

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“PRE TRATAMIENTO Y SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE
RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE ARROZ, CAÑA DE AZÚCAR
Y MAÍZ”**

Presentada por:

YASMIN ELIZABETH CASTILLO GARCIA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**“PRE TRATAMIENTO Y SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE
RESILOS LIGNOCELULÓSICOS DE ARROZ, CAÑA DE AZÚCAR Y
MAÍZ”**

Presentada por:

Yasmin Elizabeth Castillo Garcia

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dr. Víctor Meza Contreras
PRESIDENTE

Mg. Sc. Patricia Moreno Díaz
MIEMBRO

Mg. Sc. Elva María Ríos Ríos
MIEMBRO

Blgo. Juan Juscamaita Morales
ASESOR

DEDICATORIA

*Con amor a
mis padres: Elizabeth y José. Y a mis
futuros colegas.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres **Elizabeth** y **José**, por su amor y apoyo incondicional, en especial a mi madre por su dedicación, sacrificio y amor.

A mi maestro **Blgo. Juan Gabriel Juscamaita Morales** por su apoyo y confianza brindada en los años que lo conozco. Por abrirme las puertas del Laboratorio de Biotecnología Ambiental – Unidad de Biorremediación.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Ambiental – Unidad de Biorremediación por su apoyo en las diferentes etapas de la fase experimental durante la investigación, en especial a **Jimmy Hans Cañari Cancho**, **Jaime Alexis De la Cruz Charca** y **Daisy Vanessa Romero Carhuavilca**. Además a mis futuros colegas **Edwin**, **Verónica**, **David**, **Cristian**, **Evelyn** y **Franz**. Así mismo al técnico del Laboratorio el señor **Vicente** y la **Mg. Paola Jorge Montalvo** por su apoyo en la primera etapa de la investigación.

Al Laboratorio de Biotecnología Ambiental – Unidad de Biorremediación por el uso de sus instalaciones y equipos durante toda la parte experimental de la investigación, al Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental CIQTOBIA por sus instalaciones y equipos en la primera etapa de la fase experimental.

Al proyecto: **“PRODUCCIÓN DE ETANOL DE 2DA GENERACIÓN G2 A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE CAÑA, ARROZ Y MAÍZ”** Proyecto N° 10-2016 INIA-PINIA/UPSM/IE por el financiamiento.

A **Mariamercedes Anteza Aponte** y **Leticia Fernandez Futuri** por su apoyo constante y amistad brindada

A todos ellos, mis sinceros agradecimientos.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN LITERARIA	3
2.1	ARROZ (<i>Oryza sativa</i>)	3
2.1.1	CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	3
2.2	CAÑA DE AZÚCAR (<i>Saccharum officinarum</i>).....	4
2.2.1	CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	4
2.3	MAÍZ (<i>Zea mays</i>)	4
2.3.1	CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	4
2.4	RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS	5
2.4.1	RESIDUOS DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i>).....	6
2.4.2	RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR (<i>Saccharum officinarum</i>).....	7
2.4.3	RESIDUOS DE MAÍZ (<i>Zea mays</i>)	9
2.5	COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LOS RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS	9
2.5.1	LIGNINA	10
2.5.2	HEMICELULOSA	11
2.5.3	CELULOSA	12
2.6	PRE TRATAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS	13
3.3.1	PRE TRATAMIENTO FÍSICO	14
3.3.2	PRE TRATAMIENTOS QUÍMICOS.....	14
3.3.3	PRE TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO.....	18
3.3.4	PRE TRATAMIENTO BIOLÓGICO.....	19
2.7	SACARIFICACIÓN.....	20
2.7.1	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR CELULASAS Y COMPLEJO ENZIMÁTICO.....	20
2.7.2	CELLIC CTEC2.....	23
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1	MATERIALES	25
3.1.1	MATERIA PRIMA	25
3.1.2	EQUIPOS DE LABORATORIO	26
3.1.3	REACTIVOS	27
3.1.4	MATERIALES DE LABORATORIO.....	27

3.2 MÉTODOS	28
3.2.1 ENSAYOS PRELIMINARES	28
3.2.2 MOLIENDA	28
3.2.3 PRE TRATAMIENTOS DE LOS RESIDUOS	29
3.2.4 MEDICIÓN DE AZÚCARES TOTALES.....	30
3.2.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	30
3.2.6 MEDICIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1 PRIMERA ETAPA	32
4.1.1 Determinación de los pre tratamientos óptimos	32
4.2 SEGUNDA ETAPA.....	41
4.2.1 Optimización de hidrólisis enzimática	41
4.3 TERCERA ETAPA.....	55
4.3.1 Escala semi piloto.....	55
V. CONCLUSIONES.....	59
VI. RECOMENDACIONES.....	60
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
VIII. ANEXOS	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lugares de recolección de residuos	26
Tabla 2. Características de los tres pre tratamientos para los tres residuos lignocelulósicos	33
Tabla 3. Tabla resumen de valores máximos de azúcares totales (AT) de los tres residuos lignocelulósicos en cada pre tratamiento	37
Tabla 4. Resumen de pH de pre tratamientos seleccionados.....	40
Tabla 5. Tratamientos trabajados en hidrólisis enzimática.....	42
Tabla 6. Peso y volumen obtenidos de escala semi piloto de Cascarilla de arroz.....	55
Tabla 7. Azúcares reductores (ppm) de Cascarilla de arroz	56
Tabla 8. Azúcares reductores (ppm) en segunda y tercera etapa de Cascarilla de Arroz...	56
Tabla 9. Escala semi piloto de Residuos de Caña de Azúcar	57
Tabla 10. Azúcares reductores (ppm) de Residuos de Caña de Azúcar	57
Tabla 11. Azúcares reductores (ppm) en segunda y tercera etapa de Residuos de Caña ...	57
Tabla 12. Escala semi piloto de Residuos de Maíz	58
Tabla 13. Azúcares reductores (ppm) de Residuos de Maíz	58
Tabla 14. Azúcares reductores (ppm) en segunda y tercera etapa de Residuos de Maíz ...	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de AT (ppm) en los tres pre tratamientos de Cascarilla de Arroz.....	33
Figura 2. Comparación de AT (ppm) de los tres pre tratamientos en Residuos de Caña de Azúcar.....	34
Figura 3. Comparación de AT (ppm) de los tres pre tratamientos en Residuos de Maíz.....	36
Figura 4. pH de Cascarilla de Arroz pre tratada.....	39
Figura 5. pH de Residuos de Caña de azúcar pre tratada.....	39
Figura 6. pH de Residuos de Maíz pre tratada.....	40
Figura 7. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Cascarilla de Arroz "Ácida" ...	42
Figura 8. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Cascarilla de Arroz "Alcalina"	44
Figura 9. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Cascarilla de Arroz "Nuevo"...	45
Figura 10. Comparación de los tres tratamientos óptimos en Cascarilla de Arroz.	46
Figura 11. Comparación de los Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Caña "Ácida"	47
Figura 12. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Caña "Alcalino"	48
Figura 13. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Caña "Nuevo" ...	49
Figura 14. Comparación de los tres óptimos en los tres tratamientos de Residuos de Caña de Azúcar.....	50
Figura 15. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Maíz "Ácido"	51
Figura 16. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Maíz "Alcalino"	52
Figura 17. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Maíz "Nuevo" ...	53
Figura 18. Comparación de los óptimos en los tres tratamientos de Residuos de Maíz. ...	54
Figura 19. Resumen de hidrólisis enzimática en los tres residuos	54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Descripción de los tratamientos trabajados	69
Anexo 2. Resultados.....	71
Anexo 3. Análisis estadísticos de azúcares totales en pretratamientos para cascarilla de arroz.....	89
Anexo 4. Análisis estadísticos de azúcares totales en pretratamientos para residuos de caña de azúcar	95
Anexo 5. Análisis estadísticos de azúcares totales en pretratamientos para residuos de maíz..	101
Anexo 6. Análisis estadístico de azúcares reductores en sacarificación enzimática para cascarilla de arroz.....	107
Anexo 7. Análisis estadístico de azúcares reductores en sacarificación enzimática para residuos de caña de azúcar	113
Anexo 8. Análisis estadístico de azúcares reductores en sacarificación enzimática para residuos de maíz.....	119
Anexo 9. Métodos de análisis	125
Anexo 10. Ensayos preliminares.....	127
Anexo 11. Registro Fotográfico.....	132

RESUMEN

El presente trabajo de investigación trata sobre la evaluación de mayor liberación de azúcares totales y reductores a partir de tres residuos lignocelulósicos (cascarilla de arroz, residuos de caña de azúcar y residuos de maíz) pre tratados y luego hidrolizados con enzimas celulolíticas. Los residuos fueron sometidos a pre tratamientos con distintas soluciones delignificantes en una relación sólido: líquido de 1:10 por un tiempo de tres horas a una temperatura de 70°C. El pre tratamiento alcalino para los tres residuos lignocelulósicos fue el que liberó la mayor cantidad de azúcares totales. La hidrólisis enzimática fue realizada usando el complejo enzimático Cellic CTec2 incubándose por 72 horas a 50° C, se varió el porcentaje de enzima a trabajar respecto al peso del material pre tratado con las distintas soluciones delignificantes y seleccionadas en la etapa previa; en esta etapa se evaluó la liberación de mayor cantidad de azúcares reductores. Los resultados obtenidos de azúcares reductores en cascarilla de arroz fue de 19300.85 ppm, residuos de caña de azúcar de 29829.42 ppm y residuos de maíz de 20663.79 ppm; en los tres casos los residuos fueron pre tratados en condiciones alcalinas, los días de incubación de la hidrólisis enzimática varió según los residuos, la cascarilla se incubó por 72 horas, los residuos de caña por 48 horas y los residuos de maíz por 24 horas. Finalmente en base a la hidrólisis seleccionada se realizó el escalamiento semi piloto de los mismos, en los que se obtuvo valores de azúcares reductores de: 19048.26 ppm, 25147.28 ppm y 22989.73 ppm para cascarilla de arroz, residuos de caña de azúcar y residuos de maíz, respectivamente.

