1 hora. La segunda fase (hidrólisis diluida) consistió en adicionar agua a la primera fase hasta obtener una concentración de  $H_2SO_4$  Al 8% y posteriormente



calentarlo a 105°C durante 3 horas. La Hidrólisis realizada en esta investigación fue a partir de celulosa y bagazo de piña seco, los cuales se convirtieron en azúcares (glucosa) por medio de una hidrólisis ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En esta hidrólisis, se colocaron 5 g de materia prima (celulosa o bagazo de piña) en un matraz esférico con 50 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 %, y, mantuvieron a 30°C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo agregaron 401.5 mL de agua para obtener una concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 8 % y se calentó a 105°C durante 3 horas posteriormente se bajó la temperatura a 3040°C y se filtró, la solución filtrada se neutralizó con NaOH al 2N hasta obtener un pH de 5 y finalmente se guarda en el refrigerador para proceder a realizar la fermentación. La celulosa extraída del bagazo de piña seco, mostró una apariencia porosa y poco flexible, y una coloración crema. La conversión obtenida fue del 60 %, ya que de 5 g de bagazo de piña se obtuvieron 3 g de celulosa.

- f) Según (Arellano Perales, 2015) en su tesis titulada “Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática” menciona que la cáscara de jastropa curcas antes de ser sometido a pretratamiento contiene 19.87 % de lignina, 57.13% de celulosa y 22.99% de hemicelulosa., y que después de ser sometida a pretratamiento alcalino contiene 18.27% de lignina, 67.28% de celulosa y 13.79% de hemicelulosa, el autor demuestra el efecto que tiene el pretratamiento sobre la hemicelulosa y celulosa principalmente. posteriormente, evaluó la hidrólisis enzimática, el efecto que tiene la concentración de enzima/sustrato. Realizo diversos tratamientos variando la relación de enzima sobre el sustrato pretratado (E/S): 1:200 p/p, 1:10 p/p, y 1:2 p/p, 1/5 p/p y 1 p/p y una concentración de 50 g base seca de sustrato pretratado, del cual concluye que la mayor concentración de azúcares reductores obtenido fue de 13 g/L que corresponde a la relación enzima/sustrato 1:2 p/p.
- g) Sánchez Ortiz, (2015) en su tesis titulada “Síntesis de Nanopartículas derivadas de biopolímeros extraídos de biomasa por métodos térmicos” reporta que la cáscara de cacahuete antes del pretratamiento contiene 38.93 % de lignina, 5.07 % de hemicelulosa y 32.80 % de celulosa, y después del pretratamiento químico el contenido de celulosa aumento a 65.49 %, este aumento es esperado ya que cuando la biomasa se trata con una solución alcalina, el área interna superficial del material se incrementa por hinchamiento y esto causa una disminución en el grado de polimerización y una separación en los enlaces estructurales de hemicelulosa y la lignina (Tabil L et al, 2011). El blanqueo remueve la lignina restante del tratamiento alcalino dejando más accesibles

la celulosa (Chen D, *et al*, 2012). Este cambio en la composición química antes y después del tratamiento químico resulta en un mejor grado de cristalinidad de la celulosa que lleva a mejores propiedades térmicas y mayor resistencia de las nanopartículas de celulosa que se podría extraer (Alemdar A, *et al*, 2008).

### 3.2 Marco teórico

#### 3.2.1 Tayanca (*Baccharis microphylla*)

Según Villers Ruiz *et al*, (2006) la tayanca (*Baccharis microphylla*) Se distribuye del suroeste de E.U.A. hasta Sudamérica.

En el Perú la tayanca tiene un alto rango altitudinal desde los 2800 hasta los 3900 m.s.n.m., según la zona del país, esta especie bastante polimorfa, se halla ampliamente extendida, aunque en forma discontinua, a lo largo de la cordillera de los andes. Encontrándose en los departamentos de Apurímac, cuzco, Cajamarca, Áncash y Junín. (Lipa *et al.*, 2015).

La temperatura media más aparente para su cultivo se encuentra entre los 8 y 19°C Y no es afectado por las heladas.

##### 3.2.1.1 Clasificación taxonómica de la tayanca

**Tabla 3 — Clasificación taxonómica de la tayanca (*Baccharis microphylla*)**

<b>Reino</b>	<b>plantae</b>
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Clase	Magnoliopsida
Género	Baccharis
Especie	B. microphylla
Nombre Científico	Baccharis microphylla
Nombre común	Tayanca

Extraído de Villers Ruiz *et al* (2006)

##### 3.2.1.2 Descripción Botánica

Según (Navarro *et al*, 2002) describen a la tayanca como un género de plantas permanentes y arborescentes, densamente hojosos, normalmente de



2 hasta 3 m de altura. El tallo generalmente es glabro y a menudo resinosos, las hojas son ovaladas oblongas o romboidales y de bordes enteros o aserrados. Las flores son todas floculadas. Hay 10-50 flores estaminadas masculina, pentalobuladas con corolas blancas a amarillentas; las pistiladas femeninas llegan a 150 cm.

De hábito arbustivo en floración, las flores axilares son cremosas; habitando en considerables poblaciones, individuo estéril en desarrollo, hojas pequeñas secretando sustancia pegajosa, papus dorado claro (Rado, 2011)

### 3.2.1.3 Usos

Se hace hervir con el maíz para que este se pueda descascarillar sin esfuerzo y tenga un olor y sabor más atractivo. Después combustionar se obtiene cenizas que son utilizadas para preparar la llipta que acompaña al masticado o chachado de la hoja de coca, también se usa como escoba para la limpieza de viviendas y finalmente es muy útil como leña para la preparación de alimentos y templar la temperatura de la casa, asimismo deja el ambiente aromatizado (Rado, 2011)

### 3.2.2 Biocombustible

Se entiende por biocombustible aquellos combustibles que se obtienen de biomasa. El término biomasa, en el sentido amplio, se refiere a cualquier tipo de materia orgánica que haya tenido su origen inmediato en el proceso biológico de organismos recientemente vivos, como plantas, o sus deshechos metabólicos (el estiércol); el concepto de biomasa comprende productos tanto de origen vegetal como de origen animal. En la actualidad se ha aceptado este término para denominar al grupo de productos energéticos y materias primas de tipo renovable que se origina a partir de la materia prima orgánica formada por vía biológica. Quedan por tanto fuera de este concepto los combustibles fósiles o los productos orgánicos derivados de ellos, aunque también tuvieron su origen biológico en épocas remotas. Hoy en día se pueden diferenciar distintos tipos de biomasa (Salinas *et al.*, 2009)

De acuerdo con la Secretaría de Energía, los biocombustibles se clasifican en generaciones dependiendo de la materia prima empleada en su elaboración.





**Tabla 4 — Clasificación de biocombustibles por generación**

Generación	Materia prima	Producto	Ventajas	Desventajas
Primera	Productos de consumo (caña de azúcar, remolacha, granos de maíz)	Etanol, metanol, diésel y biogás.	Facilidad de procesamiento , baja emisión de GEI.	Derivado de recursos alimenticios hacia la producción de bioenergéticas.
Segunda	Residuos agrícolas y forestales (bagazos de caña, sorgo).	Etanol, metanol, diésel e hidrógeno.	No existe desviación de alimentos hacia bioenergéticas .	Poca disminución de los gases de efecto invernadero (GEI) con respecto a la primera generación.
Tercera	Productos vegetales no alimenticios (algas verdes, árboles)	Diesel y etanol	Uso de CO <sub>2</sub> para la producción de insumos.	Uso de tierras de cultivo destinadas para sembrar insumos

Extraído de Álvarez (2009)

### 3.2.3 Fuentes de obtención de etanol

El etanol a partir de azúcares, es conocido desde los albores de la humanidad (vinos y otras bebidas fermentadas) y en la actualidad se produce con una alta eficiencia y grandes volúmenes, en especial desde el empleo del etanol anhidro como aditivo o combustible automotor.

La producción de etanol a partir de granos es muy criticada por sus implicaciones éticas al convertir alimentos en combustibles para automóviles y su efecto en el incremento en la poca disponibilidad e incrementos en el precio de los granos. El proceso se basa en la cocción, hidrólisis y fermentación de los almidones que contienen.

En el mundo se llevan a cabo gran cantidad de estudios y proyectos para desarrollar la producción a escala comercial de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Los materiales que más se han investigado son la madera y los residuos forestales, papel reciclado y residuos de la industria papelera, bagazo de caña, desechos agrícolas (hojas, ramas, hierba, frutas, paja, etc.) así como residuos sólidos urbanos.

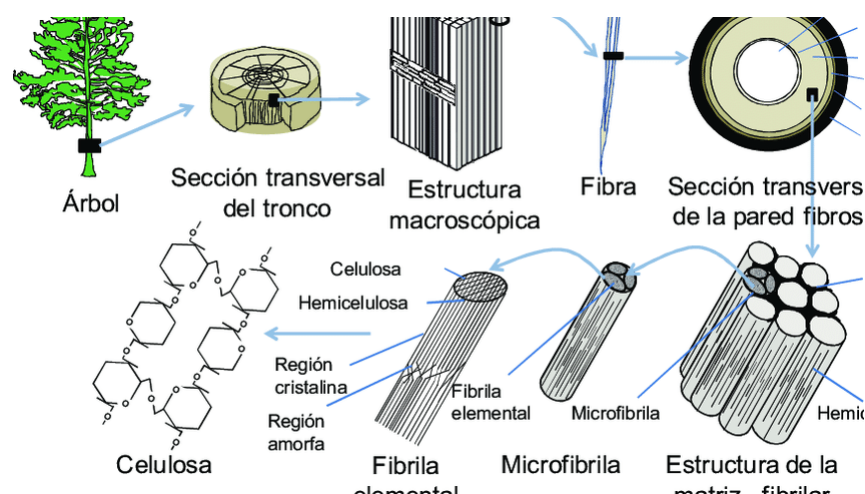
El etanol obtenido de biomasa lignocelulósica, (presentes en todos los vegetales en una estructura compuesta fundamentalmente de celulosa, hemicelulosas y lignina),



consiste en la hidrólisis de la celulosa (a glucosa) y de las hemicelulosas a xilosa y otros azúcares y posterior fermentación a etanol. (Abril *et al.*, 2012).

### 3.2.3.1 Biomasa Lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es un heteropolímero formada por esterres extraíbles, proteínas, carbohidratos, celulosa, hemicelulosa, lignina y minerales, que son fuente de energía que caracterizan a la lignocelulosa como un compuesto con enorme potencial biotecnológico. Están presentes en residuos agrícolas, industriales, forestales, municipales, pastos de crecimiento rápido, material vegetal del mar, y biomasa proveniente de zonas semiáridas (Medina *et al.*, 2011), La celulosa, hemicelulosa y la lignina conforman estructuras microfibrilares, organizadas en macrofibras que regularizan la consistencia de la pared celular de las plantas (Rubin, 2008).



**Figura 1 — Estructura general de la biomasa lignocelulósica**

Extraído de Area (2015)

#### a) Lignina

La lignina es un polímero de carácter aromático producto de la polimerización deshidrogenativa de tres alcoholes fenilpropiónicos (P-cumarílico, coniferílico y sinapílico). La unión entre los distintos monómeros se realiza a través de enlaces carbono carbono y enlaces tipo éter entre los anillos aromáticos, así como de los radicales de la misma (Narvaes *et al.*, 2006). Su composición varía notoriamente de una especie vegetal a otra; está químicamente enlazada y al mismo



tiempo entremezclada con la celulosa y la hemicelulosa, especialmente con esta última. La lignina protege a la celulosa de diversos ataques y de la degradación natural de la planta (también representa una barrera que impide el acceso a la celulosa y su fácil aprovechamiento) (Cunningham *et al*, 1994).

La lignina es la principal responsable de la rigidez en las paredes de las células vegetales y se acumula en la lámina media de esta donde su concentración puede llegar a ser del 75 %; también puede llegar a ser una protección frente al ataque de gérmenes patógenos y agresiones mecánicas.

## b) Hemicelulosa

Hemicelulosa es un término que se utiliza para designar a un grupo de heteropolisacáridos. Es un polímero formado principalmente por azúcares de cinco átomos de carbono (pentosas) como D-xilosa y L-arabinosa y de hexosas (azúcares de seis carbonos) como D-glucosa, D-manosa y D-galactosa, además contiene pequeñas cantidades de ácidos orgánicos (Cunningham *et al*, 1994).

La hemicelulosa está presente en la pared celular de las plantas y en ella forma un gel acuoso en el cual están embebidas las microfibrillas de celulosa (Cunningham *et al*, 1994). Las cadenas de polisacáridos de la hemicelulosa cumplen el papel de suministrar la unión entre la celulosa y la lignina (Narvaes *et al.*, 2006). La hemicelulosa puede ser dividida en dos grupos: celulosanos y poliurónidos. Los celulosanos están formados por azúcares simples formando cadenas centrales de pentosas (xilosa y arabinosa) o de hexosas con ramificaciones cortas (manosa, galactosa y glucosa) (Narvaes *et al*, 2006; Díaz *et al*, 2005). Las cadenas de hemicelulosa no son lineales, tienen ramificaciones laterales y no tienen una estructura regular, este polímero no es cristalino, por lo tanto, es fácilmente hidrolizado. Mientras que la celulosa siempre mantiene la misma estructura y composición, la de la hemicelulosa puede variar ampliamente entre las especies de plantas (Cunningham *et al.*, 1994). Esta muestra características adherentes, se ensancha en el agua y la dimensión de sus cadenas es notablemente más reducido que el de la celulosa (Díaz *et al.*, 2005).

### c) Celulosa

La celulosa es el biopolímero principal que compone de la pared celular de los tejidos vegetales pudiendo ser sintetizada por algunas bacterias, protozoos y hongos filamentosos (Diaz *et al.*, 2005). La celulosa es un polímero lineal de moléculas de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -glucosídicos (Cunningham *et al.*, 1994). Este carbohidrato se deposita en las paredes celulares de todas las plantas superiores en forma de fibras cristalinas que determinan la dirección del crecimiento celular y confieren la rigidez necesaria para el desarrollo de las plantas terrestres. La celulosa es producida también por plantas, algunos hongos, bacterias e incluso invertebrados marinos (Narvaes *et al.*, 2006).

La celulosa es un biopolímero cristalino con elevada docilidad mecánica y muy estable químicamente. El enlace glicosídico C-O es el más débil de toda la cadena y es en ese eslabón donde en presencia de agua, el polímero puede ser hidrolizado en sus azúcares componentes. La malla cristalina presenta dislocaciones en algunas zonas que constituyen el 15 % de la estructura celulósica las cuales son más susceptibles al hidrolisis que las regiones cristalinas (Cunningham *et al.*, 1994).

#### 3.2.4 Composición de materiales lignocelulósicos

El término biomasa se refiere a toda la materia orgánica que proviene de plantas y desechos de animales (Manuales sobre energía renovable, 2002). La mayoría de ésta es producida por las plantas, quienes convierten a energía solar en material vegetal a través de la fotosíntesis que es un proceso donde intervienen  $\text{CO}_2$ , agua y la luz solar. Este proceso fotosintético normalmente convierte menos del 1 % de la luz solar disponible, en energía química almacenada (McKendry, 2002). Teniendo en cuenta un valor promedio anual de la energía solar incidente en la tierra de  $3,67 \cdot 10^{11}$  kJ y estimando una eficiencia de la fotosíntesis de 0,07 %, la producción anual de biomasa primaria se ha cifrado en  $1,8 \cdot 10^{11}$  toneladas (Narvaes *et al.*, 2006). De esta producción de biomasa el 40 % es celulosa, por ello esta se constituye como la fuente renovable de carbohidratos más abundante con la que cuenta el hombre (Narvaes *et al.*, 2006).



La composición química de los materiales lignocelulósicos está constituida mayoritariamente por tres polímeros estructurales: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. En su estado nativo los materiales lignocelulósicos se encuentran asociados a otros componentes de naturaleza no estructural como fenoles, terpenos o alcaloides, entre otros que pueden llegar a suponer un porcentaje considerable en el peso de estos materiales, pudiendo así mismo llegar a tener una influencia significativa en los procesos de degradación (Diaz *et al.*, 2005).