Palabras clave: Azúcares totales, azúcares reductores, residuos lignocelulósicos, hidrólisis enzimática, Cellic C Tec2

ABSTRACT

The present research work deals with the evaluation of greater liberation of total and reducing sugars from three lignocellulosic residues (rice husk, sugar cane residues and corn residues) pretreated and then hydrolyzed with cellulolytic enzymes. The residues were subjected to pretreatments with different solutions delignificants in a solid:liquid ratio of 1:10 for a time of three hours at a temperature of 70°C. The alkaline pretreatment for the three lignocellulosic residues was the one released the greatest amount of total sugars. The enzymatic hydrolysis was carried out using the Cellic CTec 2 enzymatic complex, which was incubated for 72 hours at 50 ° C, the percentage of enzyme to be worked, was varied according to the weight of the material pretreated with the different delignificants solutions and selected in the previous stage; in this stage, the release of a greater quantity of reducing sugars was evaluated. The results obtained from reducing sugars in rice husk were 19300.85 ppm, sugarcane residues of 29829.42 ppm and corn residues of 20663.79 ppm; in all three cases, the residues were pretreated in alkaline conditions, the incubation days of the enzymatic hydrolysis varied according to the residues, the rice husk was incubated for 72 hours, the sugarcane residues for 48 hours and the corn residues for 24 hours. Finally, based on the hydrolysis selected, they were semi-pilot scaling, in which values of reducing sugars were obtained: : 19048.26 ppm, 25147.28 ppm y 22989.73 ppm for rice hus, sugarcane residues and corn residues, respectively.

Key words: Total sugars, reducing sugars, lignocellulosic residues, enzymatic hydrolysis, Cellic CTec2.

I. INTRODUCCIÓN

La biomasa lignocelulósica y en especial los residuos agroindustriales han dejado de ser productos de desecho-problema, para convertirse en materia prima potencial para diversos procesos tanto de tipo agrícola como industrial, dando lugar a los llamados biocombustibles dentro de los cuales destaca el bioetanol. Estos subproductos o residuos en su mayoría corresponden a biomasa lignocelulósica rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa entre 75-80%, los cuales pese a su dificultosa degradación, es posible desdoblarlos a azúcares monosacáridos mediante procesos químicos, físicos y/o biológicos, para su posterior conversión a etanol (Sánchez *et al.* 2010).

Se estima que la producción anual de lignocelulosa en todo el mundo es de 1×10^{10} TM (Sánchez y Cardona, citado por Alvira *et al.*, 2010). En Perú la cantidad de residuos agrícolas se estima en 10,247,670 TM, esta cantidad se refiere sólo entre los cultivos de maíz amarillo, caña de azúcar, broza de algodón, broza de espárragos, arroz (pajilla y cascarilla), viruta y bagazo, que se genera anualmente; siendo los mismos un potencial energético, además de ser considerados cultivos estables y por tanto sus residuos representan una cantidad considerable (Marcelo *et al.* 2016).

La naturaleza de los materiales lignocelulósicos hace necesario el empleo de pre tratamientos antes de realizar su hidrólisis con el objeto de alterar su estructura y favorecer el rendimiento del proceso de generación de azúcares fermentables (Alfonsel *et al.* 1986). Generalmente, la hemicelulosa y la lignina pueden descomponerse durante el pre tratamiento (Song *et al.* 2016). El pre tratamiento para remover lignina es un paso crucial para la efectiva hidrólisis enzimática (Kumar *et al.*, citado por Tan *et al.* 2010).

La hidrólisis enzimática puede convertir los materiales celulósicos en azúcares simples de una manera respetuosa con el ambiente (Tan *et al.* 2010) .

El presente trabajo se basa en el estudio de tres diferentes residuos lignocelulósicos con alto potencial de producción de bioetanol: cascarilla de arroz, residuos de caña de azúcar y residuos de maíz, enfocándose en encontrar un pre tratamiento químico óptimo seguido de una hidrólisis enzimática óptima. Siendo deseable en la primera etapa aquel pre tratamiento químico que produzca una mayor liberación de azúcares totales y en la segunda etapa aquella hidrólisis enzimática que produzca la mayor liberación de azúcares reductores.

Se plantea como objetivos del presente trabajo:

Objetivo general

- Evaluar los azúcares totales y reductores en el pre tratamiento e hidrólisis enzimática, respectivamente, de los residuos lignocelulósicos de arroz, caña de azúcar y maíz.

Objetivos específicos

- Determinar la concentración óptima en el pre tratamiento ácido, pre tratamiento alcalino y pre tratamiento nuevo de los tres residuos lignocelulósicos.
- Determinar la concentración óptima de enzimas en los tres residuos lignocelulósicos pre tratados.
- Llevar el mejor tratamiento (pre tratamiento y sacarificación) a escala semi - piloto para cada uno de los residuos lignocelulósico.

II. REVISIÓN LITERARIA

2.1 ARROZ (*Oryza sativa* Linn.)

2.1.1 CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

División : Magnoliophyta

Clase : Monocotiledónea

Orden : Poales

Familia : Poaceae

Género : *Oryza*

Especie : *Oryza sativa* Linn.

Es una planta anual con tallos redondos, huecos y con juntas, hojas planas y panoja terminal. Se encuentra adaptada a crecer en suelos inundados y suelos de secano. Sus raíces son delgadas, fibrosas y fasciculadas. Los tallos son huecos y más o menos redondos, con una longitud de 60 a 120 cm, formados por nudos y entrenudos que varían de tamaño y número. Las hojas son largas, alternas, envainadoras, con limbo lineal, agudo y plano. Las flores son verde blanquecinas dispuestas en espiguillas que en conjunto forman una panoja grande, terminal, estrecha y colgante después de la floración. Las espiguillas son triflorales y hermafroditas, siendo una fértil y los dos inferiores órganos vestigiales. El fruto o semilla está rodeada por el pericarpio, formando un fruto llamado cariósido, el cariósido está incluido dentro de la lema y la pálea, siendo estas las estructuras que constituyen la “cáscara”(Valladares 2010, Rodríguez Zurichaqui 2017, Manrique Anzules 2014).

2.2 CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*)

2.2.1 CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

División	: Magnoliophyta
Clase	: Monocotiledónea
Orden	: Poales
Familia	: Poaceae
Género	: <i>Saccharum</i>
Especie	: <i>Saccharum officinarum</i> Linn.

Es una planta pluriannual que dura aproximadamente 5 años con cortes anuales. El tallo es el órgano más importante por el almacenamiento de azúcar, tiene una altura de 2 a 5 metros y un diámetro de 3 ó 5 cm, además se encuentra formado por nudos; se clasifican en tallos primarios, secundarios y terciarios. El sistema radicular se forma por dos tipos, las raíces primordiales y las raíces permanentes, estas últimas crecerán en base a condiciones edafológicas y climáticas, las raíces son fasciculadas. Las hojas se forman en los nudos, distribuida de forma alterna a lo largo del tallo; la lámina foliar posee una nervadura central y de manera aserrada en los bordes. La inflorescencia es una panícula lisa alargada y en espiga; poseen una flor hermafrodita con tres anteras y un ovario con dos estigmas (Fiallos Encalada 2008, López Bustamante 2015).

2.3 MAÍZ (*Zea mays*)

2.3.1 CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Liliopsida
Subclase	: Commelinidae
Orden	: Poales
Familia	: Poaceae

Género : Zea
Especie : Mays
Nombre Científico : *Zea mays L.*

El maíz es una planta anual que puede alcanzar hasta 3.5 m, normalmente crece de 2 a 2.5 m. La raíz en una planta adulta es adventicia, presenta raíz principal, raíz de sostén o soporte y raíz aérea. El tallo central es un eje formado por nudos y entrenudos que varía de longitud y número. La hoja está constituida de vaina, cuello y lámina, esta última es angosta y delgada que puede tener 1.5 m de largo y 0.1 m de ancho. El sistema floral de las yemas localizadas en la base de los entrenudos se desarrollan en el tallo las mazorcas, que contienen los ovarios que se convertirán en granos después de la polinización; cada ovario tienen un estilo largo que sobresale de las hojas modificadas; las espigas masculinas crecen en cada tallo principal. El fruto son granos o cariósides encontradas en la mazorca una cantidad aproximada de 600 a 1000 (De la Cruz Espinoza 2016, Valladares 2010).

2.4 RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

La biomasa lignocelulósica es producida por la acción fotosintética de las plantas, representa la fuente orgánica renovable más abundante del Planeta (Quiroz-Castañeda *et al.*, citado por Álvarez *et al.* 2014).

El material lignocelulósico está constituido por los tejidos de los vegetales cuyas células presentan una pared celular constituida por un entramado de microfibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosas y sobre las que se deposita la lignina (Barroso 2010).

La dificultad de convertir los materiales lignocelulósicos en productos químicos se debe a sus características morfológicas. Las microfibrillas de celulosa están incrustadas en una matriz amorfa de hemicelulosas y lignina, que actúa como una barrera natural para ataque de microorganismos y enzimas (Dagnino *et al.* 2011).

Anualmente se producen 200 000 millones de toneladas de lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) en todo el mundo (Ragauskas, citado por Gracida y Pérez 2014). La composición y porcentaje de los polímeros varían de acuerdo con la especie, la edad y la etapa de crecimiento de la planta (Jeffries, citado por Gracida y Pérez 2014).

El material lignocelulósico es el más duradero y abundante de los residuos vegetales, entre ellos tenemos: la cascarilla de arroz, bagazo de caña de azúcar, residuos del café, de floricultura y demás residuos agrícolas post-cosecha (Castro Saya 2013).

Los residuos lignocelulósicos poseen un elevado potencial para la producción de bietanol debido a su alto contenido de celulosa, entre los residuos agrícolas encontramos a la caña de azúcar, algodón, bambú, cáscara de arroz, maíz, trigo, cebada, plátano, entre otros (Escalante Calderón y Fuentes Aquije 2013).

2.4.1 RESIDUOS DE ARROZ (*Oryza sativa*)

El arroz implica el 20 por ciento de la energía nutricional del mundo (Dagnino *et al.* 2013). La cascarilla de arroz es el principal subproducto que procede de arroz y representa el 20 – 25% del peso total (Saha *et al.*, citado por Yu *et al.* 2009). La cascarilla de arroz cubre y protege al grano durante su crecimiento, y esencialmente consiste de cuatro capas, entre las cuales la epidermis externa cubierta con una gruesa capa de cutícula de células altamente lignificadas, y el esclerénquima con gruesas paredes silicadas y lignificadas (Sun, citado por Dagnino *et al.* 2013). Las restricciones del uso de cascarilla de arroz como alimento para animales son: su baja digestibilidad, tamaño peculiar, baja densidad aparente, alto contenido de ceniza/sílice y características abrasivas (Saha *et al.* 2005).

La cascarilla de arroz posee 36 a 40% de celulosa y 12 a 19% de hemicelulosas (Karimia *et al.*; Binod *et al.*; Hsu *et al.*; Saha y Cotta; Banerjee *et al.*, citado por Dagnino *et al.* 2011), 18.2 – 24.6 % de lignina (Valverde *et al.*, citado por Sánchez *et al.* 2010),

aproximadamente un 12% de cenizas, que contienen un 80 – 90% de sílice, 5% K₂O y P₂O₅, y 4% a 1.2% de CaO y pequeñas cantidades de Mg, Fe y Na (Diel; Balconi, citado por Dagnino *et al.* 2011).

En el caso de la cascarilla de arroz, su compleja composición química suma inconvenientes adicionales a la liberación de celulosa (Dagnino *et al.* 2011). Los diferentes subproductos del arroz difieren sustancialmente en su composición química, propiedades y valor nutritivo (García, citado por Arapa 1994).

Tradicionalmente, la paja y la cáscara de arroz se queman unidas con otros residuos agroindustriales (Viñals *et al.* 2012). Anualmente el cultivo de arroz con cáscara produce más de 660 millones de toneladas de arroz, junto con más de 800 millones de toneladas secas de residuos agrícolas (principalmente paja) e incluías más de 113 millones de toneladas métricas se generan cada año en todo el mundo. Debido a su amplia disponibilidad y bajo costo relativo, tiene el potencial de servir como materia prima para la producción de etanol combustible (Saha *et al.*, citado por Yu *et al.* 2009; Wood *et al.* 2016).

Según MINAGRI (2017) la producción nacional de arroz cáscara, en el mes de Marzo del 2017 llegó a 232 652 t. Las principales zonas productoras de arroz en el Perú del año 2016 se encuentran: Piura, Amazonas, Lambayeque, Cajamarca, San Martín, La Libertad y Arequipa.

2.4.2 RESIDUOS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*)

El estudio de Aguilar (2010) indica que la producción de caña de azúcar en el mundo, es de gran importancia para atender una de las dietas básicas, así como de insumo para las industrias que fabrican pulpa de papel y cartón, alimentación animal, refrescos, entre otros.

El cultivo de caña ha sido el principal receptor del paquete tecnológico de la revolución verde. Los esquemas tecnológicos se han basado en el monocultivo, la especialización por regiones y por productores y sus actividades como la quema y requema de cañaverales, el uso intensivo de agroquímicos como práctica agrícola convencional y la disposición final y el bajo nivel de uso de los subproductos del procesamiento de la caña de azúcar (residuos de cosecha, bagazo, cachaza, mieles y vinazas), provocan impactos al ambiente muy severos (Contreras *et al.*, citado por Aguilar 2010).

El residuo de cosecha de cañero, es el remanente de los tallos, caña, hojas, flor y cogollo. Este residuo fibroso representa entre el 10 al 15% de la biomasa cañera (cerca de 140 kg/t caña), este material lignocelulósico podría usarse para fabricar diversos derivados de mayor valor agregado; sin embargo, esto es totalmente quemado en la zafra azucarera (Romero *et al.*, citado por Aguilar 2010). La composición química de la biomasa lignocelulósica de caña de azúcar contiene 40 – 44% de celulosa, 30 – 32% de hemicelulosa, 22 – 25% de lignina y una pequeña cantidad de cenizas (Mathier *et al.* 2013).

Según AFOSTAT, citado por Aguilar (2010) el Perú tendría un rendimiento de 88-131 t/ha en la producción de caña de azúcar. Además Caña Brava, un conjunto de tres empresas se dedican a la producción de etanol a partir de la caña de azúcar, estas empresas se encargan de cosecha y plantación, molienda y producción industrial de etanol y generación de energía eléctrica a partir del bagazo; la planta se encuentra en Piura, tienen una producción de 350 mil litros de etanol por anhidro por día, con una molienda de 4 000 toneladas diarias de caña. Las empresas Maple y Corporación Azucarera del Perú S.A., también se dedican a la producción de etanol (Escalante Calderón y Fuentes Aquije 2013).

Por otro lado Salcedo *et al.*(2011) mencionan que en el Valle del Cauca (Colombia), se siembran unas 200 mil 210 hectáreas de caña de azúcar de las cuales se cosecha 14 millones de toneladas por año, generándose alrededor de 7 millones de toneladas por año, constituidos por las hojas y cogollos. Esos desperdicios se pican y se esparcen por el campo de siembra o se queman, causando un impacto importante sobre la calidad del aire.

2.4.3 RESIDUOS DE MAÍZ (*Zea mays*)

El cultivo de maíz produce una gran cantidad de biomasa, de la que se aprovecha cerca del 50 por ciento en forma de grano. El resto corresponde a diversas estructuras de la planta: caña, hojas, limbos y mazorca entre otros (Gracia 2004). El rastrojo del maíz posee un 36.40 % de celulosa, 22.60% de hemicelulosa y 16.60% de lignina (Olofsson *et al.*, citado por Gonzáles *et al.* 2011).

El estudio realizado por Bardales *et al.* (2015) indican que en el departamento de La Libertad, el volumen de residuo lignocelulósico generado en la provincia de Virú dentro de los cultivos más destacados está el residuo de cultivo del maíz amarillo duro con 10 000 kg/ha. Así mismo el mismo autor menciona los principales residuos lignocelulósicos de diferentes cultivos como el caso del maíz amarillo duro, de diferentes provincias de La Libertad. En Virú el principal residuo es la coronta y hojas; Ascope, coronta y hojas; Trujillo, coronta y Chepén, coronta y hojas.

En la industria del maíz molido se reportan estudios con la fibra de maíz que representa una fuente renovable que está disponible en cantidades significativas y debe servir potencialmente como una materia prima para la producción de alcohol grado combustible. Otros residuos menos estudiados de esta industria, son las hojas, tallos y mazorcas (Bura *et al.*, citado por Viñals *et al.* 2012). Se estima que en el Rastrojo de maíz posee una concentración de celulosa de 36.40%, hemicelulosa de 22.60% y lignina de 16.60 % (Olofsson *et al.*, citado por Gonzáles *et al.* 2011).