En la Tabla 5 se presenta la composición de algunos materiales lignocelulósicos, donde se puede observar que estos en su mayoría están constituidos por celulosa y hemicelulosa (que son los polímeros objetivo para producción de etanol) cuya variación depende de la fuente, es decir del tipo de planta. La pared celular del material lignocelulósico está formada básicamente por un 70 a 85% de polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa), y por un 10 a 30% de lignina, es posible ver que la suma de esta más lignina suma casi el 100% del material. El resto está compuesto por sustancias solubles en solventes orgánicos como taninos, terpenos, lípidos, entre otros (McKendry, 2002), (Cunningham *et al.*, 1994).

Los materiales lignocelulósicos pueden ser clasificados en tres categorías: en primer lugar la biomasa natural producida espontáneamente en las zonas no cultivadas, tanto en tierra firme como en zonas marítimas; el segundo grupo lo constituye la biomasa residual procedente de las explotaciones agrícolas y forestales, así como la generada en las industrias en los núcleos urbanos; por último la biomasa producida específicamente para fines energéticos en las denominadas plantaciones energéticas (Narvaes *et al.*, 2006).

A continuación, se presenta una descripción de los constituyentes principales de los materiales lignocelulósicos:

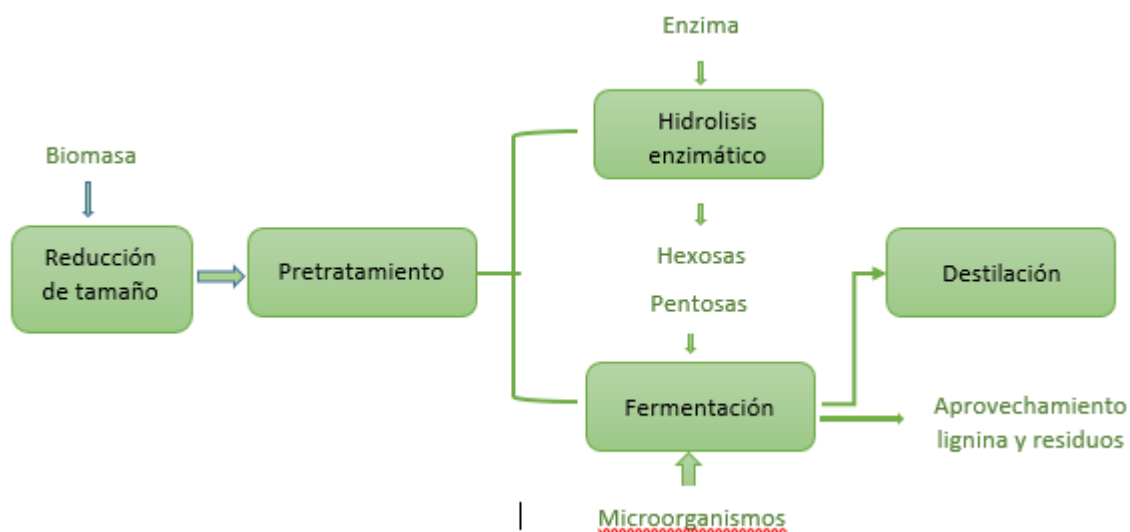
**Tabla 5 — Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas comunes y basuras**

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40 a 55	24 a 40	18 a 25
Madera blanda	45 a 50	25 a 35	25 a 35
Granos de maíz	45	35	15
Pastos	25 a 40	35 a 50	10 a 30
Papel	85 a 99	-	0 a 15
Paja de trigo	30	50	15
Tipos de basura	60	20	20
Hojas	15 a 20	80 a 85	-
Semillas de algodón	85 a 95	5.20	-
Periódico	40 a 55	25 a 40	18 a 30
Residuos de pulpa de papel húmedo	60 a 70	10 a 20	5 a 10

Extraído de Sun *et al* (2002)

### 3.2.5 Proceso de obtención de etanol

La figura 2 muestra la etapa de obtención de etanol o bioetanol de segunda generación (2G), a partir de biomasa lignocelulósica (Merino *et al.*, 2007): se empieza por reducir el tamaño de muestra, en la segunda etapa se hace pretratamiento, seguidamente hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, para luego fermentar, y finalmente recuperación y purificación del bioetanol.



**Figura 2 — Esquema de las etapas de obtención de etanol**

Extraído de Merino *et al.*, (2007)

### 3.2.6 Transformación de lignocelulosa a biocombustible

La conversión de la biomasa lignocelulósica a etanol se realiza en varias etapas; la primera es el pretratamiento, que tiene como objetivo dissociar la conformación vegetal, solubilizar total o parcialmente la lignina y la hemicelulosa y reducir la cristalinidad de la celulosa. La segunda etapa es la hidrólisis de la celulosa, dando lugar a la recuperación de azúcares fermentables; la tercera es la fermentación de los monosacáridos vía biológica y la última es la obtención del etanol producido (Garcia *et al*, 2010). En los siguientes apartados, se explica a detalle cada etapa del proceso.

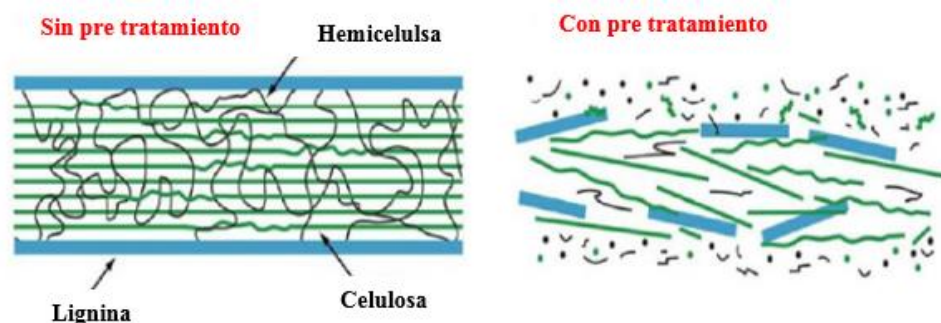
### 3.2.7 Pretratamiento

El pretratamiento consiste en modificar las propiedades físicas y fisicoquímicas del material lignocelulósico, como pueden ser el grado de polimerización y el estado cristalino de la celulosa. Tiene como objetivo el rompimiento del escudo de lignina que limita la accesibilidad de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa, y altera el tamaño y estructura para facilitar la hidrólisis rápida y eficiente; puede llevarse a cabo mediante métodos físicos, químicos o biológicos (Cuevo *et al*, 2009).

El éxito del pretratamiento se mide en función de la degradación de la lignina y la hemicelulosa como un indicador de la disociación de la matriz celulosa-lignina, la disminución de la cristalinidad y el aumento de la porosidad de la celulosa (Fonlecha *et al*, 2011).

De acuerdo con lo reportado por (Sakamoto *et al*, 2012), el remanente líquido generado después de un pretratamiento puede ser filtrado para obtener dos fracciones: la parte sólida rica en celulosa y la fracción líquida rica en hemicelulosa conformada por xilosas, glucosas, galactosas y arabinosas.

En la figura 7 se aprecia una representación del efecto del pretratamiento sobre el material vegetal (Buendia, 2013).



**Figura 3 — Cambio estructural del material lignocelulósico luego de un pretratamiento**

Extraído de Nikltschek (2010)

Existen diversos procesos para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos, los cuales se describen en la tabla 6.

**Tabla 6 — Ejemplos de pretratamiento para materiales lignocelulósicos**

<b>Pretratamiento</b>	<b>Descripción</b>
Físico	Disminución de tamaño de partícula para aumentar el área de superficie de hidrólisis.
Autohidrolisis	De 150 a 180 °C y presión alta, la hemicelulosa y lignina comienzan a solubilizarse y genera mayor accesibilidad a la celulosa.
Químicos	Se utiliza ácidos y/o bases para solubilizar la lignina y la hemicelulosa y así dejar a la celulosa expuesta para ser hidrolizada.
Oxidativos	Se agregan agentes oxidantes como ácido acético, peróxido de hidrógeno u ozono, donde se afecta a la lignina y hemicelulosa.
Biológicos	Utilización de hongos y bacterias capaces de solubilizar la lignina y dejar expuesta la celulosa para ser hidrolizada.

Extraído de Ovadon *et al* (2005)

### 3.2.7.1 Pretratamientos físicos

Tienen como objeto reducir el grado de polimerización de la celulosa y la lignina, así como de aumentar la superficie accesible para las enzimas. Suelen ser ineficaces y poco rentables, como pueden ser la molienda y las técnicas de irradiación (Abril *et al.*, 2012).

### 3.2.7.2 Hidrólisis a presión o autohidrólisis

Consiste en calentar el material lignocelulósico con agua bajo fuerte presión. El proceso es similar al de una simple autoclave (proceso discontinuo) y permite la solubilización completa de la hemicelulosa y una solubilización significativa de la lignina. Es una técnica interesante ya que conduce a rendimientos de hidrólisis elevados y minimiza la formación de productos de degradación. A pesar de ello, no se conoce ninguna aplicación industrial (García *et al*, 2010).



### 3.2.7.3 Pretratamientos químicos

En esta etapa se emplean distintos agentes químicos como ozono, ácidos, bases, peróxidos y solventes orgánicos.

Los pretratamientos en los que se emplea ácido sulfúrico o clorhídrico diluido han sido lo más estudiados debido que mejoran notablemente el proceso de hidrólisis enzimática de la celulosa sobre todo en materiales herbáceos (Herrera et al, 2004; Irfan *et al*, 2010; Chandel *et al*, 2011; Lin *et al*, 2012).

La adición de bases diluidas, principalmente hidróxidos de sodio, potasio calcio, permite la disolución de la lignina causando un aumento en el área de la superficie interna de la biomasa reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa. Los pretratamientos con hidróxido de sodio o de potasio son los más ampliamente utilizados para paja de cereal (Akhtar *et al*, 2001; Li *et al*, 2010; Kang *et al*, 2012).

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno puede llegar a eliminar el 50 % de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas liberando glucosa durante la sacarificación (Cuervo *et al*, 2009). El proceso “organosolv” consiste en la adición de solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona, así como también ácidos inorgánicos que actúan como catalizadores que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa (Zhao *et al*, 2009). Todos estos procesos tienen el inconveniente de que su coste es alto en comparación con otros pretratamientos, ya que la adición de agentes químicos y la eliminación de dichos compuestos suponen un coste adicional.

En los últimos años se han desarrollado otras tecnologías químicas como a adición de peróxido de hidrógeno combinado con álcalis y el pretratamiento con ozono. El primer método es muy efectivo para la eliminación de lignina y la fracción hemicelulósica (Monte *et al*, 2011).

### 3.2.7.4 Tratamientos fisicoquímicos

Dentro de este tipo de pretratamiento se pueden destacar tres procesos: la explosión de vapor (o steam explosión SE), la termohidrólisis (o Liquid Hot Water LHW) y la explosión de fibra de amoníaco (AFEX). La explosión de vapor es un método en el que la biomasa se somete a la acción de vapor

saturado (20-50 bares, 160-290°C) durante unos pocos minutos transcurridos los cuales se provoca una descompresión súbita hasta presión atmosférica. La termohidrólisis consiste en someter a la biomasa a un tratamiento con agua a alta temperatura y a presión en un tiempo establecido. Se consideran las variables de operación que son temperatura de 160-230°C y presión superior a 5 MPa durante 20 minutos. Con este tratamiento se obtiene el mayor porcentaje de azúcares de cinco carbonos y no produce inhibidores (Pérez *et al*, 2007; Sousa *et al*, 2009).

El pretratamiento AFEX, trabaja con temperatura de (60-100°C) por un tiempo de 5 a 30 minutos, sometiendo posteriormente a la biomasa impregnada en amoníaco a una descompresión repentina. Este pretratamiento presenta alto rendimiento en materiales herbáceos (Himmel *et al*, 1997; Sun y Cheng, 2002; Sarkar *et al*, 2012).

Debido a que la explosión de vapor es el método más estudiado y utilizado para la biomasa lignocelulósica por su capacidad de abarcar un amplio rango de materias primas se ha visto por conveniente emplear para pretratar el material lignocelulosico de la tayanca en este trabajo.

#### a) **Explosión de vapor**

La explosión de vapor (EV), también llamada autohidrólisis, consiste en calentar rápidamente la biomasa mediante vapor saturado a temperatura de entre 160 y 230 °C y a alta presión durante un determinado tiempo y posteriormente se reduce la presión repentinamente, por lo que el material lignocelulósico se somete a una descompresión súbita. (Talebnia *et al*, 2010). La adición de agentes químicos como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o SO<sub>2</sub> puede favorecer la eliminación de la fracción hemicelulósica y mejorar el rendimiento de hidrólisis enzimática cuando el proceso se lleva a cabo a bajas temperaturas (Jurado *et al*, 2009).

El efecto mecánico de la explosión de vapor genera la división de fibras debido a las fuerzas de cizalladura ocasionada por la despresurización, a causa de la hidrólisis de algunos grupos acetilo de las hemicelulosas, dando lugar a la presencia de ácido acético que disminuye el pH del agua y provoca la hidrólisis catalítica de la hemicelulosa (Pejó, 2009).



La lignina es redistribuida y parcialmente solubilizada al igual que la hemicelulosa, lo que hace que la celulosa sea más accesible al ataque enzimático debido al incremento del área superficial (García *et al*, 2006).

Varios autores han demostrado la eficacia de la explosión de vapor en diferentes materiales lignocelulósicos como maderas duras (Negro *et al.*, 2003), maderas blandas (Galbe y Zacchi, 2002); bagazo de maíz (Varga *et al*, 2004). Bagazo de caña de azúcar (Glasser y Wright, 1998). La explosión de vapor es muy usada para maderas duras y residuos agrícolas ya que el contenido en lignina es menor y poseen un mayor número de grupos acetilo, por lo que el proceso de autohidrólisis es más efectivo (Pejó, 2009).

La explosión de vapor requiere bajo consumo de energía comparado con otras tecnologías, la posibilidad de emplear tamaños parcialmente grandes de partícula, la alta compensación de azúcares y la poca o nula utilización de agentes químicos. Sin embargo, presenta algunas barreras como la degradación de los azúcares derivados de la fracción hemicelulósica y que genera la solubilización y transformación de la lignina en compuestos potencialmente inhibitorios de las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación. Es probable también que se produzca la solubilización de extractivos durante el pretratamiento dando lugar a compuestos tóxicos en bajas concentraciones (García *et al*, 2006).

### **3.2.7.5 pretratamiento biológico**

Los tratamientos biológicos son amigables con el medio ambiente pues comprenden el uso de microorganismos como los hongos de podredumbre blanca, parda o blanda, que son capaces de degradar la lignina y la hemicelulosa (Sun *et al*, 2002). Este método requiere baja demanda de energía y no produce compuestos tóxicos, pero, es un proceso lento que limita su aplicación industrial (Talebnia *et al*, 2010).

### **3.2.8 Hidrólisis química y enzimática**

La hidrólisis o sacarificación se refiere a los procesos que convierten los polisacáridos en azúcares monoméricos (Castillo *et al*, 2011).



La hidrólisis química suele realizarse comúnmente utilizando ácidos, se han empleado ácidos sulfúrico y clorhídrico concentrados, con la desventaja de ser tóxicos, corrosivos y peligrosos; y además requieren de reactores que sean resistentes a la corrosión, lo cual da como resultado un proceso muy costo. Además, los ácidos deben recuperarse para hacer el proceso económicamente viable (Binod *et al*, 2011). En la hidrólisis enzimática, la sacarificación de la celulosa se lleva a cabo enzimáticamente mediante celulasas, las cuales producen la ruptura de las cadenas poliméricas de la celulosa y la hemicelulosa, que previamente han sido modificadas estructuralmente en el pretratamiento. A partir de la celulosa se obtiene glucosa, mientras que a partir de la hemicelulosa se obtienen diferentes monosacáridos, tal como xilosa, glucosa, arabinosa, galactosa y manosa, entre otros. La principal ventaja del hidrólisis enzimática sobre la química, es que la enzimática no presenta problemas de corrosión como la química.

La hidrólisis enzimática es un método específico, realizado en condiciones relativamente suaves (50°C), que permite rendimientos de hidrólisis superiores a los obtenidos por vía química.

El procedimiento más común consiste en poner en contacto la disolución de enzima con la muestra del sustrato lignocelulósico previamente pretratado, manteniendo el pH, la temperatura y la homogeneidad de la mezcla determinadas para todo el proceso. Los factores que afectan la hidrólisis enzimática de la celulosa incluyen: el tipo de sustrato, la actividad celulasas y las condiciones de reacción: temperatura y pH (Binod *et al*, 2011).