2.5 COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LOS RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Barroso (2010) menciona que los componentes de los materiales lignocelulósicos se clasifican en: Componentes estructurales y Componentes secundarios; los primeros están

formados por tres polímeros, la celulosa, la lignina y la hemicelulosa, donde la celulosa forma casi la mitad del total de compuestos que forman los materiales lignocelulósicos, en tanto que el 20% lo forma la lignina. La unión de celulosa y lignina puede producirse a través de hemicelulosas. Por otro lado los componentes secundarios se encuentran en menor proporción y son de dos tipos: extractos y materias minerales. Los extractos son de bajo peso molecular, hidrosolubles o extraíbles en solventes orgánicos; en tanto que las materias minerales son estimadas como cenizas según análisis químicos.

2.5.1 LIGNINA

La lignina es un componente estructural esencial en casi todo material vegetal y es un polímero de unidades de fenilpropano producido por el acoplamiento oxidativo de compuestos 4-hidroxifenil propanoides (Sjostrom, citado por Nakagame *et al.* 2010). Es un polímero tridimensional de fenilpropano cuyas unidades se mantienen unidas por enlaces éter y carbón – carbón (Lázaro y Arauzo 1994).

Es un polímero amorfo conformado por tres diferentes unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferilo y alcohol sinapílico) unidas por diferentes tipos de enlaces. El heteropolímero amorfo es también insoluble en agua y ópticamente inactivo; todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy difícil (Fengel y Wegener, citado por Hendriks y Zeeman 2009). La red de lignina está concentrada en las capas exteriores de las fibras (Lázaro y Arauzo 1994). La lignina le da soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra ataque microbiano y estrés oxidativo a la planta (Fengel y Wegener, citado por Hendriks y Zeeman 2009). Es su estructura la que la hace resistente a la degradación química y biológica, característica importante en la selección de fuentes de carbono para la obtención de bioetanol (Nogués *et al.*, citado por Gracida y Pérez 2014).

La lignina proporciona resistencia a la pared celular frente a los insectos y patógenos, con la hemicelulosa forma una matriz alrededor de la celulosa; es el material más recalcitrante. Desempeña funciones de transporte de agua, nutrientes y metabolitos en el sistema vascular (Álvarez *et al.* 2014). El contenido y la estructura de lignina difieren según el

origen de la planta. Por ejemplo el residuo de maíz contiene unidades de p-hidrofelino (Sjostrom, citado por Nakagame *et al.* 2010).

2.5.2 HEMICELULOSA

Las hemicelulosas son carbohidratos de cadena corta con numerosas ramificaciones (estructura amorfa) y es la principal fracción no celulósica de los polisacáridos (Dagnino *et al.* 2011, Lázaro y Arauzo 1994). El monómero estructural mayoritario es la xilosa, seguido por glucosa y arabinosa. Su estructura hace que sean fáciles de hidrolizar en condiciones relativamente suaves (Dagnino *et al.* 2011). Las hemicelulosas son polímeros heterogéneos ramificados de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares acetilados (Sjostrom, citado por Chandra *et al.* 2007). En su estado natural existe una forma amorfa que puede dividirse en dos categorías: poliurónidos y celulosanas. Los poliurónidos son hemicelulosas que contienen grandes cantidades de ácido hexurónico y algunos grupos metoxil, acetil y carboxílicos libres. Las celulosanas son polímeros formados por azúcares tales como hexosanas: manano, galactano y glucosano, y pentosanas como xilano y arabano (Lázaro y Arauzo 1994).

La hemicelulosa tiene un peso molecular más bajo que la celulosa y se ramifica con cadenas laterales cortas que consisten en diferentes azúcares, que son polímeros fácilmente hidrolizables. La hemicelulosa sirve de enlace entre la lignina y las fibras de celulosa y da más rigidez a la red celulosa-hemicelulosa-lignina (Fengel y Wegener; Laureano-Pérez *et al.*, citado por Hendriks y Zeeman 2009). La presencia de hemicelulosa reduce el tamaño medio de los poros del sustrato y por lo tanto reduce la accesibilidad de la celulosa a las enzimas hidrolíticas (Saritha *et al.* 2012).

De los tres componentes principales de la lignocelulosa, se ha demostrado que las hemicelulosas son las más sensibles a los cambios en las condiciones de pre tratamiento (Bura, citado por Chandra *et al.* 2007). Es insoluble en agua, pero se disuelve en medio alcalino (Álvarez *et al.* 2014).

2.5.3 CELULOSA

Está conformado por subunidades de D-glucosa unidas por β -1,4 glicosídicos (Fengel y Wegener, citado por Sánchez *et al.* 2010), monosacárido de gran importancia en la fermentación. La celulosa posee dos estructuras una cristalina (organizada) y otra amorfa. Las capas de celulosa son “empaquetados” denominados fibrillas de celulosa. Estas fibrillas son en su mayoría independientes y débilmente vinculados a través de uniones de hidrógeno (Laureano- Pérez, citado por Sánchez *et al.* 2010). Estas microfibrillas (cadenas lineales largas) se encuentran unidas por fuerzas de Van der Waals o por puentes de hidrógeno, dando lugar a una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y con regiones amorfas ideales para la degradación enzimática (Alfonseel *et al.* 1986, Gracida y Pérez 2014).

La celulosa es insoluble en agua, ácidos diluidos y en álcalis. En ácidos concentrados se hidroliza dando D-glucosa (Lázaro y Arauzo 1994).

Este polímero es producto del proceso de fotosíntesis y se deposita en las paredes celulares de plantas superiores, en forma de fibras cristalinas que determinan la dirección del crecimiento celular y confieren la rigidez para el desarrollo de las plantas terrestres (Alfonseel *et al.* 1986). Proporciona rigidez a la pared celular, la cadena de polímeros de celulosa es insoluble y forman microfibrillas cristalinas, que hacen que los azúcares sean de difícil acceso. La región amorfa de la celulosa es la más susceptible a la hidrólisis enzimática (Álvarez *et al.* 2014).

La fuente más importante de este polímero la constituyen las plantas superiores en donde su síntesis es continua con una producción anual de unas 2×10^{11} TM, toneladas métricas (Alfonseel *et al.* 1986).

2.6 PRE TRATAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

La biomasa lignocelulósica se encuentra limitada por varios factores tales como: la cristalinidad de la celulosa, el área superficial y el contenido de lignina (Cortes 2014). El pre tratamiento es un paso esencial para preparar eficazmente la celulosa para la hidrólisis enzimática con altos rendimientos (Saritha *et al.* 2012). Para poder utilizar los azúcares presentes en los materiales lignocelulósicos es necesario realizar uno o varios pre tratamientos que ayuden a la hidrólisis de la lignocelulosa (Hu y Wen, citado por Gracida y Pérez 2014). Esta etapa se hace necesaria debido a que la lignina es una barrera contra el ataque enzimático (Sánchez *et al.* 2010). El pre tratamiento de la biomasa incluye normalmente una reducción de tamaño por picado y/o molido y una humectación química con álcali o ácido (González *et al.* 2011).

Mosier citado por Alvira *et al.* (2010) mencionan que las barreras físicas y químicas causadas por la asociación de los principales componentes de materiales lignocelulósicos, dificultan la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa a azúcares fermentables. Siendo el principal objetivo del pre tratamiento aumentar la accesibilidad enzimática, rompiendo la estructura de la lignina y la estructura cristalina de la celulosa con el fin de obtener azúcares potencialmente fermentables en la etapa de hidrólisis. Como lo mencionan Gracida y Pérez (2014), la misión es generar regiones amorfas que sean débiles ante la hidrólisis. Un pre tratamiento efectivo aumenta la porosidad del material, disminuye la cristalinidad de las fibras de celulosa, remueve la hemicelulosa y reduce la cantidad de lignina presente (González *et al.* 2011).

Álvarez *et al.* (2012) mencionan que la parte importante de trabajar con material lignocelulósico es mejorar su compatibilidad es por ello que existen una infinidad de métodos de modificación superficial, en estos métodos se encuentran los alcalinos, ácidos, agentes compatibilizantes y aquellos materiales lignocelulósicos que no presentan tratamiento alguno. El objetivo de las modificaciones superficiales es mejorar la propiedad del material. Es por ello que existe una variedad de pre tratamientos, ya que, dependerá del tipo de material a trabajar, Alvira *et al.* (2010) mencionan que los pre tratamientos se

pueden clasificar en: biológicos, físicos, químicos y físico-químicos; dependiendo de las diferentes fuerzas o energías consumidas por el proceso.

3.3.1 PRE TRATAMIENTO FÍSICO

Consiste en la reducción en el tamaño de la partícula mediante la molienda, exposición a altas temperaturas, radiación, vapor, secado y humectación. Los principales métodos encontramos el pulverizado mecánico o molienda, pirolisis y agua caliente. La primera expone la celulosa; la segunda se descompone el material en gases y carbón, llevándolo a una temperatura de 300°C y la tercera se utiliza presión (350 – 400 psi), temperatura de 170 – 230 °C por un período de 1 a 46 minutos (Gracida y Pérez 2014).