### 3.2.9 Microorganismos productores de celulosa

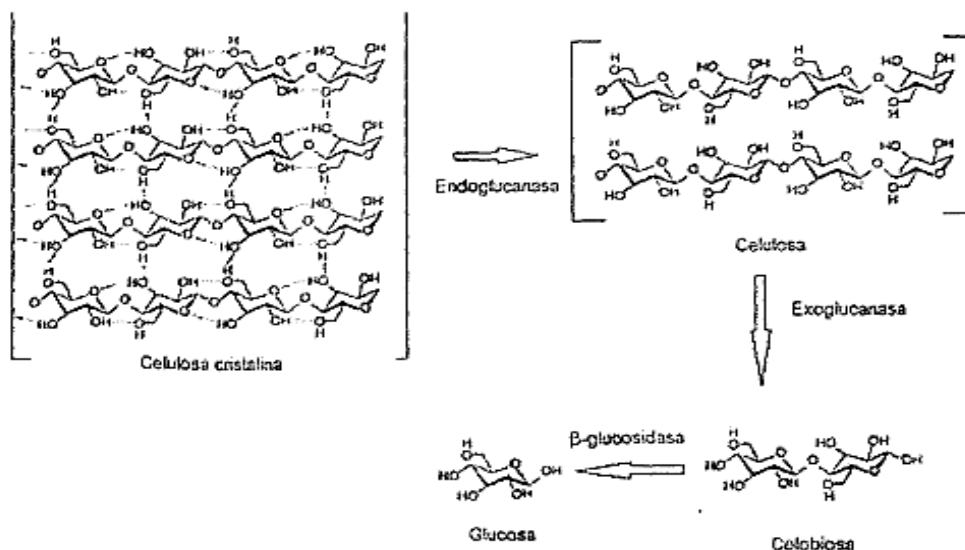
Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. De estos sólo algunos de ellos generan enzima celulasas extracelulares capaces de hidrolizar celulosa (Ovadon *et al*, 2005). Los sistemas enzimáticos de los microorganismos celulolíticos manifiestan un evento muy particular, presentan sinergismo como estrategia al degradar residuos de lignocelulosa. El consorcio enzimático celulolítico se puede obtener por vía fúngica mediante la inducción del hongo filamentoso *Trichoderma*, ya que se ha reportado a este género como productor de celulasas (Maurya *et al*, 2012).



### 3.2.10 Actividad enzimática: celulasas

La complejidad de la biomasa lignocelulósica impide que pueda ser hidrolizada por una sola enzima. La hidrólisis enzimática mediante una celulasa requiere de la acción combinada de tres diferentes tipos de actividades (Carreón Rodríguez *et al*, 2009):

1. El interior de la cadena de celulosa enlaces p-(1, 4) de glucosa son cortadas por las endoglucanasas que generan oligosacáridos de distintas longitudes y consecuentemente nuevos extremos reductores.
2. Las exoglucanasas o celibiohidrolasas, actúan de manera progresiva en extremos reductores y no reductores de la cadena de celulosa, liberando glucosa y celobiosa (disacáridos de glucosa).
3. Las P-glucosidasas hidrolizan celobiosa y productos de cadena corta en monómeros de glucosa.



**Figura 4 — Mecanismo de acción enzimática para transformar celulosa a glucosa**  
 Extraído de Demers *et al* (2009)

El rendimiento del hidrólisis depende del contenido de lignina ya que restringe el acceso de las celulasas por impedimento estérico provocado por los enlaces lignina - carbohidratos y por la naturaleza hidrofóbica de la lignina que rechaza la acción hidrofílica de las enzimas. Por ende, la degradación de la lignina es determinante en el rendimiento del hidrólisis enzimática (Binod *et al*, 2011).

### 3.2.11 Bioetanol lignocelulósico

**Tabla 7 — Presenta diversos estudios para la obtención de etanol a partir de diversos materiales lignocelulósicos**

Material Lignocelulósico	pretratamiento	Hidrólisis	Fermentación	Obtención de Etanol	Referencia
<i>Pennisetum Purpureum</i>	NaOH al 2% (w/w) 120°C; 60 minutos	Enzimas Comerciales : accellerase 1500 de Genecor. T: 50°C 180 rpm pH 4.8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , T: 37°C y 150 rpm. Tiempo: 24 horas.	26.1 g/L	Cardona (2013)
Banano verde	H2S04 al 0.5% por 30 minutos	Enzimas comerciale: termomyl 120 L amylase AG 300L T: 3 horas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> . T: 37°C Tiempo: 48 horas	0.065 L EtOH/kg banano verde	Guevara (2012)

Extraído de Reyes (2012)

### 3.3 Marco conceptual

- a) **Etanol.** El etanol o alcohol etílico (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) “es una importante especie química orgánica por sus propiedades únicas y sus variados usos. Bajo condiciones ordinarias, el etanol es volátil, inflamable, se encuentra en estado líquido, incoloro, miscible en agua y en solventes no polares” (Cortínez, 2010).

Akhtar (2008) define al etanol de celulosa como “un tipo de combustible producido a partir de la celulosa contenida en la biomasa de plantas tales como pastos, arbustos y árboles. La mayor parte de la masa de las plantas está compuesta de lignocelulosa, que incluye celulosa, hemicelulosa y lignina. La conversión de la celulosa en etanol implica dos pasos fundamentales”: “Cortar las cadenas largas de las moléculas de celulosa dejando así libres a la glucosa y otros azúcares, y fermentar esos azúcares para su conversión en etanol”.

- b) **Biocombustible.** Los combustibles derivados a partir de biomasa, fuentes renovables, que se encuentran en forma sólida (residuos vegetales, fracción biodegradable de los residuos urbanos o industriales) se denominan biocombustibles, y como líquida (bioalcoholes, bioetanol, biodiesel) y gaseosa (biogás, hidrógeno).

- c) **Hidrolisis.** La hidrolisis llamada también sacarificación, es la etapa en la que se transforman los polisacáridos en azúcares simples, que después de fermentados se obtiene distintos productos como etanol, acetonas y butanol, Existen otros tipos de hidrólisis como el uso de rayos gamma, irradiación por haz de electrones e irradiación por microondas, pero estos procesos no son industrialmente viables por los altos costos (Aguado *et al.*, 2005), (Balat, 2011).
- d) **Hidrolisis químico.** Se denomina hidrolisis químico al proceso que consiste en someter el material lignocelulósico a una sustancia química por un determinado tiempo y temperatura específica, con la finalidad de obtener monómeros de azúcar provenientes de la celulosa y polímeros provenientes de la hemicelulosa, ya sea en presencia de reactivos ácidos o alcalinos, sin embargo, es más común el uso de ácido en este proceso (Balat, 2011).
- e) **Hidrolisis enzimática.** Es la reacción o modificación que permite romper la estructura de la lignocelulosa y separar la lignina, con el fin de obtener azúcares fermentables. La hidrólisis enzimática consiste en catalizar por acción de enzimas denominadas celulasas, un conjunto de celulasas (Barrios Hernández, 2014). Durante la hidrólisis enzimática, la celulosa se degrada por las celulasas a azúcares reductores que pueden ser fermentados por levaduras o bacterias a etanol (Sun *et al*, 2002). La susceptibilidad de los sustratos celulósicos dependerá de las características estructurales como la cristalinidad de la celulosa, grado de polimerización de la celulosa, área superficial y contenido de hemicelulosa y lignina. La lignina interfiere con la hidrólisis por bloqueo del acceso de las celulasas a la celulosa y por enlazarse irreversiblemente a las enzimas hidrolíticas. La eliminación de la lignina puede aumentar sustancialmente la velocidad de hidrólisis (Mosier *et al*, 2005).
- f) **Parámetro.** Se denomina parámetro al dato que se estima como indispensable y orientativo para poder evaluar o valorar una determinada situación a partir de un parámetro, una cierta circunstancia puede comprenderse o ubicarse en perspectiva.



## CAPÍTULO IV

### METODOLOGÍA

#### 4.1 Tipo y nivel de investigación

La investigación se desarrolló en dos etapas, la primera etapa describe que la investigación es de tipo descriptivo, porque se identificaron las principales características fisicoquímicas del material lignocelulósico de tayanca, que se genera en el departamento de Apurímac, la segunda etapa describe que la investigación es de tipo explicativo ya que se evaluaron los factores de relación enzima/sustrato (E/S) y tiempo de hidrolisis para obtener etanol a partir del material lignocelulósico de tayanca, cuyo propósito es la disminución del impacto ambiental, además se propone como una nueva fuente de materia prima para la producción de etanol.

#### 4.2 Diseño de investigación

El presente trabajo involucró un diseño completamente al azar, los factores que se manipularon fueron: relación enzima sustrato 1/50, 1/10 y 1/200 p/v y tiempo de hidrolisis 24, 36 y 48 horas.

#### 4.3 Población y muestra

La población estuvo conformada por la planta de tayanca (*Baccharis microphylla*) que crecen de forma natural en el departamento de Apurímac específicamente en el distrito de Huaquirca, que se encuentra aproximadamente a 3500 msnm.

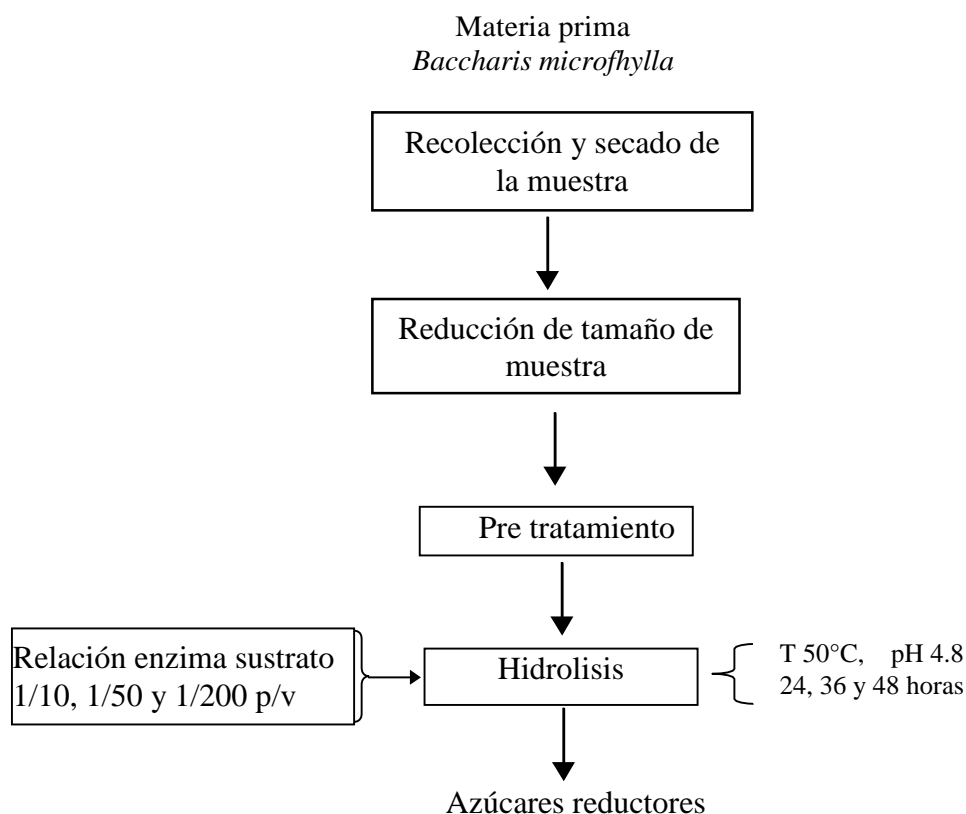
La muestra para el proceso de obtención de etanol se empleó en toda la parte leñosa (tallo, ramas y hoja) de la tayanca (*Baccharis microphylla*) y fue extraída mediante el muestreo aleatorio, para realizar las pruebas necesarias en la obtención de etanol de tayanca (*Baccharis microphylla*).





#### 4.4 Procedimiento

Este proyecto se ejecutó de acuerdo al diagrama de flujo representado en la siguiente figura.



**Figura 5 — Diagrama de flujo para obtener etanol a partir de tayanca (*Baccharis microphylla*)**

##### a) Recolección y secado de la muestra

La planta de tayanca se recolecta de forma aleatoria en el distrito de Huaquirca.

Se secó en estufa a 105 °C por 12 horas hasta alcanzar peso constante y luego se almacena en una bolsa sellada hasta su uso.

##### b) Reducción de tamaño de muestra

Como materia prima se utilizó el tallo, rama y hoja del arbusto tayanca (*Baccharis microphylla*) para ser sometido al proceso de picado (malla N° 3), luego se almacena en una bolsa de 15 Kg de capacidad en un ambiente seco, en las instalaciones del laboratorio de CEMTRAR (Centro modelo de tratamiento de residuos). Las muestras picadas fueron molidas a un tamaño de partícula de 2 mm de largo x 2 mm de ancho en promedio, mediante un proceso de molienda y tamizado con el fin de tener mayor área de contacto, y así facilitar los tratamientos de los análisis siguientes, posteriormente se mantuvo en estufa a 105°C durante 12 horas para eliminar la humedad residual, almacenándose después en bolsas selladas a temperatura ambiente hasta su uso.



**Figura 6 — Tayanca molida**

**c) Caracterización del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*)**

En esta etapa, se utilizó el análisis fisicoquímico establecido por la norma TAPPI que se describen a continuación en la tabla 8

**Tabla 8 — Técnicas analíticas para la caracterización del material lignoceluloso de tayanca (*Baccharis microphylla*)**

Descripción	Técnica
Humedad	Método gravimétrico: 105
Cenizas	Método: NRE/TP-510-42622
Sustancias extraíbles	Alcohol Absoluto Método: NREL/TP-510-42619
Lignina	TAPPI T-222 os-74
Celulosa	TAPPI T-212
Holocelulosa Método del ácido Dinitrosalicílico (D N S )	Norma: ASTMD-1104 Miller (1959)

#### **d) Pretratamiento**

El material lignocelulósico de tayanca fue sometido al pretratamiento de explosión a vapor realizado en un reactor de acero inoxidable. Consiste en un depósito de 10L de capacidad. El reactor tiene una tapa con ocho tornillos en la parte superior en la que también se encuentra una válvula de alivio de presión y un manómetro. La muestra se introduce en el reactor y se cierra la tapa a través de los ocho tornillos que sirven de anclaje con el depósito. El material lignocelulósico fue tratado con vapor saturado a presión alta (a una temperatura entre 160-260 °C con unas presiones correspondientes entre 0,69 a 4,83 MPa) seguidamente la presión fue reducida repentinamente, originando una descompresión explosiva en el material, con esto se logró la separación de los componentes básicos del material lignocelulósico, celulosa, hemicelulosa y lignina, es decir disociar el revestimiento que la lignina y la hemicelulosa forman alrededor de la celulosa y provocar la redistribución de la lignina, quedando la celulosa accesible para la posterior hidrólisis enzimática.

El pretratamiento logró modificar de alguna manera la estructura de la lignina, provocando un hinchamiento en la madera, aumentando el área superficial del material y dejándolo más susceptible al ataque enzimático. (Leyanis, 2010).

#### **e) Hidrólisis enzimática**

La prueba de hidrólisis enzimática del material lignocelulósico de tayanca pretratada por explosión de vapor, se realizó en matraz de Erlenmeyer de 1000 ml de capacidad, el sustrato estuvo sumergido en buffer de citrato para amortiguar la variación de pH, a una temperatura de 50°C y 4.8 de pH, durante 48 horas, condiciones que son óptimas para la operación de la enzima comercial Novozyme. La evaluación de azúcares reductores se realizó para cada 8 horas con la finalidad de determinar el máximo porcentaje liberado en el menor tiempo posible (horas). Las condiciones consideradas se basaron en la ficha técnica de la enzima (Cellic Ctec de Novozyme).

Las pruebas se realizaron utilizando una relación enzima sobre sustrato pretratado (E/S): 1/10 p/v, 1/50 p/v y 1/200 p/v y 50 g base seca de sustrato pretratado.