En el primer método, el material lignocelulósico es fragmentado, triturado y molido (hasta 0.2 – 2 mm) para reducir el tamaño de la partícula y cristalinidad del material lignocelulósico con el fin de aumentar la superficie específica y reducir el grado de polimerización; facilitando de esta manera el acceso de celulasas a las fibras de celulosa y aumentando su conversión (Alvira *et al.* 2010, Cuervo *et al.* 2009).

La molienda requiere en general un gran aporte de energía y su efectividad es limitada; la reducción del tamaño de la partícula afecta la cristalinidad de la celulosa y el tamaño del poro (Duque García 2015).

3.3.2 PRE TRATAMIENTOS QUÍMICOS

a. PRE TRATAMIENTO ÁCIDO

Wyman, citado por Alvira *et al.* (2010) indican que el principal objetivo de este pre tratamiento es de solubilizar la parte de hemicelulosa y hacer que la celulosa sea más accesible a enzimas.

El pre tratamiento ácido diluido es probablemente el método más comúnmente aplicado entre los métodos de pre tratamiento químico. Puede usarse como pre tratamiento de lignocelulosa para la hidrólisis enzimática, o como el método real de hidrolizar a los azúcares fermentables (Tahezadeh y Karimi, citado por Saritha *et al.* 2012). De este proceso se obtiene una fracción líquida rica en azúcares fermentables y una fracción sólida compuesta principalmente de celulosa y lignina; además requiere de una neutralización de pH para evitar la inhibición de la fermentación (Eggeman y Elander, citado por Cuervo *et al.* 2009; Morales 2015).

El método utiliza ácidos diluidos a 1 - 5% o concentrados de 21 – 60%, los ácidos que se emplean son ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico; estos procesos suelen llevarse a temperaturas entre 120 – 160 °C para ácidos diluidos 170 – 190 °C para ácidos concentrados, con una presión de 1 MPa (Gracida y Pérez 2014).

El grado de hidrólisis y la velocidad del proceso dependen de muchos factores, como pH, temperatura, concentración de biomasa hidrolítica, tipo de materia orgánica y tamaño de la partícula. Los principales productos de la hidrólisis en un medio ácido de celulosa son celobiosa y glucosa, y xilosa para hemicelulosas; las reacciones generadas en esta hidrólisis son muy complejas (Aguilar 2010). Durante el pre tratamiento ácido, la primera reacción que ocurre es la hidrólisis de hemicelulosa; las hemicelulosas solubilizadas pueden ser sujeto a reacciones hidrolíticas (Hendriks y Zeeman 2009).

En pre tratamientos que emplean condiciones severas (altas temperaturas y condiciones ácidas) se pueden producir una serie de compuestos potencialmente inhibidores de la hidrólisis, como furaldehídos, ácidos débiles y fenoles. Los furaldehídos más comunes son: HMF (5-hidroxi-metil-2-furaldehído) y furfural (2-furaldehído). El primero se genera por la degradación de las hexosas y el segundo por degradación de pentosas. Los ácidos débiles como: acético, levulínico y fórmico, provienen de la desacetilación de las hemicelulosas o por degradación de HMF. En tanto los fenoles son productos de la degradación de lignina (Duque García 2015).

Este pre tratamiento puede ser complementado con un agente oxidante, tal es el caso del peróxido de hidrógeno; este pre tratamiento peróxido de hidrógeno – ácido acético (HPAC)

es eficaz para la eliminación de lignina de la biomasa según lo indica en el estudio de Song *et al.* (2016), el cual no es trabajado a condiciones de alta temperatura, ni alta presión.

b. PRE TRATAMIENTO ALCALINO

Los pre tratamientos más comunes se llevan a cabo con NaOH, KOH o Ca (OH)₂ (Duque García 2015). Es la adición de bases diluidas a la biomasa y su eficiencia depende del contenido de lignina de los materiales (Cuervo *et al.* 2009).

Carvalho *et al.* (2008) mencionan que este pre tratamiento incrementa la digestibilidad de la celulosa, siendo eficaces para la solubilización de lignina. Se produce un hinchamiento del material separando las uniones de la lignina, la eficacia del tratamiento depende de la cantidad de lignina contenida en el material, la base más usada es el hidróxido de sodio. El material lignocelulósico se trata por un periodo de 24 horas, a una temperatura de 60°C (Acosta; Sun y Cheng, citado por Gracida y Pérez 2014).

La remoción de la lignina aumenta la eficacia de la enzima reduciendo los sitios de adsorción no productivos de las enzimas y aumentando la accesibilidad de la celulosa (Kumar y Wyman 2009).

El pre tratamiento alcalino rompe los enlaces éster entre lignina, hemicelulosa y celulosa, evita la fragmentación de los polímeros de hemicelulosa, remueve lignina y hemicelulosa y aumenta la accesibilidad de las enzimas a la celulosa; este pre tratamiento es más efectivo sobre residuos agrícolas que sobre recursos maderables (Hahn *et al.*; Gaspar *et al.*; Taherzadeh y Keikhosoro, citado por Gonzáles *et al.* 2011). Las primeras reacciones en el pre tratamiento alcalino son la solvatación y saponificación, causando el hinchamiento de la biomasa y el mejor acceso a las enzimas (Hendriks y Zeeman 2009).

En concentraciones alcalinas fuertes se pueden producir disolución, “peeling” de grupos finales, hidrólisis alcalina, y degradación y descomposición de polisacáridos disueltos. La pérdida de polisacáridos es causada principalmente por “peeling” y reacciones hidrolíticas. Este peeling es una ventaja para la posterior conversión, pero, como resultado se forman compuestos de bajo peso molecular, el riesgo de degradación y pérdida de carbono, en forma de dióxido de carbono, también incrementa (Fengel y Wegener, citado por Hendriks y Zeeman 2009).

c. OZONÓLISIS

Es un método de ruptura por medio de ozono, el método consiste en agregar el ozono al material lignocelulósico a una temperatura de 4°C a una concentración de 10 % (p/v), provocando la degradación de hemicelulosa y lignina (Silverstein *et al.*; Ben y Miron, citado por Gracida y Pérez 2014).

d. PRE TRATAMIENTO OXIDATIVO

La biodegradación de lignina puede ser catalizada por la acción de la enzima peroxidasa con la presencia de H₂O₂. En muchos casos el oxidante usado no es selectivo y por lo tanto pueden producirse pérdidas de hemicelulosa y celulosa. Existe un alto riesgo de formación de inhibidores, ya que la lignina se oxida y se forman compuestos aromáticos solubles (Sun y Cheng 2002, Hendriks y Zeeman 2009).

Este pre tratamiento aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática al eliminar cerca del 50% de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas liberando la glucosa durante la sacarificación, dicho estudio fue realizado con bagazo de caña de azúcar (Azzam, citado por Cuervo *et al.* 2009).

3.3.3 PRE TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO

Combina los métodos físicos y químicos, reduciendo el tamaño de la partícula mediante método químico, entre los principales encontramos:

a. EXPLOSIÓN A VAPOR

Utiliza vapor saturado (160 – 260 °C) y presión (0.69 – 4.85 MPa), por un corto período de tiempo, en donde ocurre una autohidrólisis; el agua produce protones que interactúan con el grupo acetilo de la hemicelulosa y se produce ácido acético y oligómeros (Barroso; Soderstrom *et al*, citado por Gracida y Pérez 2014).

La ventaja de este método consiste en la hidrólisis casi completa de la hemicelulosa y poca hidrólisis de lignina. Su desventaja está en la formación de derivados del furano y generación de derivados fenólicos (Barroso, citado por Gracida y Pérez 2014).

b. EXPLOSIÓN DE FIBRA CON AMONIO

Se utiliza una solución que al mezclarse con el vapor a alta temperatura, degrada la estructura lignocelulósica y aumenta la solubilidad de la hemicelulosa. Además se rompen los enlaces lignina- carbohidrato, aumentado cristalinidad de la celulosa y aumento en la porosidad, aumentando el rendimiento de liberación de monosacáridos durante la hidrólisis. El material lignocelulósico se trata con amoniaco en una relación de 1 a 2 kg de amoniaco/ kg de material seco a temperaturas superiores a 90°C por 30 minutos. Se nombra AFEX (*Ammonia Fiber Expansion*) si el proceso es en lotes y FIBEX (*Fiber Expansion*) cuando es continuo (Gracida y Pérez 2014).

Este método permite la recuperación y reutilización de amoniaco, además de que no requeriría de una hidrólisis enzimática. Su desventaja es que el contenido de lignina de la

biomasa deberá ser menor al 15% para obtener un rendimiento del 90% (hemicelulosa y celulosa) en la hidrólisis enzimática, caso contrario se obtendría un rendimiento del 50% (Barroso, citado por Gracida y Pérez 2014).

c. EXPLOSIÓN CON CO₂

Este método se basa en la explosión supercrítica de CO₂, este al disolverse con el agua forma ácido carbónico, el ácido provoca la hidrólisis. Se trata al material con CO₂ en una relación de 4 kg de CO₂ / kg de material, a una presión de 5.62 MPa (Sun y Cheng, citado por Gracida y Pérez 2014; Kumar et al. 2009).

d. EXPLOSIÓN DE VAPOR

En este método la biomasa es tratada con un vapor saturado de alta presión y luego la presión es reducida repentinamente, haciendo que los materiales sufran una descompensación explosiva. Se inicia con una temperatura de 160-260°C, equivalente a una presión de 0.69-4.83 MPa, por algunos minutos; esto promueve a la hidrólisis de la hemicelulosa, el proceso termina con la descompensación explosiva. El agua funciona como ácido a altas temperaturas, de agregarse H₂SO₄ (o SO₂) o CO₂ en este método se reduce el tiempo y temperatura, mejorando la hidrólisis, decrece la producción de compuestos inhibitorios y se remueve completamente la hemicelulosa (Kumar *et al.* 2009).