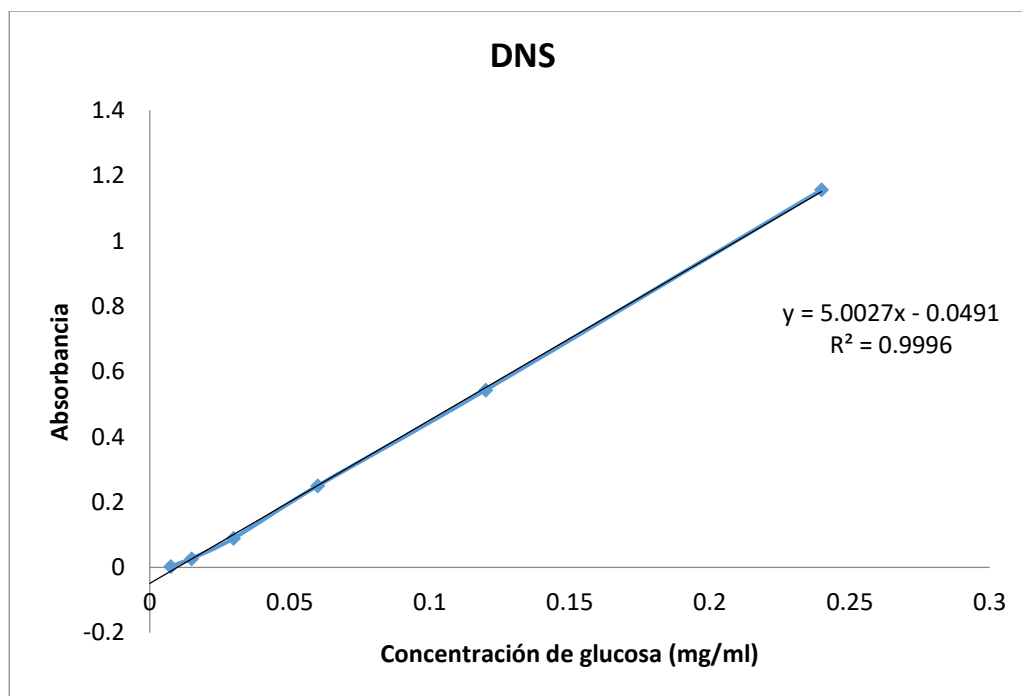
El ensayo se realizó en 48 horas y el parámetro que se consideró fue el de azúcares reductores, a través de los análisis de Miller (1959) modificado.

**f) Determinación de azúcares reductores**

Después del proceso de hidrólisis enzimática, se determinó el contenido de azúcares reductores con el método modificado de Miller (1959).

Se empleó el método DNS la cual se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalisílico (el cual se encuentra de color amarillo naranja) por la glucosa y/o fructosa al ácido 3-amino-5-nitrosalisílico (de color rojo oscuro) (Miller *et al*, 1959), cuya presencia puede detectarse por la lectura de la absorbancia. Este método ha sufrido varias modificaciones a través de los años para adecuarse al análisis de diferentes materiales y su principal ventaja radica en su alta sensibilidad y productividad debido a que es un método espectrofotométrico (Miller *et al*, 1959., River *et al*, 1984).

Este análisis se ejecutó en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental- Biorremediación en la facultad de química de la Universidad Nacional Agraria la Molina.



**Figura 7 — Curva de calibración de azúcares reductores**

#### 4.5 Técnica e instrumentos

##### a) Materia prima

La materia prima utilizada para la investigación fue el tallo, las ramas y las hojas del arbusto tayanca (*Baccharis Microphylla*) proveniente del distrito de Huaquirca, provincia Antabamba departamento de Apurímac.

##### b) Equipos de laboratorio

Se utilizaron los siguientes equipos:

- Balanza de precisión
- Baño María
- Brixometro
- Micropipetas de 0.5 – 10 ul, 20 – 10 ul, 100 – 1000 ul y 1 – 10 ml
- Espectrofotómetro UV/Vis
- Refrigerador
- Estufa
- Molino industrial
- Equipo de explosión de vapor

##### c) Reactivos

Se utilizaron:

- Acido acetico al 10 %
- Acido nitrico concentrado
- Acetato de sodio
- Clorito de sodio
- Alcohol absoluto
- Acido sulfurico al 72 %.
- Hidroxido sodico al 17.5 %
- Clorito de sodio
- Agua destilda
- Ácido 3,5 - dinitrosalicílico  
(DNS)
- Hielo

#### d) Materiales de laboratorio

Se utilizaron los siguientes materiales:

- Tubos de ensayo de 15x250 mm
- Tubos de ensayo de 16 x 100 mm
- Erlenmeyers de 250, 500 y 1000 ml
- Guantes desechables
- Mascarilla descartable
- Vasos de precipitado de 100 y 250
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Probetas de 100 y 1000 ml
- Termómetro de mercurio
- Varilla de vidrio
- Papel aluminio
- Bolsas de plástico
- Tamiz N°3
- brocha
- Papel tisú
- Bombilla
- Pisceta
- Gradillas para tubos de 16 x 100 mm y 15 x 250 mm
- Espátula
- Cinta masking
- Marcador indeleble

#### 4.6 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la producción de azúcares reductores, los datos obtenidos de las variables de respuesta se sometieron al análisis de varianza (ANVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey al 5 % ( $\alpha = 0.05$ ) de significancia con la finalidad de identificar las mejores condiciones de tratamiento.

**Tabla 9 — Diseño factorial 3x 3 para la hidrolisis enzimática de tayanca**

N° de tratamientos	Factores						N° de repeticiones
	Concentración de enzima/sustrato (p/v)			Tiempo de hidrolisis (horas)			
	1/10	1/50	1/200	24	36	48	
T1	1/10			24			3
T2				36			3
T3				48			3
T4	1/50			24			3
T5				36			3
T6				48			3
T7	1/200			42			3
T8				36			3
T9				48			3
Total de ensayos							27

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 5.1 Análisis de resultados

A continuación, se detallan los resultados y discusiones obtenidos en las distintas etapas del presente trabajo de investigación.

##### 5.1.1 Caracterización del material lignoceluloso de tayanca

La tabla 10 muestra la caracterización obtenida del material lignoceluloso de tayanca (*Baccharis micropylla*).

**Tabla 10 — Caracterización del material lignoceluloso de tayanca**

COMPONENTE	PESO (%)
Lignina	22.01
Celulosa	41.46
Hemicelulosa	18.44
Holocelulosa	59.90
Extractos Solubles	11.02
Humedad	5.01
Cenizas	3.95

La tabla 10 muestra la caracterización del material lignoceluloso de tayanca (*Baccharis micropylla*) el cual fue realizado por la técnica TAPPI T-222 OS-74 para la determinación de lignina, que resultó 22.01 %, por la técnica TAPPI T-212 para la determinación de celulosa, que resultó 41.46 % y el porcentaje de hemicelulosa resultó 18.44 %.

No hay datos para la caracterización del material lignoceluloso de tayanca (*Baccharis micropylla*), sin embargo, hay reportes para otras muestras vegetales. En la tabla 3 se muestra el contenido de lignina (22.01%) y celulosa (41.46 %) del material lignoceluloso de tayanca, datos que son aceptables a lo reportado por (Pereira , 2008), para la composición de distintas biomásas lignocelulósicas, quien reportó para lignina (18 – 25) % y para celulosa (40 – 55) %. Por otra parte, el contenido de hemicelulosa contenido en la tayanca (15 %) es menor en comparación con la composición de distintas biomásas lignocelulósicas (24 - 40) % según el mismo autor, por ende, le daría a la planta una desventaja frente a otros materiales respecto a este carbohidrato, ya que dificulta el acceso de las enzimas a la celulosa.



Dentro de las sustancias extraíbles el porcentaje obtenido fue de 11.02 % porcentaje que es distinto a lo reportado por (Sotomayor, 2010) y (Cortinez, 2010) quienes reportan 4,8 % de extraíbles para la composición química del residuo de eucalipto. El porcentaje de humedad es relativamente bajo, 5 %, ya que la muestra es leñosa. En cuanto a las cenizas parte que no puede ser hidrolizada y que fue determinada por el método NRE/TP-510-42622, representa un 3 %, similar a lo reportado por Basile de Castro, (1994) para maderas duras.

### 5.1.2 Pretratamiento

La caracterización del material lignocelulósico de tayanca (*Baccharis microphylla*) después del pretatamiento con explosión de vapor se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11 — Caracterización del material lignocelulósico de tayanca pretratado**

Composición	Sin tratamiento (%)	Pretratado (%)
Lignina	22.01	20.07
Celulosa	41.46	43.32
Hemicelulosa	18.44	15.17
Holoceulosa	59.90	58.49

De acuerdo a los resultados de la tabla 11 el pretratamiento de explosión de vapor generó una ligera variación en la modificación de los componentes del material lignocelulosico de tayanca. El porcentaje de lignina en esta etapa disminuyo de 22 % a 20 %, el porcentaje de celulosa aumento de 41 % a 43 % y el porcentaje de hemicelulosa disminuyo de 18 % a 15 %. Los resultados obtenidos describen lo reportado por (Arellano, 2015) quien afirma que la explosión de vapor genera poca solubilización de materia orgánica. La explosión a vapor no actúa directamente sobre una remoción de la lignina o hemicelulosa, tampoco incrementa significativamente los azúcares reductores. Su acción se enfoca en una alteración de la estructura de la fibra. También se visualiza el cambio que se genera en la estructura del material lignocelulosico como es la superficie abierta y desmenuzada; esto se debe a la eliminación parcial de la hemicelulosa y lignina, haciendo más factible el ataque enzimático. Resultados similares se han encontrado en trabajos con residuos de trigo por (Han *et al*, 2012).

### 5.1.3 Hidrólisis enzimática (formación de azúcares reductores)

La hidrólisis enzimática se realizó haciendo uso del sustrato (fase sólida) obtenido después del pretratamiento por explosión de vapor.

Esta etapa muestra la conversión de azúcares reductores en el tiempo para cada relación enzima sustrato.

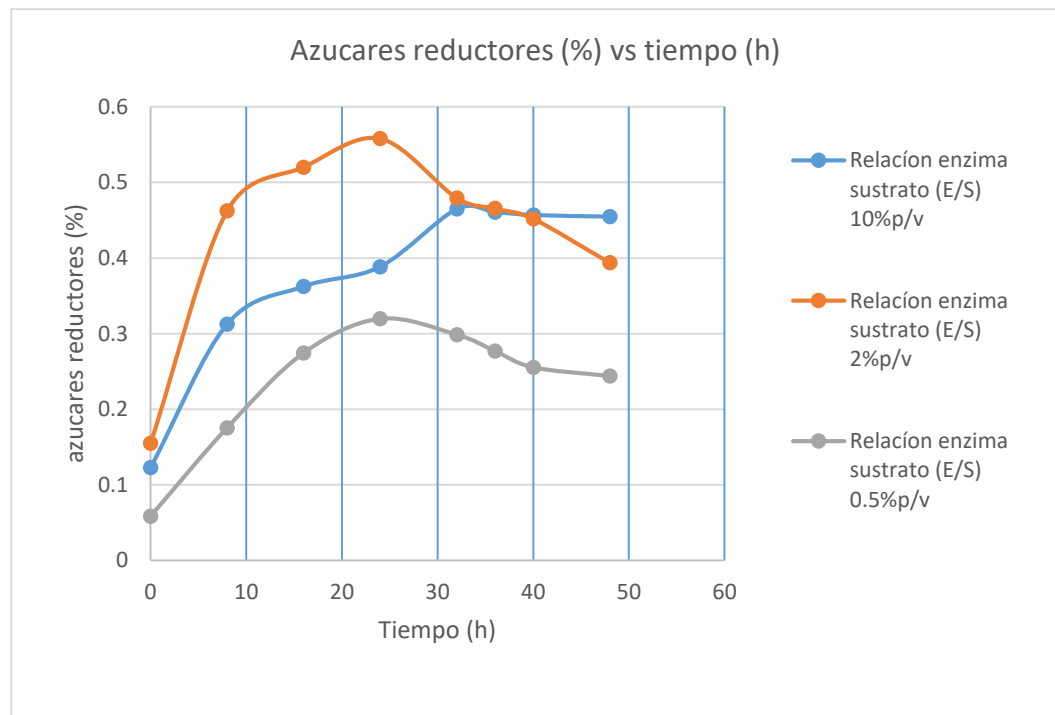


Figura 8 — Formación de azúcares reductores en función al tiempo

Se observa en la figura 8 los niveles de sacarificación, que para cada caso después del tiempo máximo de hidrólisis enzimática, la concentración de estos azúcares empieza a descender.

Estos resultados del tratamiento enzimático reflejan que el material lignoceluloso de tayanca es hidrolizado por la enzima celulasa, ya que ésta ataca la fracción de celulosa para convertirla en azúcares simples en función al tiempo.

#### 5.1.4 Influencia de la relación enzima sustrato y tiempo de hidrólisis en la producción de azúcares reductores

Los resultados de los 09 tratamientos con los promedios correspondientes se muestran a continuación:

**Tabla 12 — Producción de azúcares reductores**

Tratamiento	Relación enzima sustrato (E/S) p/v	Tiempo de hidrólisis (horas)	Azúcares reductores (%)
T1	1/10	24	0.3885 ± 0.010 <sup>c</sup>
T2		36	0.4609 ± 0.002 <sup>b</sup>
T3		48	0.4548 ± 0.004 <sup>b</sup>
T4	1/50	24	0.5581 ± 0.003 <sup>a</sup>
T5		36	0.4657 ± 0.001 <sup>b</sup>
T6		48	0.3938 ± 0.004 <sup>c</sup>
T7	1/200	24	0.4781 ± 0.001 <sup>d</sup>
T8		36	0.2771 ± 0.003 <sup>e</sup>
T9		48	0.2459 ± 0.001 <sup>f</sup>

T= tratamiento; Media ± desviación estándar (n = 3); los superíndices con distintas letras en vertical “a, b, c, d, e, f” representan diferencias significativas (P < 0.05).

La tabla 12 muestra la influencia de la relación enzima sustrato y tiempo de hidrólisis para obtener azúcares reductores a partir del material lignocelulósico de tayanca, los resultados obtenidos se procesaron con el paquete estadístico de InfoStat y se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANVA) con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , el cual indica que los valores experimentales tienen un P menor a 0.05 %. Para la relación enzima sustrato 1/50 p/v en 24 horas se obtuvo 0.5581 mg/ml de azúcares reductores, lo cual indica el mayor porcentaje de azúcares reductores obtenidos; no obstante, este valor para el mismo tiempo de hidrólisis muestra diferencia en cuanto la relación enzima sustrato 1/10 p/v y 1/200 p/v que son 0.3885 mg/ml y 0.4781 mg/ml respectivamente; así mismo, observamos que para todos los tratamientos se obtienen valores similares. La prueba Tukey nos muestra que hay diferencia media estadísticamente significativa entre los tratamientos para el rendimiento (porcentaje de azúcares reductores), ya que se encuentra por debajo del

nivel de significación (P- valor  $< \alpha$ ) es decir, todos los tratamientos producen un rendimiento distinto.

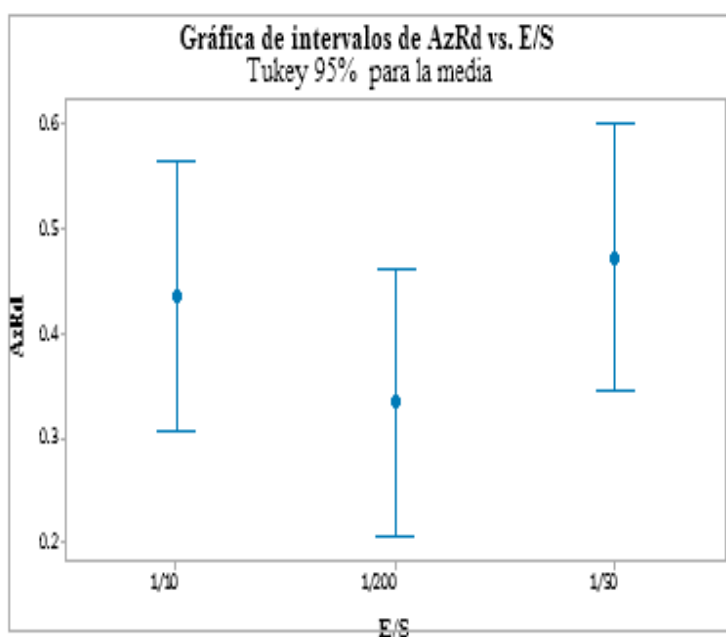


Figura 9 — Intervalo de azúcares reductores vs relación Enzima/Sustrato

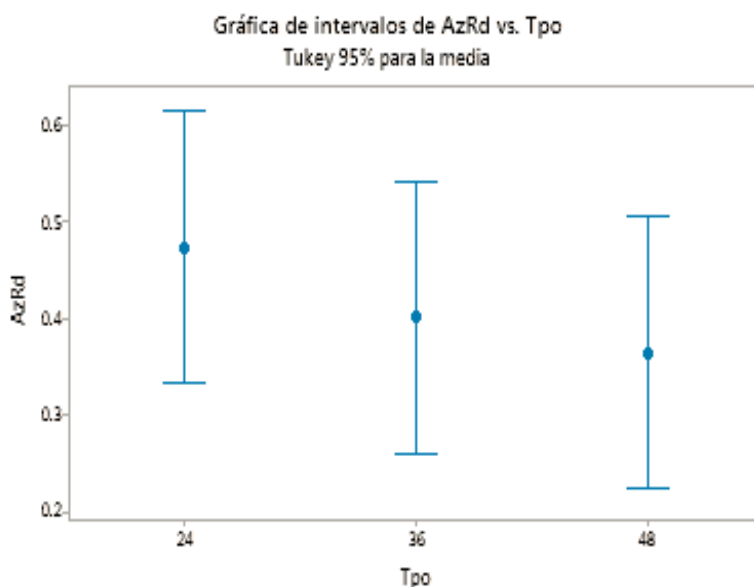


Figura 10 — Intervalos de azúcares reductores vs tiempo

La hidrólisis enzimática genera la ruptura de los polímeros de celulosa y hemicelulosa, para obtener monómeros como glucosa y xilosa (Arismendy *et al*, 2019). No hay datos para el material lignoceluloso de tayanca, sin embargo analizando el ensayo realizado que se muestra en la tabla 5, figura 9 y 10 se demuestra el efecto enzimático siendo

mayor el efecto de hidrólisis enzimática para la relación enzima: sustrato 1/50 p/v en 24 horas de hidrolisis alcanzando una concentración de azúcares reductores de 0.5581 mg/ml; Pasado este tiempo de hidrolisis enzimática, comienza a descender la concentración de estos azúcares, este resultado demuestra poca efectividad de la celulasa para atacar la fracción celulósica y convertirla en azúcares simples, este resultado es inferior a lo reportado por (Apaza y Ramirez, 2021) quienes obtuvieron 15.43 g/L de azúcares reductores para la cascarilla de arroz con una concentración de 30 (% p/p) de enzima en 24 horas de hidrolisis.,. Según (Loja Sánchez, 2017) explica que hasta cierto punto existirá la posibilidad de tener la máxima conversión a monosacáridos, tras esto empieza la variación y disminución en la formación de azúcares reductores, esto puede explicarse debido a la actividad bacteriana que consume los azúcares liberados dando o formando compuestos inhibidores, tales como fulfural y HMF.

En comparación con lo mencionado por Arellano quien reporta mayor concentración de azúcares reductores mediante hidrolisis enzimática de *Pennisetum sp* previo tratamiento alcalino en 4 horas, alcanzando un porcentaje de conversión cercano al 70 % en azúcares reductores (Arellano Perales, 2015) pero el tratamiento alcalino es una desventaja para la fermentación. Además, según Preeti y sus colaboradores para obtener un rendimiento alto en azúcares provenientes de material lignocelulósico, se deben utilizar altas cargas enzimáticas durante la hidrolisis, lo cual refleja un incremento en los costos de operación ( Preeti, *et al*, 2013).

### 5.1.5 Porcentaje de hidrolisis del material lignocelulósico de tayanca

Con la finalidad de determinar el efecto de la hidrolisis enzimática se caracterizó la fibra obtenida después de ser sometida a hidrolisis enzimática. Los resultados se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13 — Caracterización del material lignocelulósico de tayanca sometida a hidrolisis enzimática**

Composición	Antes de hidrólisis (%)	Después de hidrólisis
Lignina	20.07	21.96
Celulosa	43.32	37.83
Hemicelulosa	15.17	16.02
Holocelulosa	58.49	53.85



El porcentaje de celulosa antes de la hidrólisis fue de 43.32 %, el cual disminuyó hasta un 37 % esto refleja la conversión de la celulosa en azúcares. El porcentaje de lignina aumento de un 20 % a un 21 % por lo que se puede afirmar que el ataque enzimático no altero la estructura de la lignina, tampoco fue solubilizada en el medio, las cantidades relativas varían; por eso el aumento del porcentaje de lignina.

La tabla 13 muestra la acción de la enzima celulasas sobre la porción de celulosa para convertirla en azúcares simples.

**Tabla 14 — Porcentaje de hidrólisis del material lignocelulósico de tayanca con relación enzima:sustrato 1/50 (p/v)**

Componente	E/S (p/v)	% Hidrólisis
Celulosa	1/50	12.77
Holocelulosa	1/50	4.89
Hemicelulosa	1/50	-5.60

La tabla 14 muestra el porcentaje de hidrólisis para la relación enzima: sustrato 2 % p/v en 25 horas de hidrólisis enzimática, tal es que el porcentaje de hidrólisis de la celulosa resultó 12.77 %, el porcentaje de hidrólisis de la holocelulosa resulto 4.89 % y finalmente el porcentaje de hidrólisis de la hemicelulosa resulta un valor negativo -5.60 %.

No hay datos para el material lignocelulósico de tayanca, según los resultados de la tabla 6 el porcentaje de celulosa antes de hidrólisis fue de 43 %, el cual disminuyó hasta un 37 % esto refleja la poca transformación de celulosa en azúcares, en este caso se entiende que el 6 % de disminución en celulosa tiene como resultado la conversión en azúcares reductores. El porcentaje de lignina aumento de 20 % a 21 % lo cual indica según lo reportado por (Arellano, 2015), que el ataque enzimático no altero la estructura de la lignina y menos aún fue solubilizada en el medio. El incremento se puede explicar por la disminución de celulosa en la muestra, haciendo que el porcentaje de lignina se incremente relativamente.

Los resultados de la tabla 14 muestran el porcentaje de hidrólisis de la celulosa que resultó 12.77 %, holocelulosa 4.89 % y hemicelulosa -5.60 %, también en este caso se podría decir que las cantidades relativas varían; de ahí se puede entender la disminución del porcentaje de hemicelulosa.



Según Kim y colaboradores refieren que existe una reducción en el porcentaje de producción de azúcares reductores en el tiempo como consecuencia a la inhibición por la generación del producto final (celobiosa y glucosa). Estos inhibidores pueden ser azúcares solubles, ácidos orgánicos, furanos y compuestos fenólicos, los cuales generan una inactivación de la celulosa, reduciendo la tasa de producción y el rendimiento de azúcares en el tiempo. (Kim, *et al*, 2011). Esto explicaría hasta qué punto existe la posibilidad de tener la máxima conversión de celulosa a monosacáridos, ya que alcanzando el punto máximo empieza el declive en la formación de azúcares reductores. Esto puede deberse a la actividad bacteriana que consume los azúcares liberados, y la formación de compuestos inhibidores, tales como fulfural y hidroximetilfulfural (HMF) a partir de xilosa y glucosa. Algunos autores explican que en una hidrólisis ácida para el tallo de maíz, la poca carga del sólido hace que, el ácido pueda acceder a la estructura cristalina de la muestra tempranamente, transformando la glucosa en 5 hidroximetilfulfural que es un inhibidor (Palmqvist, 2000).



## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 Conclusiones

- En esta tesis se determinó las características fisicoquímicas del material lignoceluloso de tayanca (*Baccharis microphylla*) el cual está constituido por 43.32 % de celulosa, 15.17 % de hemicelulosa y 20.07 % de lignina.
  
- En esta tesis se evaluó el efecto de la hidrólisis enzimática sobre el material lignoceluloso de tayanca (*Baccharis microphylla*) para obtener azúcares reductores, en el que se pudo obtener un bajo porcentaje de azúcares fermentables ya que el contenido de celulosa de tayanca tuvo menor grado de hidrólisis que no es suficiente para obtener etanol.
  
- En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto de la relación enzima sustrato y el tiempo de hidrólisis sobre el porcentaje de hidrólisis del material lignoceluloso de tayanca (*Baccharis microphylla*) para la obtención de azúcares reductores, en el que el mayor porcentaje de azúcares fermentables resultó 0.5581 mg/ml obtenida con la relación enzima sustrato (E/S) 1/50 p/v en 24 horas, el cual representó una mayor transformación del material lignoceluloso en azúcares, con respecto a la relación enzima sustrato (E/S) 1/10 y 1/200 p/v. El porcentaje de hidrólisis alcanzado en el presente trabajo fue de 12.77 % para celulosa y 4.89 % para holocelulosa.

#### 6.2 Recomendaciones

- Ampliar estudios de hidrólisis enzimática para materiales lignoceluloso y así poder comparar el presente estudio de forma más realista.
  
- Es recomendable evaluar el componente del aceite esencial de tayanca.





## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Abril, Alejandro y Navarro, Enrique. 2012.** Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Venecia : Atelta, 2012. pág. 101.

**Aguado Alonso, Lourdes, Romero Díaz, José y Rodríguez Mayor, María Dolores. 2005.** Hidrólisis de celobiosa con Beta-glucosidasa inmovilizada. Editorial Universidad Complutense. Madrid : s.n., 2005.

**Akhtar, A. 2008.** Ethanol from cellulose : A technology that could spell disaster What is cellulosic ethanol ? [ed.] Retrieved from. s.l. : Fuel, 2008.

**Alemdar A y Sain M. 2008.** Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues—Wheat straw and soy hulls. s.l. : Bioresource technology, 2008.

**Álvarez Maciel, Carlos. 2009.** Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. 2009. págs. 64-88.

**Alvira, y otros. 2010.** Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis. [ed.] Bioresource Technology. 2010. 101:4851-4861.

**Alvira, P, y otros. 2010.**

Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. s.l. : Bioresource Technology, 2010. 101, 4851- 4861.

Aprovechamiento del bagazo de piña para obtener celulosa y bioetanol.

**Antonio Cruz, Rocio , y otros. 2011.** Mexico : s.n., 12 de Abril de 2011, Afinidad LXVIII.

**Area, Maria Criatina. 2015.** Diagrama de la estructura física de los materiales lignocelulósicos. Misiones : s.n., 2015.

**Arellano Perales, Carla. 2015.** Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática. universidad veracruzana . veracruz : Oriba, ver, 2015. programa de posgrado.



**Balat, M. 2011.**

Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. [ed.] Energy Conversion and Management. 2011. 52:858-875.

**Balat, Mufast. 2011.** Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical. [ed.] Energy conversion and Management. 2011. 52:858-875.

**Barrios Caballero, Roger Joaquín. 2014.** Obtencion de azucars reductores por hidrolisis térmica a la piña del Agave Americana L., a utilizarse en la produccion de una bebida destilada. Apurímac, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Abancay : s.n., 2014.

**Barrios Hernández, E. 2014.** Alternativas de obtención de etanol a partir de paja de caña. s.l. : s.l, 2014. págs. 1-59.

**Basile de Castro, F. 1994.** The use of steam treatment to upgrade lignocellulosic materials for animal feed. University of Aberdeen. 1994. thesis submitted for the degree of doctor of philosophy.

**Bell Garcia, Antonio , y otros. 2012.** *Obtencion de bioetanol a partir de biomasa lignocelulosica.* 2012. págs. 7 - 16.

**Bellido, C, y otros. 2011.** Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol. s.l. : Technol, 2011. 102, 10868–10874.

**Binod, Parameswaran., K.U. and Raveendran Sindhu, Ashok. 2011.** Hydrolisis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. In Biofuels, ed., Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes. 2011.

**Buendia, Victor Hugo. 2013.** Obtención de azúcares por hidrólisis ácida y ensayos metanogénicos a partir de *Jatropha curcas* L. y *Pennisetum* sp. Oroziba : s.n., 2013.

**Cardona, Eliana M., Rios, Jorge A., De Peña, Juan, and Rios, Luis A. 2013.** Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum* sp) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la producción de Bioetanol. 2013. 24,5, 669-80.

**Carmona, R. 2007.** Transformaciones bioquímicas de la biomasa. Universidad de Chile, Santiago de Chile : 2007.



**Carreón Rodríguez., Ofelia Edith., Ramos López., Andrea., Centeno Leija, Sara., Leal Reyes., Laura Julieta., Martínez Jiménez, Alfredo., and Fernández Sandoval., Marco Tulio. 2009.** Etanol Carburante . 2009.

**Castillo Vázquez, Nidia., Siqueiros, Tania., and Rascón Cruz, Quintín. 2011.** Biocombustibles: estrategias limpias para combatir la crisis energética. 2011. Vols. V,2.

**Chen D, y otros. 2012.** Biocomposites reinforced with cellulose nanocrystals derived from potato peel waste.

**Cortínez Villalobos, Victoria Andrea. 2010.** Comparación de pre-tratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. Santiago, Chile : s.n., 2010. pág. 133 h, Tesis (Magíster en Ciencias, mención Química).

**Cortínez Villalobos, Victoria Andrea. 2010.** Comparación de pre-tratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Santiago, Chile : s.n., 2010. pág. 133, Tesis (Magíster en Ciencias, mención Química).

**Cortínez, V. 2010.** Comparación de Pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación. 2010. pág. 122.

**Cuevo, y otros. 2009.** Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etano. 2009. págs. 13-3.

**Cunningham, Roberto y Lopez, Gerardo. 1994.** Etanol de Lignocelulósicos Tecnología y Perspectiva. Santiago de Compostela : CYTED, 1994.

**De Bari, I, y otros. 2013.** Bioethanol production from mixed sugars by *Scheffersomyces stipitis* free and. 2013. 30,591-597.

**Demers., Alexander., Doane., Richard., Guzman., Scott., and Pagano, Ryan., 2009.** Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass for the Production of Second Generation Biofuels. 2009.



**Díaz Sánchez, Nallely. 2013.** Obtención de bioetanol a partir de diversos residuos lignocelulósicos mediante el uso de cepas *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*. s.l. : Orizaba, 2013.

**Díaz, Marquina y Martínez, Donimigo y Flores, Jose. 2005.** Producción de Biomasa de Hongos Celulolíticos para la degradación de residuos celulósicos. Madrid : Editorial Universidad Complutense, 2005.

**Energía, Ministerio de.** The Use of Energy Statistics to Estimate CO2 Emissions.

**Escobar, J C, y otros. 2009.** “Biofuels: Environment, technology and food security”, Renewable and Sustainable. 2009. págs. 1275- 1287. Vol. 13.

**Espinoza Alvarado, Segundo Victor. 2015.** Obtención de alcohol etílico a partir del almidón de banano (*Cavendish gigante*) en la provincia de el Oro, el Guabo, 2014. El Guabo : s.n., 2015.

**García Aparicio, P., Ballesteros, I.,**

**González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Negro, M.J.,. 2006.** “Effect of inhibitors released during steam explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis.” . 2006. 129, 278-288. .

**García Martín, y otros. 2010.** Producción de bioetanol a partir del residuo de la poda del olivo. 2010.

**García, A E. 2010.** Energía a base de biomasa y su disponibilidad. . Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. P.p., s.p. . Santiago : s.n., 2010.

**Giovanni Cortés, William. 2014.** Estructura de la biomasa lignocelulosa. Colombia : s.n., 2014.

**Gonzales Jurado, Yurany Andrea y Villada Villada, Cristian David. 2018.** Obtención de etanol celulósico a partir de la variedad de pasto *Pennisetum caldestinum*. Bogotá : s.n., 2018.

**Guevara, Carlos., Arenas, Héctor., Mejía, Alexander., and Peláez, Carlos.,. 2012.** Obtención de Etanol y Biogás a Partir de Banano de Rechazo. 2012.



**Guimarães, P, M, R., Teixeira, J, A., and Domingues, L.,. 2010.** Fermentation of lactose to bio ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. s.l. : iotechnology advances,, 2010. Vol. 3. 28, 375-384..

**Han, L, y otros. 2012.** Alkali pretreated of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. 2012. 43,53-61.

**Herrera, A, y otros.**

“Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure.” . 63, 106-109.