3.3.4 PRE TRATAMIENTO BIOLÓGICO

Consiste en cultivar organismos sobre el material lignocelulósico, los principales organismos utilizados son los hongos y algunas bacterias: *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus brumalis*, *Polyporus versicolor*, *Trametes sp.*, *Poria sp.*, *Nocardia sp.*, *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Flavobacterium sp.* (Ortiz, citado por Gracida y Pérez 2014).

Existen preparados enzimáticos para degradar el material lignocelulósico específicamente a celulosa y hemicelulosa, entre ellos encontramos a: Viscozyme, complejo multienzimático de β – glucosidasa, arabinasa, celulasa y xilanasas generadas por *Aspergillus aculeatus*; Cellubrix L, es una suspensión de enzimas celulasa y celobiasa generadas por *Trichoderma longibrachatum* y *Aspergillus niger*; Pulzyme HC, producido de una cepa modificada de *Bacillus* sp.; Novozyme, contiene endoglucanasa que viene preparada por una cepa genéticamente modificada de *Aspergillus* sp., y Celluclast que son celulasas producidas por *Trichoderma reesei* (Gracida y Pérez 2014).

2.7 SACARIFICACIÓN

2.7.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR CELULASAS Y COMPLEJO ENZIMÁTICO

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, que en realidad son una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción en conjunto degradan la celulosa (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 y Cheng 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 hidrólisis se puede ver bloqueada por la lignina debido a que no permite el acceso de celulasas a la celulosa y porque se enlaza irreversiblemente a las celulasas (Mosier *et al*, citado por Barrios Hernández 2014).

Tanto las bacterias como los hongos pueden producir celulasas para la hidrólisis de materiales lignocelulósicos (Bisaria, citado por Sun y Cheng 2002). Entre las bacterias que producen celulasas encontramos a *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, y *Streptomyces* mientras que en hongos encontramos a *Sclerotium rolfsii*, *P. chrysosporium*

y especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* (Bisaria, Sternberg, Fan *et al.*, Duff y Murray, citado por Sun y Cheng 2002). Sin embargo, *Trichoderma* es el género más estudiado. El hongo filamentoso *Trichoderma reesei* es un modelo de producción eficiente de celulasas y hemicelulasas (Duque García 2015).

Las celulasas tienen por lo general una estructura modular, formada por un módulo de unión a la celulosa (*carbohydrate binding module*, CBM) y un dominio catalítico (*catalytic domain*, CD), todos unidos por un conector flexible y glucosilado. Los CBM facilitan la transferencia entre la fase soluble y el sustrato insoluble. La unión del CBM a la celulosa libera un oligoglucano de cadena corta, ayudando a la unión con el CD (Duque García 2015).

Las celulasas suelen ser una mezcla de varias enzimas y al menos tres grupos principales de celulasas están implicados en el proceso de hidrólisis: las endoglucanasas, celobiohidrolasas y las β – glucosidasas (Duque García 2015, Sun y Cheng 2002).

Las endoglucanasas (EG, endo-1,4-D-glucanohidrolasa) rompen aleatoriamente los enlaces β -1,4, generando cadenas de glucosas más cortas, disminuyendo de esta manera su grado de polimerización; atacan regiones de baja cristalinidad en la fibra de celulosa (celulosa no cristalina), creando extremos de cadena libres. La configuración de su dominio catalítico, más abierto, es el responsable de su acción aleatorio y su endo-actividad.

Las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH, 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa) que degrada las moléculas lejanas eliminando unidades de celobiosa de los extremos de cadena libres. Hidrolizan los enlaces β -1,4 de la cadena de celulosa a partir de los extremos, generando celobiosas o glucosa. Su actividad se desarrolla sobre la celulosa cristalina. Existen dos tipos de celobiohidrolasas, CBH-I y CBH-II, actúan sobre los extremos reductor y no reductor de la cadena de celulosa, respectivamente. Sus sitios activos se encuentran en un túnel en el CD, atribuyéndole su actividad progresiva.

Las β -glucosidasas que hidroliza la celobiosa y oligosacáridos (celodextrinas) y los hidrolizan a D-glucosa (Duque García 2015, Sun y Cheng 2002). Las β -glucosidasas tienen un papel importante en la hidrólisis, pues la celobiosa es un inhibidor del producto final de muchas celulasas como las exo y endo- glucanasas. A su vez, la β -glucosidasa es inhibida por glucosa y por tanto la hidrólisis es sensible a la concentración de sustrato. Adicionalmente la eficiencia de la hidrólisis será influenciada por el pre tratamiento de los materiales y las condiciones de la hidrólisis enzimática, como el pH y temperatura (Talebnia *et al.* 2010).

La acción hidrolítica de las celulasas puede describirse como un proceso en dos etapas: el primer paso es la conversión de celulosa a celobiosa, por la acción sinérgica de endo- y exo- celulasas, que son fuertemente adsorbidas en la superficie de la celulosa sólida. La segunda etapa, es la conversión de la celobiosa a glucosa por acción de β -glucosidasa, en la fase acuosa (Lázaro y Arauzo 1994). Entre estas tres actividades enzimáticas existen diferentes sinergias, como la sinergia exo-endo en el que la despolimerización de las endoglucanasas generan nuevos extremos sobre los que actúan las exoglucanasas; otra sinergia es la exo-exo en donde la acción combinada de las CBH-I y CBH-II desprenden capas de celulosa, creando así nuevos puntos de unión para las enzimas. Una sinergia muy importante es la de las CBH y la BG, las celobiohidrolasas se inhiben por la celobiosa que producen, por lo que las β -glucosidasas reducen el nivel de celobiosa en el medio (Bezerra y Dias, citado por Duque García 2015).

Álvarez *et al.* (2014) indican que la ruptura hidrolítica de la hemicelulosa requiere de al menos de siete enzimas, que actúan de manera cooperativa, llamadas hidrolasas. Las xilanasas se clasifican según la acción de los sustratos: endo-1,4- β -xilanasas que genera xilo-oligosacáridos al hidrolizar los enlaces β -1,4 glucosídicos de la cadena principal del xilano; 1,4- β -xilosidasa la cual produce xilosa a partir de xilobiosa y de cadenas cortas de xilo-oligosacáridos. Otras enzimas accesorias como α -L-arabinofuranosidasa que elimina L-arabinosa de las cadenas laterales de xilosa; α -glucoronidasa, es una hemicelulosa más común, hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,2 entre residuos de ácido glucurónico y unidades de cadena principal del glucuronoxilano; acetil xilano esterase elimina los grupos O-acetilo de posiciones 2 y/o 3 entre los ácidos glucurónicos y la β -D-

xilanopinanosil, unidades presentes en la cadena del glucuronoxilano; esterasa del ácido ferúlico es fundamental en la hidrólisis enzimática, dado que permite el acceso de las fibras de celulosa debido a la eliminación del ácido ferúlico de las cadenas laterales y α -galactosidasa elimina los residuos de galactosa.

La hidrólisis enzimática de la celulosa es un proceso que transcurre con baja velocidad y está encarecido por el costo de las celulasas y en su caso por la adición de la β -1,4-glucosidasa (González *et al.* 1991).

2.7.2 CELLIC CTEC2

Es un complejo de celulasas para la degradación de celulosa a azúcares fermentables; es una mezcla de celulasas agresivas, con alto nivel de β -glucosidasas y hemicelulasa. Además posee un alto rendimiento de conversión, es eficaz en altas concentraciones de sólidos, tolerante a inhibidores, compatible con múltiples materias primas y pretratamientos, posee alta concentración y estabilidad.

La temperatura y pH óptimo de esta enzima está entre 45-50°C y 5.0-5.5, respectivamente. En un estudio con rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido y con una carga de sólido del 5%, se mantuvo a un pH de 5.0 y a una temperatura de 50°C por un período de 72 horas. Además se probó aplicar la enzima Cellic® CTec2 sin lavar el material pretratado y con mayor carga de sólido. Esta enzima puede ser complementada con Cellic® HTec2 para un mejor rendimiento.

Las condiciones de almacenamiento recomendadas de Cellic® CTec2 son de 0-25°C en envases protegidos del sol. Las mismas pierden su actividad conforme pase el tiempo. Si se mantiene almacenado por períodos largos y/o condiciones adversas, se requerirán dosificaciones más altas.