**Himmel, M.E., Adney, W.S., Baker, J.O., Elander, R., Mc Millan, J.D., Nieves, R.A., Sheehan, J.J., Thomas, S.R., Vinzant, T.B., Zhang, M.,.**

**1997.** “Advanced Bioethanol Production Technologies: A Perspective.”.

1997. ACS Symposium Series 666, 2-45. .

**Houbron, E., Rustrían, E., Barrera Bernal, C., and Reyes, C.,. 2012.** Cheese whey for ethanolproduction by different Kluyveromyces and Saccharomyces yeasts. In FourthIn Fourth. Venecia : CISA Publisher, 2012.

**Hsu, C L, y otros. 2012.** Comparison of batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production. 2012. 97,166-173.

**Iglesias, M. 2001.** *comunicacion personal. 2001.*

—. **2011.** *comunicación personal. 2011.*

**Iranzo Gutiérrez, silvia. 2016.** Energia y riesgo-pais: ¿permite la explotacion de energías fósiles mejorar las calificaciones de riesgo-pais? Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, España : Cuadernos Economicos I.C.E., 2016.

**Juri, Awad y Sebastian, Andres. 2011.** Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pre-tratamientos alternativos: líquidos Iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca. santiago-chile : s.n., 2011. pág. 76. Memoria (Ingeniero Civil en Biotecnología). .

**Kim, Y, y otros. 2011.** oluble inhibilors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. 2011.

**Leyanis Mesa, E G. 2010.** An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. 2010. 85:1092-1098.

**Lipa Quispe , Fredy y Paucar Quispe, William. 2015.** *Caracterización farmacobotánica y evaluación genotóxica del extracto acuoso de dos especies de Baccharis (Asteraceae).* Cuzco : s.n., 2015.

**Loja Sánchez, Carlos Patricio. 2017.** “Optimización de los residuos de cascarilla de arroz mediante pretratamiento por hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores”. Ecuador : s.n., 2017.

Los biocombustibles. **Salinas Callejas, Edmar., Gasca Quezada, Víctor., 2009.** México : el cotidiano, 2009, el cotidiano, págs. 75-82.

**Lynd, L, y otros. 2017.** Extracción de azúcares reductores totales ART por métodos físicos y químicos de planta de Zea mays (Poaceae) "maíz amarillo duro". Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo : s.n., 2017. 2413-3299.

**Manuales sobre energía renovable, BIOMASA. 2002.** fortalecimiento de la capacidad en Energía Renovable para América Central. 2002.

**Martin, Carlos y Jonsson, Leif. 2003.** Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. 2003. 32:386-395.

**Mateus Fonlecha, Lady. 2011.** Evaluación de los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido y AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante "*Pennisetum sp*". Bogotá : s.n., 2011.

**Maurya, Devendré P., Singh, Dhananjay, Pratap, Durgesh, and Maurya, Jitendra P. 2012.** Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. 2012. 33, 55-58..

**McKendry, Peter. 2002.** *Energy production from biomass (part 1) : overview of biomass.* s.l. : bioresource technology, 2002. 83:37-46.

**McMillan, J D. 1994.** *Pretreatment of lignocelluloses biomass.* DC: American Chemical Society Symposium. Washington, : s.n., 1994. 292-324.



**Medina Morales, Miguel, y otros. 2011.** *Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. 2011.*

**Merino, S y Cherry, J. 2007.**

Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2007. 108,95- 120.

**Merino, S y Cherry, J. 2007.**

Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. 2007. 108,95- 120.

**Miller, G L y Anal. 1959.** s.l. : Chem, 1959. 31,426.

**Minas, Ministerio de Energía y. 2016.** Guía de Orientación del Uso Eficiente de la Energía y de Diagnóstico Energético. Dirección General de Eficiencia Energética;, Lima, Perú : 2016.

**Miniaterio de erengía. 2011.** The Use of Energy Statistics to Estimate CO2 Emissions.

**Montaño Morales, Héctor Fabio. 2014.** Producción de Bioetanol a Partir de Material Lignocelulósico de Moringa Oleífera. colombia : s.n., 2014. 3.

**Monte, J.R., Brienzo, M., Milagres, A.M.F.,. 2011.**

“Utilization of pineapple stem juice to enhance enzymolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide.” . 2011. 88, 403-408. .

**Mosier N, W C, y otros. 2005.** Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. [ed.] Bioresour Technol. 2005. 96: 673–686..

**Mussatto, Solange, y otros. 2008.** Effect of hemicellulose and linnin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewers epent grain. 2008. 43:124-129.

**Narvaes, Negro y Martin, Maria. 2006.** Degradacion Enzimatica de la biomasa de onoportdum nervosum bois. Madrid : Editorial Universal Complutense, 2006.

**Navarro Perez, Luz del Carmen y Avedaño Reyes, Sergio. 2002.** flora util de municipio de Astacinga. veracruz : s.n., 2002. 1405-2768.

**Navarro, Alejandro Abril y Enrique A. 2012.** etanol a partid de biomasa lignocelulosica. València : Aleta Ediciones, 2012.



**Navarro, Alejandro Abril y Enrique, A. 2012.** etanol a partir de biomasa lignocelulosica. València : Aleta Ediciones, 2012.

**Niklitschek Contente, Tomás Andrés, y Niklitschek Contente, Tomás Andrés Andrés. 2011.** Selección de condiciones de fermentación de residuos de. chile : s.n., 2011.

**Nikltschek. 2010.** Selección de Condiciones de fermentación de residuos de lenga para laproducción de bioetanol. Santiago -chile : s.n., 2010.

**Olson, Lisbeth, Hahn y Hagerdal, Barbel. 1996.** Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol producción. [ed.] Enzyme and Microbial Technology. 1996.

**Otero Rambla, Miguel A., García, Roxana., Pérez, Maria C., Martínez, Julio A., Vasallo, Maria C., Saura, Gustavo., and Bello, Daniel. 2009.** Producción de bioetanol a partir de mezclas de jugos-melazas de caña de azúcar . 2009.

**Ovadon y Chacon. 2005.** SL and Waliszewski, KN. Commercial cellulases preparations and their applications in extractives processes. 2005. págs. 111-120.

**Palmqvist, E y Hahn-Hägerdal, B. 2000.** Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. 2000. 74(1), 25-33.

**Pereira , J R. 2008.** Biomass of lignocellulosic composition for fuel etanol production within the context of biorefinery. Escuela de Química. Río de Janeiro : s.n., 2008.

**Pérez, J.A., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Manzanares, P., 2007.** “Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor.” . San A ndrés : s.n., 2007. 82, 929-938. .

**Pérez, Ballesteros I, y otros. 2008.** Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. s.l. : Fuel, 2008. 87:3640-3647.





**Pezoa Conde, Ricardo Miguel. 2010.** Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidosiónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Santiago de Chile : 2010.

**Preeti B, Subhedar y Parag R, Gogate. 2013.** *Intensification of Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose Using Ultrasound for Efficient Bioethanol Production: A Review. 2013. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos.*

**Sánchez Riaño, A M, y otros. 2010.** Revista Tumbaga : s.n., 2010.

**Rado Janzic.** Etnobotánica del distrito de Ocongate-Quispicanchis-Cusco. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco- Facultad de Ciencias Biológicas, Cusco, Quispicanchi : s.n.

**Rado Janzic, Bryan Edmundo. 2011.** Etnobotánica del distrito de ocongate quispicanchi - Cusco. Cusco : s.n., 2011. págs. 129-131.

**Rangel, Sandra. 2012.** Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulólicas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Colombia : s.n., 2012.

**Reyes, Luis Carlos. 2012.** Producción de etanol por fermentación de suero de quesería con levaduras del género *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*. s.l. : Xalapa, 2012.

**River, D B, y otros. 1984.** *Biotechnol and Bioeng.* 1984. 26,800.

**Rodríguez García, Sabrina De Los Milagros . 2015.** Tracción y caracterización de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica de caña de azúcar (*Saccharum Officinarum L.*). Pura : s.n., 2015.



**Rodríguez Droguett, Cristian Eduardo. 2012.** Efecto del uso de mezclas de lignocelulosas sobre la producción de etanol de segunda generación. universidad de chile, Santiago de Chile, Chile : 2012.

**Rubin, E M. 2008.** Genomics of cellulose biofuels. s.l. : Nature, 2008. págs. 844-845. Vol. 4.

**Sakamoto, y otros. 2012.** Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulosic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. 2012.

**Salcedo, Jairo, Lopez, Jorje y Flores, Luz Marina. 2011.** Evaluation of enzymes for the hydrolysis of waste (leaves and top cane) from the harvest of sugar cane. Dyna : s.n., 2011. 182-190.

**Salinas Callejas, Emar y Gasca Quezada, Victor. 2009.** los biocombustibles . Mexico : el cotidiano, 2009.

**Sanchez Ortiz, Alejandra. 2015.** Síntesis de nanopartículas derivadas de biopolímeros extraídos de biomasa por métodos térmicos. Universidad Autónoma de Nuevo León - Facultad de Ciencias Químicas, Nuevo León : 2015.

**Sanchez Riaño , A M, y otros. 2010.** Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. Tolima : s.n., 2010.

**Sánchez Riaño, A.M., Gutiérrez Morales, A.I., Muñoz Hernández, J.A., and Rivera Barrero, C.A. 2010.** Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. tumbaga : s.n., 2010. 5, 61-69.

**Sotomayor Aravena, Roberto Carlos. 2010.** Estudio exploratorio de producción de bioetanol y de coproductos de biorefinería a partir de residuos de eucalipto. Memoria (Ingeniero Civil Industrial y en Biotecnología). Facultad de Ciencias Físicas y , Universidad de Chile Matemáticas. santiago, chile : s.n., 2010. pág. 155 h.



**Strnberg, K, y otros. 2000.** Effect of substrate and cellulose concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steampretreated softwood for ethanol production. 2000. 205-210.

**Sun, Y y Chen, J. 2002.** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review (en línea). 2002. 83(1):1-11.

**Sun, Ye y Cheng, Jiayang. 2002.** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. s.l. : Bioresource technology, 2002. 83:1-11.

**Tabil L, Adapa P y Kashaninejad M. 2011.** Biomass feedstock pre-processing–part 1: pretreatment Biofuel's Engineering Process Technology.

**Tappi., Technical Association of the Pulp and Paper Industries., 2000.** *TAPPI Test Methods* . s.l. : Atlanta, 2000. págs. 2000-2001.

**Teherzadeh, Mohammad, y otros. 1999.** Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. [ed.] *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999. 87:169-174.

**Tomas, Pejo y E. 2009.** Bioetanol de paja de trigo: Estrategias de. Madrid : s.n., 2009.

**Ulbricht., R J, Northup, S J y Thomas, J A. 1984.** *A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. 1984. 4(5),843-853.*

**Vazquez y Dacosta. 2007.** Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. 2007. 8:249-259.

**Villers Ruiz, Lourdes y al, et. 2006.** Guía botánica del parque Nacional Malinche. Tlaxacala-puebla : s.n., 2006. 970-32-1844-x.



**Villers Ruiz, Lourdes y et al. 2006.** Guia botánica del parque Nacional Malinche. Tlaxacala - puebla : s.n., 2006. 970-1844-x.

**Voet, Donald and Voet, Judith G. Bioquímica. 2006.** Bioquímica. s.l. : Medica Panamericana, 2006.

**Zhai, Dongmei, y otros. 2012.** Ethanol production from nondetoxified dilute acid lignocellulosic hydrolysate by cocultures of *Saccharomyces cerevisiae* Y5 and *Pichia stipitis* CBS60054. [ed.] Biotechnology Research International. 2012. 2012:1-6.

**Zhao, X., Chen, K., Liu, D.,.**

**2009.** “Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis.”. 2009. págs. 815-827.

## ANEXOS



Anexo 01 Acondicionamiento de la materia prima

a) Secado y reducción de tamaño

Tabla 15 — Materiales, equipo y reactivo

Materiales	Equipos	Reactivos/sustancias
Molino Tamiz Brocha	Estufa	Tallo, ramas y hojas de la tayanca

Como materia prima se utilizó el tallo, rama y hoja de la tayanca que fue recolectada en el distrito de Huaquirca. Se utilizó un tamaño de partícula de 5 mm en promedio mediante un proceso de molienda y tamizado con el fin de tener mayor área de contacto, y así facilitar los tratamientos de los análisis siguientes, posteriormente se mantuvo en estufa a 105°C durante 12 horas para eliminar la humedad residual, almacenándose después en bolsas selladas a temperatura ambiente hasta su uso.



Figura 11 — Proceso de secado y molienda de la muestra

b) Determinacion de humedad

Método Gravimetrico (diferencia de peso)

Tabla 16 — Materiales, equipo y reactivos

Materiales	Equipos	Reactivos/sustancia
Placa petri Pinzas metalicas	Estufa Balanza analítica	Tayanca molida

**Procedimiento:**

- Determinar el peso de una placa petri vacía
- Pesar 5 g de muestra en la placa petri y registrar el peso.
- Colocar en la estufa a ( 105 +/- 3) °C durante 24 horas.
- Enfriar en el desecador y pesar la placa contenida de muestra.
- Calcular la humedad
- Realizar la prueba por duplicado

**Interpretacion del resultado:**

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Muestra húmeda} - \text{Muestra seca}}{\text{Muestra húmeda}} * 100$$



**Figura 12 — Determinación del peso de la muestra seca**

**c) Detreminación de cenizas**

Método basado en el procedimiento NREL/TP-510-42622

**Tabla 17 — Materiales, equipo y reactivos**

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos/sustancias</b>
- crisol de porcelana	- Placa calefactora	- Tayanca molida
- pinza metálica	- Mufla	
- espátula	- Desecador	
	- Balanza analítica	

**Procedimineto:**

- Secar el crisol de porcelana en la mufla a 500° C durante 5 horas.
- Deterinar el peso del crisol de porcelana luego de haberlo enfriado en el desecador.
- Pesar 1 gramo de muestra y colocar en el crisol.



- Colocar en la plancha calefactora el crisol con muestra para que se caliente moderadamente durante 30 minutos.
- Poner a maxima potencia la placa calefactora para que la muestra se carbonice por completo hasta que ya no se produzca humo.
- Colocar en la mufla la muestra carbonizada a 575°C por 24 horas.
- Enfriar en el desecador y pesar.
- Determinar cenizas.
- Determinacion por dulpicado.

**Interpretacion del resultado:**

$$\% \text{ cenizas} = \frac{\text{Peso ceniza}}{\text{Peso muestra original}} * 100$$



**Figura 13 — Determinación de cenizas**

**d) Determinacion de sustancias extraibles**

El alcohol absoluto es un disolvente orgánico polar volátil que puede ser usado en el extractor de Soxhlet, permite disolver compuestos secundarios presentes en la biomasa lignocelulósica.

Metodo: la determinacion de extractivos en biomasa se realiza en base al procedimiento de NREL/TP-510-42619.



Tabla 18 — Materiales, equipo y reactivos

Materiales	Equipos	Reactivos/sustancias
- Matraz de bola 250 ml	- Estufa	- Alcohol absoluto
- Probeta de 100 ml	- Placa calefactora	- Agua destilada
- Refrigerante	- Extractor soxhlet	- Tayanca molida.
- Dedal	- Balanza analítica	
- Capsula de porcelana		
- Desecador		
- Luna de reloj		
- Espatula		

**Procedimiento:**

- Determinar el peso de una capsula vacia.
- Pesar 8.5 g de muestra y colocarlo en el dedal.
- Medir 175 ml de agua destilada y colocarlo en el matraz a la vez introducir el dedal en el extractor soxhlet.
- Encender la placa calefactora y desde la ebullicion esperar a que se den 4 sifonamientos.
- Desechar el agua contenida en el matraz y medir 175 ml de alcohol absoluto y colocarlo en el matraz para realizar 4 sifonamientos mas, es decir se tiene un total de 8 sifonamientos, el color de extracto de la muestra que se visuaiza debe desaparecer.
- Colcar la muestra sin extracto en la cápsula previo peso conocido.
- Realizar algunos lavados con agua destilada a la muestra sin extracto.
- Secar la muestra en una estufa a 105 °C hasta tener peso constante y enfriar en el desecador.
- Pesar la capsula con muestra sin extracto.
- Deterinar el porcentaje de extractos solubles.
- Realizar el ensayo por duplicado.