Las enzimas también se consideran adecuadas para trabajar con materias primas como: bagazo de caña de azúcar, mazorca de maíz, fibra de maíz y pulpa de madera. Cabe resaltar que la respuesta a las dosis dependerá de la materia prima, pre tratamiento y condiciones del proceso (Novozymes 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de: Biotecnología Ambiental – Unidad de Biorremediación y CIQTobia (Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental), ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias, el primero pertenece al Departamento Académico de Biología mientras que el segundo al Departamento Académico de Química; dichos laboratorios forman parte de la Universidad Nacional Agraria “La Molina” (UNALM).

3.1 MATERIALES

3.1.1 MATERIA PRIMA

Los residuos de caña de azúcar, maíz y cascarilla de arroz fueron recolectados de los departamentos: Lambayeque, La Libertad y Lima (Tabla 1). Las muestras fueron tomadas secas en el campo.

Tabla 1. Lugares de recolección de residuos

Lugares de Recolección	Tipo de Residuo
Valle de San Juan	Residuos de caña
Valle de Chicama	
Paramonga	
Valle Receptor	Residuos de maíz
Santa Clara	
Reque	
Motupillo	
Asociación Traposa	
Asociación Peruana de Molineros de Arroz	Cascarilla de arroz
Molino Sudamérica	

3.1.2 EQUIPOS DE LABORATORIO

Se utilizaron los siguientes equipos:

- Shaker Orbital Incubator
- pH- metro marca HANNA 6400
- Balanza de precisión
- Baño María
- Agitador magnético con regulador de temperatura
- Vórtex
- Brixometro
- Micropipetas de 0.5 – 10 ul, 20 – 200 ul, 100 – 1000 ul y 1 – 10 ml
- Dispensador de 1 a 5 mL
- Sellador de bolsas
- Espectrofotómetro UV/Vis
- Refrigerador
- Biorreactor de 30 L de capacidad

3.1.3 REACTIVOS

Se utilizaron:

- Hidróxido de potasio (2%, 4% y 6%)
- Ácido acético (5%, 10% y 15%)
- Silicato de potasio (5%, 10% y 15%)
- Peróxido de hidrógeno (5%, 10% y 15%)
- Ácido clorhídrico 1 M
- Ácido acético glacial
- Acetato de sodio
- Ácido sulfúrico concentrado al 97.98%
- Fenol 5%
- Ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS)
- Tartrato de sodio y potasio
- Agua destilada

3.1.4 MATERIALES DE LABORATORIO

Se utilizaron los siguientes materiales:

- Tubos de ensayo de 15 x 250 mm
- Tubos de ensayo de 16 x 100 mm
- Fiolas de 50, 100 y 1000 ml
- Erlenmeyers de 250, 500 y 1000 ml
- Vasos de precipitado de 100, 250 y 1000 ml
- Pipetas de 1 y 10 ml
- Probetas de 100 y 1000 ml
- Termómetro de mercurio
- Varilla de vidrio
- Papel aluminio
- Bolsas de plástico
- Tubos eppendorfs (2 mL).
- Tips de 0.5-10 ul, 20 – 200 ul, 100 – 1000 ul y 1 – 10 ml
- Guantes desechables
- Mascarilla descartables
- Papel toalla
- Papel tissue
- Bombilla
- Pisceta
- Gradillas para tubos de 16 x 100 mm y 15 x 250 mm
- Espátula
- Cinta masking.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 ENSAYOS PRELIMINARES

En esta etapa se realizó una diversidad de ensayos en los que se probó concentraciones de las sustancias delignificantes para cada uno de los tres pre tratamientos, porcentaje de materia lignocelulósica (peso de material/ volumen de solución delignificante), soluciones delignificantes trabajadas por separado y soluciones en mezcla, proporción de soluciones a agregar para generar la mezcla de solución (para el caso del pre tratamiento nuevo), pH, temperatura, acondicionamiento de material para la hidrólisis enzimática y tamaño de material lignocelulósico.

Para la mayoría de los puntos mencionados se tomó como criterio de selección los °Brix, pH y método cualitativo de azúcares reductores mediante la reacción de Benedict. En el caso de acondicionamiento del material pre tratado se tomó en cuenta la cantidad de lavados y el consumo de soluciones para el ajuste de pH, hidróxido de potasio o ácido clorhídrico, dependiendo del pre tratamiento trabajado.

Cabe mencionar que cada ensayo se realizó con los tres residuos. En el Anexo 10 se muestran algunos resultados obtenidos en esta etapa. Las proporciones y porcentajes de soluciones trabajadas en el presente estudio, son de la selección de los ensayos preliminares, tomando como mejores aquellos que indicaron un pH cercano para las enzimas, menor uso de soluciones para ajustar el mismo y °Brix.

Los ensayos realizados en esta etapa se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental–Biorremediación.

3.2.2 MOLIENDA

Una vez transportados al CEMTRAR los residuos pasaron al proceso de picado (malla N° 3), luego se almacenaron al vacío en bolsas negras de 25 kg de capacidad. Las bolsas se

mantuvieron en un ambiente seco fuera del alcance de la luz en las instalaciones de CEMTRAR. Seguidamente las muestras se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Ambiental – Biorremediación.

Las muestras picadas fueron molidas a un tamaño aproximado de 1mm x 1 mm, para los residuos de caña de azúcar y maíz. Los residuos de cascarilla de arroz fueron manejados bajo su condición natural. La finalidad de la molienda aparte de aumentar el área de superficie del material es de homogenizar los residuos de caña de azúcar y maíz.

3.2.3 PRE TRATAMIENTOS DE LOS RESIDUOS

Las soluciones delignificantes que se usaron para los pre tratamientos fueron los siguientes; tratamiento alcalino: hidróxido de potasio y peróxido de hidrógeno a las concentraciones de 2 por ciento, 4 por ciento y 6 por ciento para el primero, y 5 por ciento, 10 por ciento y 15 por ciento para el segundo; para el pre tratamiento ácido se trabajó con ácido acético glacial al 5 por ciento, 10 por ciento y 15 por ciento, y peróxido de hidrógeno al 5 por ciento, 10 por ciento y 15 por ciento. Finalmente para el pre tratamiento nuevo se trabajó con silicato de potasio al 5 por ciento, 10 por ciento y 15 por ciento, y peróxido de hidrógeno al 5 por ciento, 10 por ciento y 15 por ciento.

El tiempo de incubación, temperatura, proporción de residuo: solución delignificante y proporción de soluciones delignificantes a agregar, se basó del estudio de Song *et al.* (2016), las cuales indican condiciones óptimas de: 3 horas, 70°C, 10 por ciento (p/v) y 1:1.

Las proporciones de reactivos para los pre tratamientos ácido y alcalino fueron las mismas (1:1), en el caso del pre tratamiento nuevo varió la proporciones de soluciones a agregar esta fue de 0.2: 0.5, basado en ensayos preliminares.

Finalizado el tiempo de incubación se tomó los °Brix y pH de las muestras. Ambas mediciones como referenciales. Para la selección del mejor pre tratamiento se consideró realizar análisis de azúcares totales (Dubois *et al* 1956).

Los ensayos en esta etapa se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental – Biorremediación (B2).

3.2.4 MEDICIÓN DE AZÚCARES TOTALES

Terminado el proceso de pre tratamiento, la parte sólida se separó de la líquida; esta última fue almacenada a 4°C en eppendorf, para su análisis de azúcares totales. La metodología fenol-ácido para el análisis de azúcares totales se basó en el método descrito por Dubois *et al.* (1956).

El análisis se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental (CIQTOBIA). Más detalle del método en el Anexo 9.

3.2.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Con los residuos pre tratados, seleccionados cada pre tratamiento según la cantidad de azúcares totales, se realizaron ensayos de sacarificación enzimática, en donde se varió las concentraciones de la enzima (10 por ciento, 20 por ciento y 30 por ciento), con porcentajes similares al estudio de Salcedo *et al.* (2011) ; el sustrato se mantuvo fijo a un 5 por ciento (p/v). La determinación de las concentraciones óptimas fue evaluada por la cantidad de azúcares reductores producidos en esta etapa.

El sustrato estuvo sumergido en buffer acetato de sodio 50 mM, pH de 5.0, en tubos de ensayo de 15 x 250 a 50° C con una agitación de 150 rpm, durante 72 horas. Las condiciones mencionadas se basaron en la ficha técnica de la enzima trabajada (Cellic Ctec2 de Novozyme).

La evaluación se realizó en tres días y el parámetro que se consideró fue el de azúcares reductores, mediante los análisis de Miller (1959) modificado.

3.2.6 MEDICIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Finalizado el proceso de hidrólisis enzimática, la parte líquida fue separada de la sólida. La primera se guardó a 4°C hasta su análisis. La medición de azúcares reductores se basó en la metodología modificada de Miller (1959).