**Interpretacion del resultado:**

$$\% \text{ extractos} = \frac{\text{Peso muestra original (g)} - \text{Peso muestra libre de extracto (g)}}{\text{Peso muestra original(g)}} * 100$$





**Figura 14 — Determinación de extractos**

**e) Determinación del porcentaje de lignina**

El método usado corresponde con la norma TAPPI 222. El método de Hidrolisis Ácida Cuantitativa practica una hidrolisis de dos etapas: la primera con ácido sulfúrico que hidroliza los polisacáridos en oligosacáridos y una segunda que rompe los oligómeros en monosacáridos.

Método: Basado en la norma TAPPI T-222 OS-74, (Honorato & Hernandez, 1998).

**Tabla 19 — Materiales, equipo y reactivos**

Materiales	Equipos	Reactivos / sustancias
- Vaso de precipitado	- Balanza analítica	- Muestra de tayanca molida libre de extractos.
- Matraz de 500 ml	- Esufa	- Ácido sulfúrico al 72 %.
- Refrigerante		- Agua destilada.
- Baño maría		
- Crisol tipo gooch		

Procedimiento:

- Pesarse 1g de muestra libre de extractos y colocarse en un vaso de precipitado.
- Añadir 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 % manteniéndose en agitación y en baño maría a (20 +/- 1) °C, aproximadamente 2 horas hasta que se observe la muestra oscura.
- Transferir el contenido a un balón de destilación
- Añadir 560 ml de agua destilada caliente para obtener H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 4 %.

- Armado el refrigerante llevar a ebullicion durante 4 horas (reflujo).
- Decantar la muestra ubicando el balón en posición algo inclinada.
- Armar el sisitema filtrante y filtrar.
- Determinar el peso del filtro gooch # 3
- Lavar el residuo solido con agua destilada caliente.
- Secar en una estufa a 105 +/- 3°C hasta tener peso constante.

El procedimiento se hace por duplicado.

Según la norma TAPPI T-222 la preparacio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 % se prepara añadiendo 665 ml de acido sulfurico concentrado sobre 300 ml de agua destilada suavemente, postrior a ello se afora con agua destilada hasta 1000 ml.

**Interppretacion del resultado:**

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Peso residuo seco (g)}}{\text{Peso muestra original libre de extracto (g)}} * 100$$

f) **Determinacion del porcentaje de celulosa**

Método basado en la norma TAPPI T-212

**Tabla 20 — Materiales, equipo y reactivos**

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos / sustancias</b>
- Matraz de 250 ml	- Balanza analitica	- Muestra de tayanca molida
- Baño Maria	- Estufa	libbre de extractos
- Filtro Gooch # 3 (porosidad media)		- Hidroxido sodico al 17.5 %
		- Acido acetico al 10 %
		- Agua destilda

**Procedimiento :**

- Pesar 1g de muestra libre de extracto y colocar en un matraz de 100 ml
- Añadir 10 ml de hidroxido sodico al 17.5 % agitar y dejar reposar en baño Maria a (25 +/- 1) °C por 5 minutos.
- Añadir 5 ml de de NaOH al 17.5 5 % agitar y dejar reposar en baño Maria a (25 +/- 1) °C por 30 minutos.



- Añadir 30 ml de agua destilada, agitar y dejar reposar en baño María a (25  $\pm$  1) °C durante 1 hora.
- Una vez pesado el filtro Gooch # 3, pasar la solución por el mismo (filtrar)
- Lavar el residuo sólido con 30 ml de agua destilada y luego con 25 ml de NaOH al 17.5 %.
- Lavar el residuo sólido con 30 ml de agua destilada
- Añadir al residuo sólido 15 ml de ácido acético al 10 % y reposar por 30 minutos.
- Lavar el residuo sólido con 50 ml de agua destilada.
- Secar el residuo sólido en una estufa a 80  $\pm$  5°C hasta tener peso constante.
- Enfriar en un desecador y pesar.

El procedimiento se realiza por duplicado

**Fórmula:**

$$celulosa = \frac{\text{peso seco residuo (g)}}{\text{peso muestra original libre de extracto (g)}} * 100$$



**Figura 15 — Determinación de celulosa**

**g) Determinación del contenido de holocelulosa**

La determinación de holocelulosa permite determinar de manera indirecta el contenido de hemicelulosa por diferencia con la celulosa.

Método basado en la norma ASTM 1104-56.

Tabla 21— Materiales, equipo y reactivos

Materiales	Equipos	Reactivos / sustancias
- Matraz de 500 ml	- Balanza analitica	- Muestra de
- Baño Maria	- Estufa	tayanca molida
- Filtro Gooch # 40 (diametro 8 µm)	- Placa calefactora	libbre de extractos
- Pipeta		- Acido acetico al
- Pera		10 %
- Proveta		- Clorito de sodio
		- Agua destilda
		- Hielo

**Procedimiento:**

- Pesar 2 g de muestra libre de extractos y colocarlo en un matraz de 500 ml.
- Añadir 160 ml de agua destilada, 1g de clorito de sodio y 0,2 ml de ácido acético glacial, en un baño de agua entre (70-80) °C, esperar una hora.
- Añadir nuevamente 1g de clorito de sodio y 0,2 ml de ácido acético glacial, manteniendo la temperatura indicada. Realizar esta acción por lo menos tres veces durante mínimo tres horas, hasta que la muestra se torne blanca.
- Esperar una hora tras la última adición y enfriar en un baño de hielo a 10°C.
- Filtrar con papel filtro número 40 y hacer un lavado con 500 ml de agua destilada fría.
- Recoger el residuo en una cápsula de porcelana previo peso conocido y secar una estufa a 105+/-3 °C durante 4 horas, hasta peso constante.

Interpretación del resultado:

$$\% \text{ Holocelulosa} = \frac{\text{peso del residuo seco (g)}}{\text{peso muestra original libre de extractos (g)}} * 100$$



**Figura 16 — Determinación de holocelulosa**

Donde la detrminnacion de hemicelulosa se realiza por simple diferencia.

$$\text{HOLOCELULOSA} = \text{CELULOSA} + \text{HEMICELULOSA}$$

Por lo tanto,

$$\% \text{HEMICEULOSA} = \% \text{HOLOCELULOSA} - \% \text{CELULOSA}$$

## Anexo 02 Pretratamiento

El material lignocelulósico de tayanca fue sometido al pretatamiento de explosión de vapor que se llevó a cabo en un reactor de acero inoxidable. Consiste en un depósito de 10L de capacidad. El equipo dispone de una tapa con ocho tornillos en la parte superior donde se encuentra situada una válvula de alivio de presión y un manómetro.



**Figura 17 — Explosión de vapor**

El pre tratamiento logró modificar de alguna manera la estructura de la lignina, provocando un hinchamiento en la madera, aumentando el área superficial del material y dejándolo más susceptible al ataque enzimático.



**Figura 18 — Muestra de tayanca después del pretratamiento**

Anexo 03 hidrolisis enzimática

La figura 19 y 20 muestra la fase de cada etapa durante la conversión a azúcares reductores.

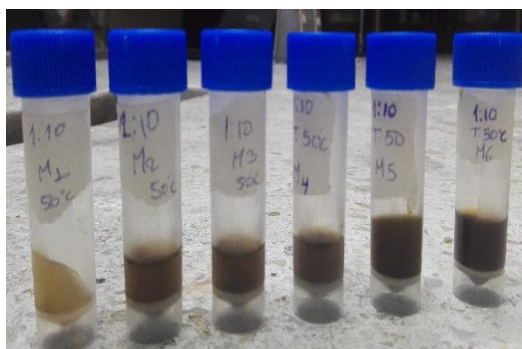


Figura 19 — Fase líquida tras la hidrólisis



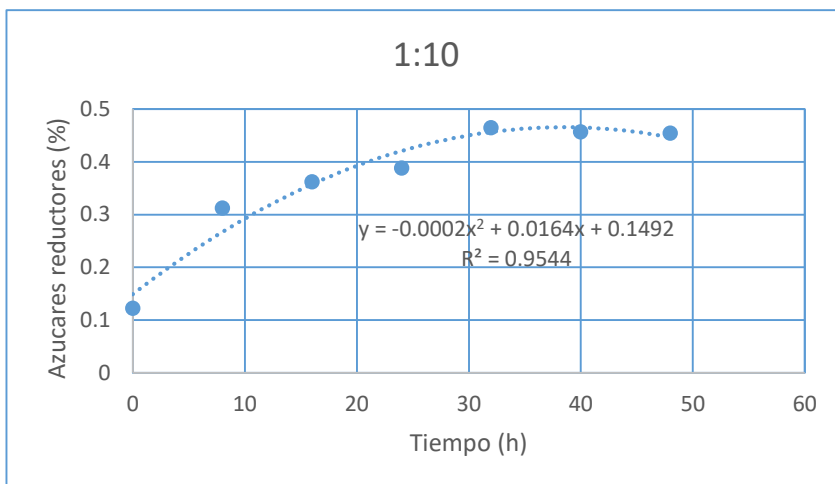
Figura 20 — Fase sólida tras la hidrólisis

Tabla 22 — Relación enzima sustrato (E/S) 1:10 p/v sobre la hidrolisis enzimática del material lignocelulosico de tayanca

Muestra	Tiempo (horas)	Azucares reductores (%)
M1	0	0.1229
M2	8	0.3125
M3	16	0.3624
M4	24	0.3885
M5	32	0.4649
M6	40	0.4569
M7	48	0.4548



Azúcares reductores (%) vs tiempo (horas)



**Figura 21 — Relación enzima sustrato (E/S p/v) sobre la hidrólisis enzimática del material lignocelulosico de tayanca**

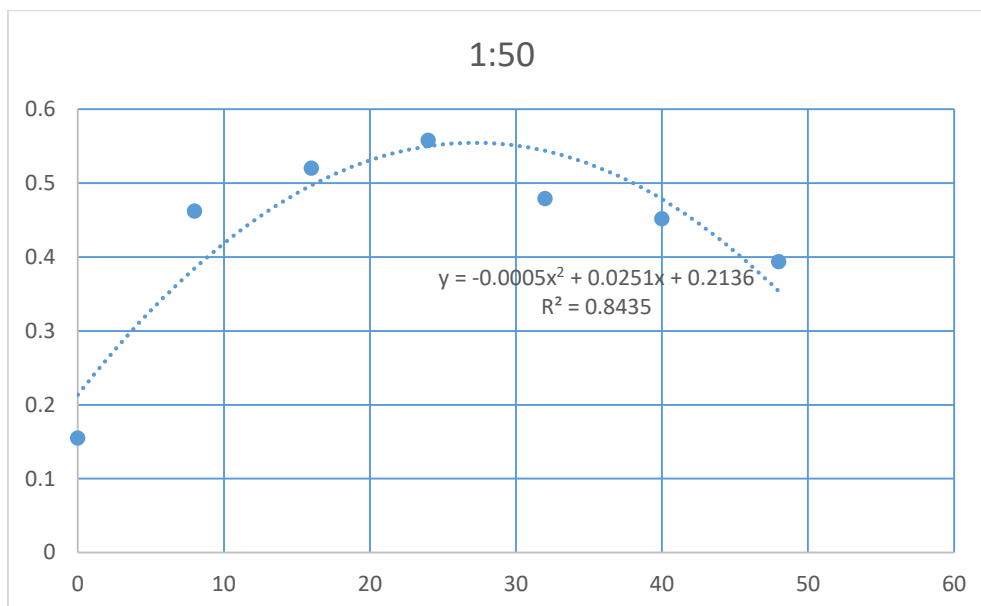
Analizando el ensayo realizado que se muestra en la tabla 22 y figura 23, relación enzima sustrato 1:10 p/v se observa que el tiempo óptimo para la liberación de azúcares reductores es de 41 horas y que después de este tiempo de hidrólisis enzimática, empieza a descender la concentración de estos azúcares. Este ejemplo explica que hasta cierto punto existirá la posibilidad de tener la máxima conversión a monosacáridos, tras esto empieza la degradación dando o formando compuestos inhibidores, tales como fulfural y HMF, a partir de xilosa y glucosa, respectivamente.

**Tabla 23 — Relación enzima sustrato (E/S) 1:50 p/v sobre la hidrólisis enzimática del material lignocelulosico de tayanca**

Muestra	Tiempo (horas)	Azúcares reductores (%)
M1	0	0.1552
M2	8	0.4625
M3	16	0.5203
M4	24	0.5581
M5	32	0.4794
M6	40	0.4519
M7	48	0.3938



Azúcares reductores (%) vs tiempo (horas)



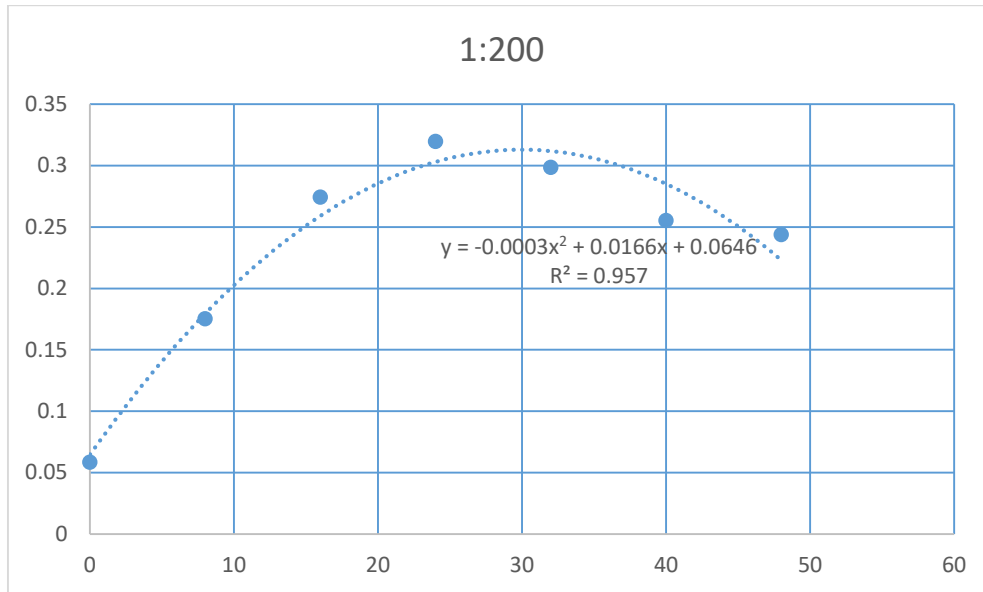
**Figura 22 — Relación enzima sustrato (E/S p/v) sobre la hidrólisis enzimática del material lignoceluloso de tayanca**

Analizando el ensayo realizado que se muestra en la tabla 23 y figura 20, relación enzima sustrato 1:50 p/v se observa que el tiempo óptimo para la liberación de azúcares reductores es de 25 horas y que después de este tiempo de hidrólisis enzimática, empieza a descender la concentración de estos azúcares. Este ejemplo explica que hasta cierto punto existirá la posibilidad de tener la máxima conversión a monosacáridos, tras esto empieza la variación y disminución en la formación de azúcares reductores, esto puede explicarse debido a la actividad bacteriana que consume los azúcares liberados dando o formando compuestos inhibidores, tales como fulfural y HMF.

**Tabla 24 — Relación enzima sustrato (E/S) 1:200 p/v sobre la hidrólisis enzimática del material lignoceluloso de tayanca**

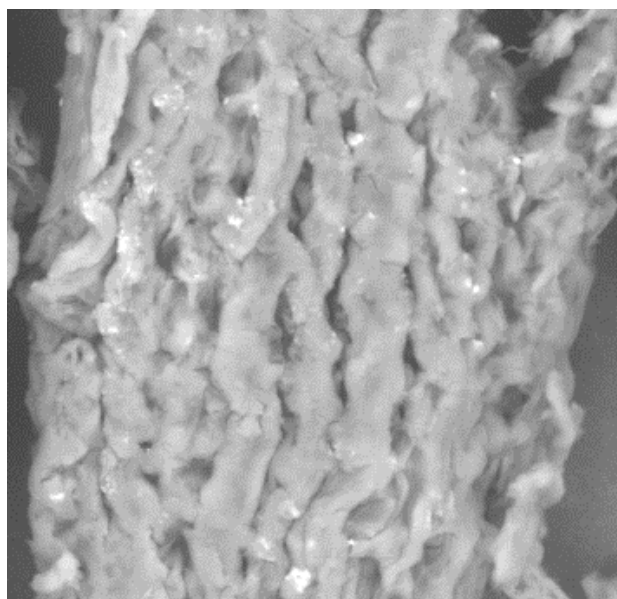
Muestra	Tiempo (horas)	Azúcares reductores (%)
M1	0	0.0586
M2	8	0.1755
M3	16	0.2745
M4	24	0.3198
M5	32	0.2987
M6	40	0.2554
M7	48	0.2439

Azúcares reductores (%) vs tiempo (horas)



**Figura 23 — Relación enzima sustrato (E/S) sobre la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico de tayanca**

Analizando el ensayo realizado que se muestra en la tabla 9 y figura 25, relación enzima sustrato 1:10. Se observa que el tiempo óptimo para la liberación de azúcares reductores es de 27 horas y que después de este tiempo de hidrólisis enzimática, empieza a descender la concentración de estos azúcares. Este ejemplo explica que hasta cierto punto existirá la posibilidad de tener la máxima conversión a monosacáridos, tras esto empieza la degradación dando o formando compuestos inhibidores, tales como fulfural y HMF, a partir de xilosa y glucosa, respectivamente.



**Figura 24 — Fibra del material lignocelulósico de tayanca después de la hidrólisis**

Anexo 04 determinación de azúcares reductores en la muestra problema.

Después de la etapa de hidrolisis, se procedió a la aplicación del método DNS, con 1mL de muestra y 1mL del reactivo DNS (anteriormente preparado) en un tubo de 10mL, se llevó a ebullición por 10 minutos adicionando posteriormente 1mL de agua destilada al tubo, dejando en reposo con hielo durante 10 minutos y finalmente realizando la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm. La curva está en la Figura 25.

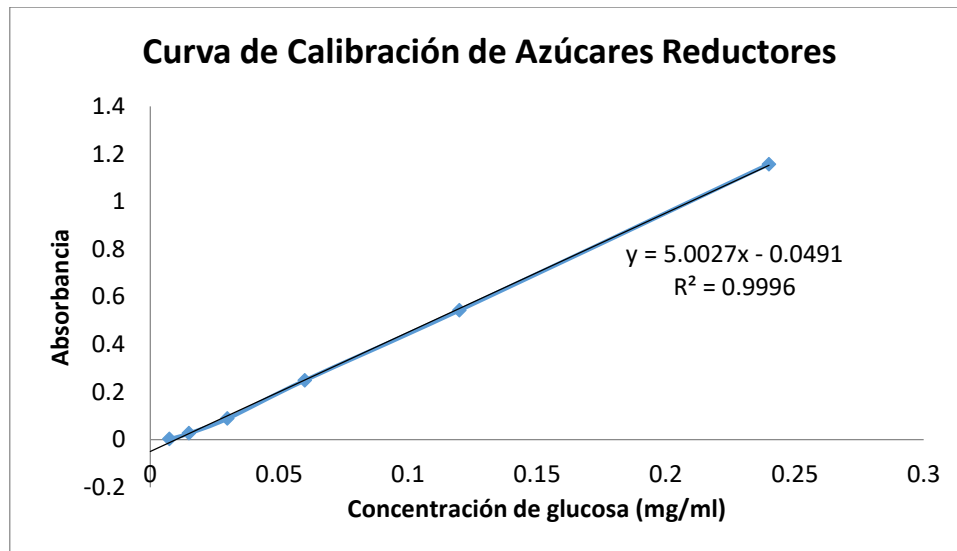


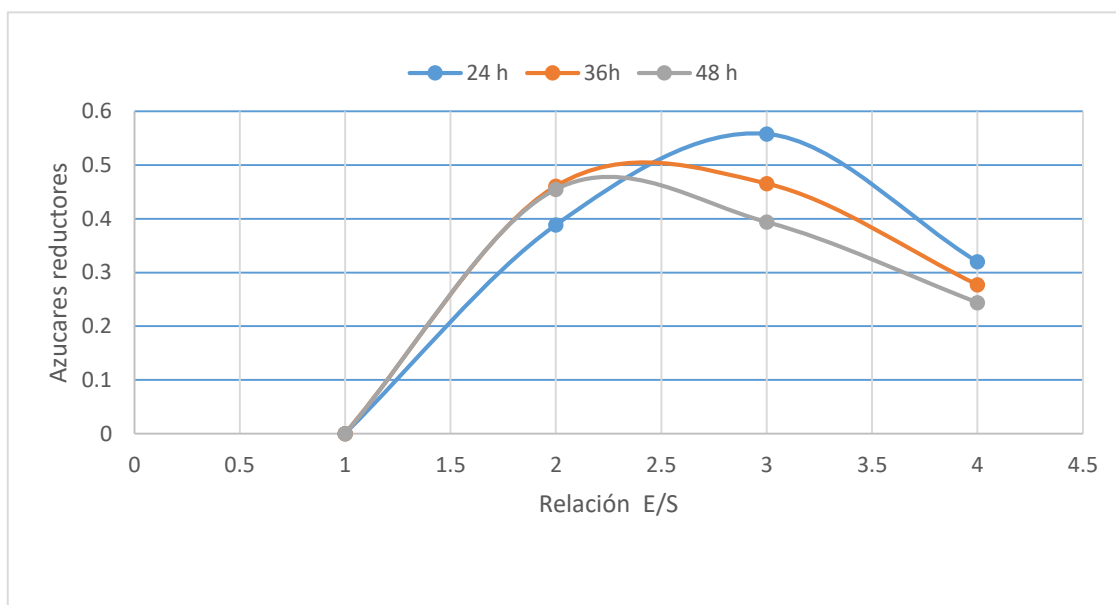
Figura 25 — Curva de calibración de azúcares reductores

Con el valor de la absorbancia para cada muestra problema y gracias a los datos obtenidos en la curva de calibración de glucosa (pendiente (m) y punto de corte (b)) adoptando la glucosa como azúcar reductor total como lo estableció (Cortes et al., 2013), se aplica la ecuación de la recta, para así conseguir el valor de la concentración en la muestra, multiplicando este valor por el factor de dilución utilizado en el patrón de glucosa.

$$\text{Concentracion Azucares } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) = \left(\frac{(\text{abs} + b)}{m}\right)(\text{concentracion de glucosa})$$

**Tabla 25 — Azúcares reductores del hidrolizado del material lignocelulósico de tayanca**

Relación enzima sustrato (E/S) (p/v)	Repetición	Horas-azúcares reductores (%)		
		24	36	48
1/10	R1	0.3995	0.4622	0.4497
	R2	0.3792	0.4623	0.4582
	R3	0.3869	0.4582	0.4564
1/50	R1	<b>0.5612</b>	0.4644	0.3897
	R2	0.5546	0.4661	0.3952
	R3	0.5585	0.4665	0.3965
1/200	R1	0.3212	0.2768	0.2452
	R2	0.3193	0.2746	0.2459
	R3	0.3189	0.2798	0.2467



**Figura 26 — Relación E/S sobre la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico de tayanca**

Anexo 05 porcentaje de hidrolisis del material lignocelulosico de tayanca

$$\% \text{ Hidrolisis de Celulosa} = \frac{\text{celulosa inicial} - \text{celulosa final}}{\text{celulosa inicial}} * 100$$

$$\% \text{ Hidrolisis de Celulosa} = \frac{43.32 - 37.83}{43.32} * 100 = 12.77\%$$

$$\% \text{ Hidrolisis de holoelulosa} = \frac{\text{holocelulosa inicial} - \text{holocelulosa final}}{\text{holocelulosa inicial}} * 100$$

$$\% \text{ hidrolisis de holocelulosa} = \frac{58.49 - 55.63}{58.49} * 100 = 4.89\%$$

$$\% \text{ Hidrolisis de hemielulosa} = \frac{\text{hemicelulosa inicial} - \text{hemicelulosa final}}{\text{hemicelulosa inicial}} * 100$$

$$\% \text{ hidrolisis de hemicelulosa} = \frac{15.17 - 17.80}{15.17} * 100 = -17.34\%$$



Anexo 06 análisis estadístico para la producción de azúcares reductores a partir del material lignoceluloso de tayanca.

**Tabla 26 — Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	Cv
% Azúcares reductores	27	1.0 0	1.0 0		1.12

La tabla 26 expresa la variable rendimiento de azúcares reductores expresado en porcentajes en el que N nos indica que tenemos un total de 27 unidades experimentales y el coeficiente de variación (Cv) que es 1.12 %.

**Tabla 27 — Tabla de Análisis de varianza**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado medio	Razón - F	valor- P
Modelo	0.24	10	0.02	1238.08	< 0.0001
E/S	0.19	2	0.09	4702.88	< 0.0001
TIEMPO	0.02	2	0.01	384.07	< 0.0001
BLOQUE	1.4E - 05	2	7.1E - 06	0.36	0. 7042
E/S * TIEMPO	0.04	4	0.01	551.53	< 0.0001
Error	3.2E - 04	16	2.0E - 05		
Total	0.24	26			

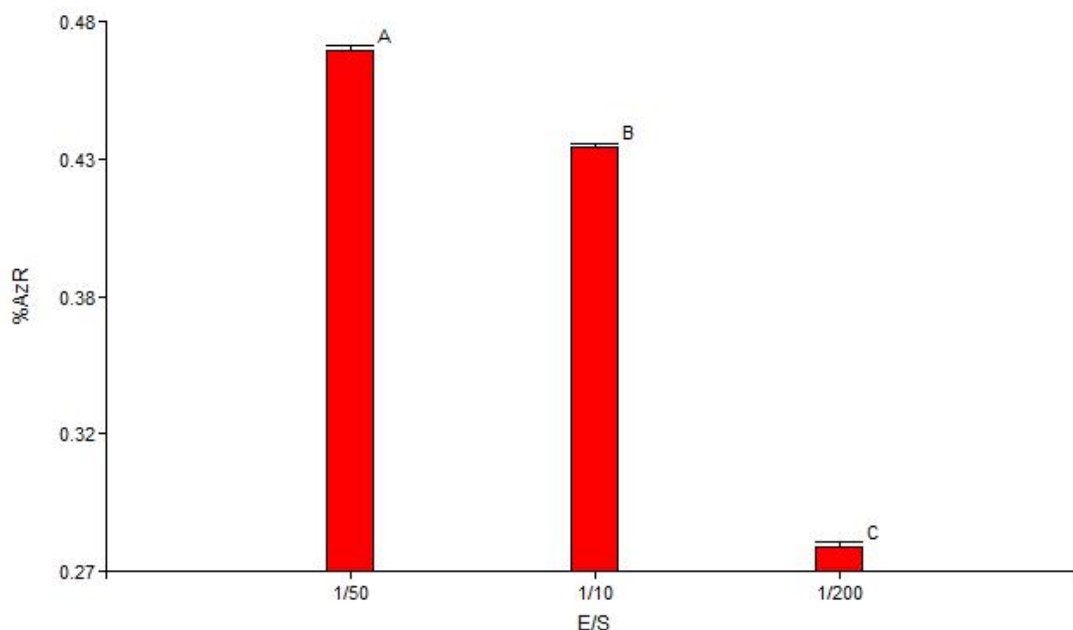
La tabla 27 muestra los resultados obtenidos por el programa InfoStat para la producción de azúcares reductores a partir del material lignoceluloso de tyanca, el cual indica que los valores experimentales tienen un P menor a 5 % por lo que aceptamos la hipótesis alterna, ya que la prueba de Tukey nos indica que existe diferencia media entre el rendimiento (porcentaje de azúcares reductores) del tratamiento ya que se encuentra por debajo del nivel de significación (P- valor <  $\alpha$ ).

**Tabla 28 — Prueba Tukey para la relación E/S**

E/S	Medias	N	E.E
1/50	0.47	9	1.5E -03 A
1/10	0.43	9	1.5E -0 B
1/200	0.28	9	1.5E -0 C



La tabla 28 muestra que en el factor relación E/S la diferencia media significativa (DMS) es de 0.0054. Para cada nivel del factor relación E/S, podemos observar que el mejor tratamiento en este factor fue la de la relación E/S 1/50 p/v que resultó el mejor rendimiento con una media de 0.47 % y la más baja fue 0.28 % que corresponde al factor relación E/S (1/200 p/v).



**Figura 27 — Gráfico de Enzima/Sustrato vs %Azúcares reductores**

La grafica indica de que la relación Enzima/Sustrato (1/50 p/v) fue el que presento mejor rendimiento que la relación E/S 1/200 p/v.

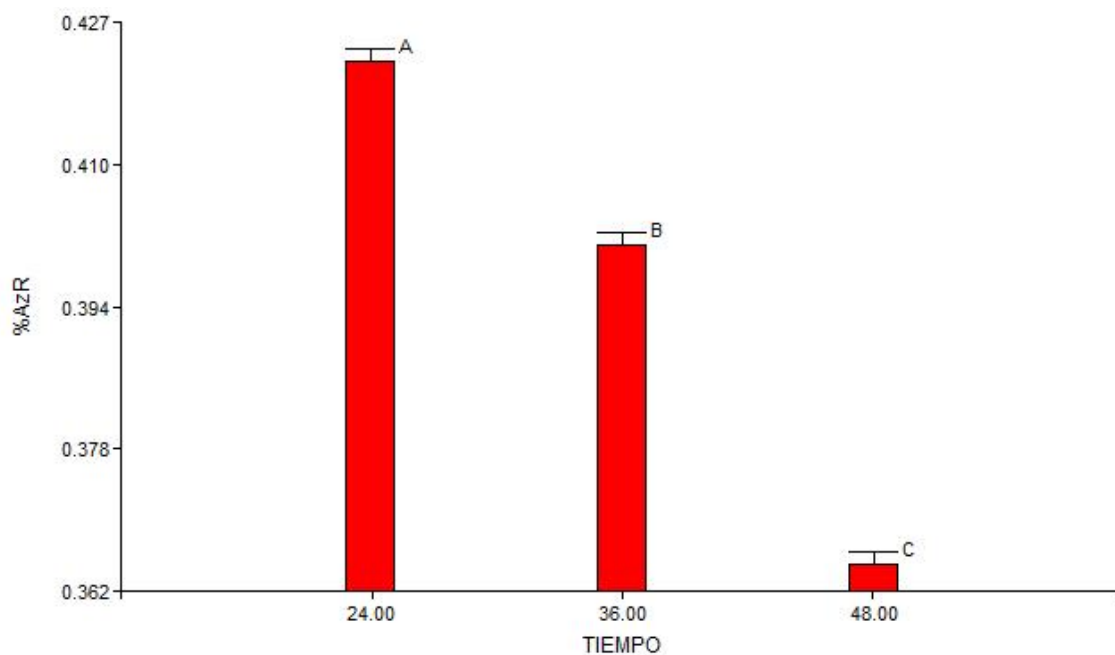
**Tabla 29 — Prueba Tukey para el tiempo**

TIEMPO	Medias	n	E.E
24	0.42	9	1.5E -03 A
36	0.40	9	1.5E -0 B
48	0.36	9	1.5E -0 C

La tabla 29 indica que el factor tiempo que presento mejor rendimiento fue de 24 horas con una media de 0.42 % y la que presento la media en rendimiento más bajo fue de 48 horas con 0.36 % de azúcares reductores con una diferencia media significativa de 0.00540 %.







**Figura 28 — Gráfico de tiempo vs % Azúcares reductores**

La grafica del factor de estudio tiempo nos indica que en 24 horas se obtuvo el mayor rendimiento de azucars reductores y el menor rendimiento de obtuvo en 48 horas.

**Tabla 30 — Tukey para la relación enzima sustrato vs tiempo**

E/S (p/v)	TIEMPO	Medias	n	E.E
1/50	24.00	0.56	3	2.6E-03 A
1/50	36.00	0.47	3	2.6E-03 B
1/10	36.00	0.46	3	2.6E-03 B
1/10	48.00	0.45	3	2.6E-03 B
1/50	48.00	0.39	3	2.6E-03 C
1/10	24.00	0.39	3	2.6E-03 C
1/200	24.00	0.32	3	2.6E-03 D
1/200	36.00	0.28	3	2.6E-03 E
1/200	48.00	0.25	3	2.6E-03 F

El mejor rendimiento se obtuvo del tratamiento relación enzima/sustrato (E/S) 1/50 p/v con 24 horas y una media de 0.56 % de azucars reductores y el que nos dio el menor rendimiento de azucars reductores se obtuvo de la relación enzima/sustrato (E/S) 1/200 p/v con 48 horas donde ese obtuvo 0.25 % de azucars reductores y se obtuvo una diferencia media significativa de 0.01289 %.