La metodología se describe con más detalle en el Anexo 9, previo a los análisis se probaba si la coloración era muy fuerte para que el valor esté dentro de la curva de calibración, para ello se procedía a hacer diluciones de la muestra hasta que el valor esté dentro de la curva, finalmente se multiplicaba por el factor de dilución. Las evaluaciones de este análisis se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental- Biorremediación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRIMERA ETAPA

4.1.1 Determinación de los pre tratamientos óptimos

El pre tratamiento es la etapa más importante ya que tiene un impacto en el rendimiento y eficiencia de la etapa de hidrólisis enzimática (Dagnino *et al.* 2014). En esta etapa el objetivo es reducir la cantidad de lignina de los residuos lignocelulósicos de cascarilla de arroz, caña de azúcar y maíz; mediante pre tratamientos químicos que se mencionan en el apartado 3.2.3.

Los pre tratamientos fueron comparados con un control durante tres horas a 70 °C con agitación constante de 150 rpm. Los análisis de cada uno de los pre tratamientos de los residuos lignocelulósicos se muestran a detalle en los anexos 3, 4 y 5. En la Tabla 2 se muestra las concentraciones de los tres pre tratamientos trabajados. Pasado el tiempo de incubación de los residuos lignocelulósicos, se midió el pH y °Brix del líquido resultante; tanto la parte líquida como la sólida se almacenaron a 4° C, la primera hasta su análisis de azúcares totales y la segunda para su cambio de pH.

El análisis de azúcares totales según la metodología de (Dubois *et al.* 1956). El criterio de selección de tratamiento óptimo se basó en evaluación de azúcares totales para cada pre tratamiento y el gasto de reactivos. En la tabla 3, se observa los resultados considerados como óptimos, basados en el análisis estadístico de los azúcares totales que se muestran en los Anexos 3, 4 y 5; y en el Anexo 2 se muestran los resultados totales.

Tabla 2. Características de los tres pre tratamientos para los tres residuos lignocelulósicos

Pre tratamiento	Tratamientos									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Ácido (%H ₂ O ₂ - %CH ₃ COOH)	0-0	5-5	5-10	5-15	10-5	10-10	10-15	15-5	15-10	15-15
Nuevo (%H ₂ O ₂ - %Silicato de potasio)	0-0	5-5	5-10	5-15	10-5	10-10	10-15	15-5	15-10	15-15
Alcalino (%H ₂ O ₂ - %KOH)	0-0	5-2	5-4	5-6	10-2	10-4	10-6	15-2	15-4	15-6

a. Cascarilla de arroz

En la Figura 1 se muestra la comparación de azúcares totales (AT) obtenidos en los tres pre tratamientos, el análisis estadístico (comparación múltiple de LSD-Fisher) de cada pre tratamiento se muestra en el Anexo 3. En la Tabla 2, se muestra la leyenda de la Figura 1.

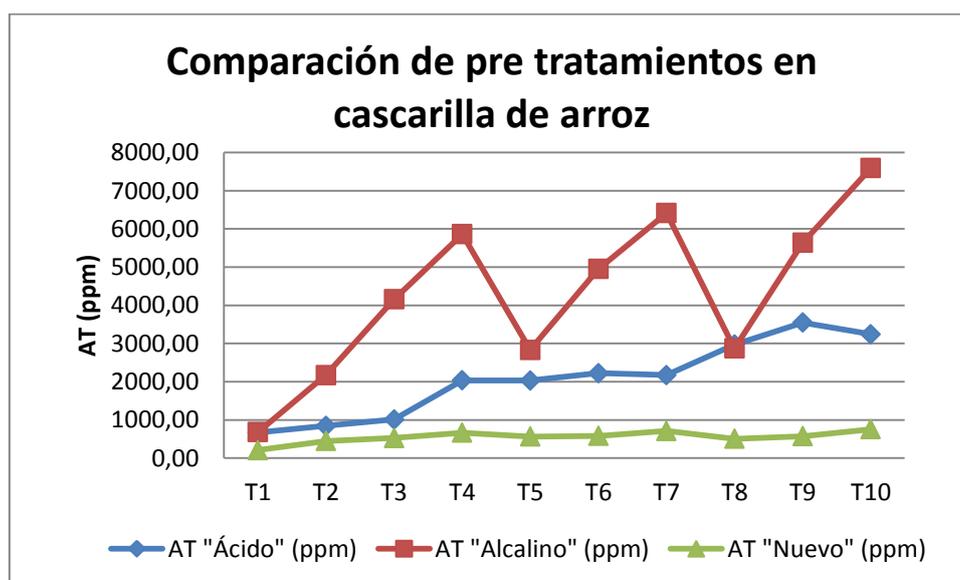


Figura 1. Comparación de AT (ppm) en los tres pre tratamientos de Cascarilla de Arroz.

Como se observa en la Figura 1, para el pre tratamiento ácido se escogió el T9 (15-10), en el pre tratamiento alcalino el T10 (15-6) y para el pre tratamiento nuevo el T10 (15-15); en todos estos pre tratamientos la elección del óptimo pre tratamiento se basó en la mayor cantidad de azúcares totales, así como de las corridas estadísticas para ver la diferencia significativa entre tratamiento.

b. Residuos de Caña de azúcar

El análisis para los residuos de Caña de Azúcar se realizaron con la comparación múltiple de LSD-Fisher, para aquellos que no cumplían los supuestos se modeló con Valident y la elección se basó en el valor de AIC, con un menor valor. El análisis estadístico completo se muestra en el Anexo 4.

La comparación de los tres pre tratamientos realizados se muestra en la Figura 2. La leyenda es la misma que se muestra en la Tabla 2.

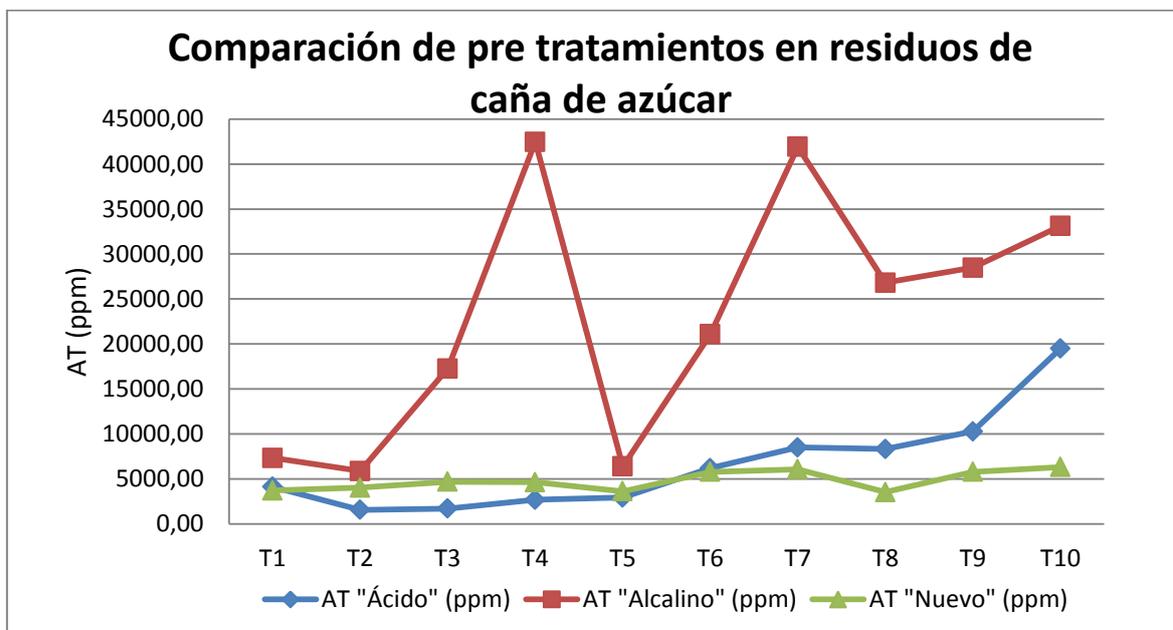


Figura 2. Comparación de AT (ppm) de los tres pre tratamientos en Residuos de Caña de Azúcar

La elección del pre tratamiento óptimo para este residuo fue la siguiente: pre tratamiento ácido se escogió el T10 (15-15) tomando como criterio la mayor cantidad de azúcares totales; para el pre tratamiento alcalino se escogió el T4 (5-6), en este caso si bien no hay diferencia significativa con el T7 se consideró la cantidad de reactivo a usar; y para el pre tratamiento nuevo se escogió el T7 (10-15), el criterio para la selección de este tratamiento se basó en el pH, pensando en un menor gasto para el proceso de neutralización.

Los análisis estadísticos se muestran en el Anexo 4 y en el Anexo 2 los resultados de pH. Cabe resaltar que para el caso del pre tratamiento nuevo, las diferencias no significativas para el tratamiento óptimo se encontraban en varios, se basó en una elección económica para la siguiente etapa (cambio de pH para la muestra pre tratada).

c. Residuos de Maíz

El análisis estadístico para este residuo requirió de modelación Valident para el pre tratamiento ácido, mientras que los pre tratamientos alcalino y nuevo no requirieron de dicha modelación. Los análisis a más profundidad se muestran en el Anexo 5.

Para los residuos de maíz, la comparación de AT (ppm) de los tres pre tratamientos, se muestra en la Figura 3. La respectiva leyenda es la que se muestra en la Tabla 2.

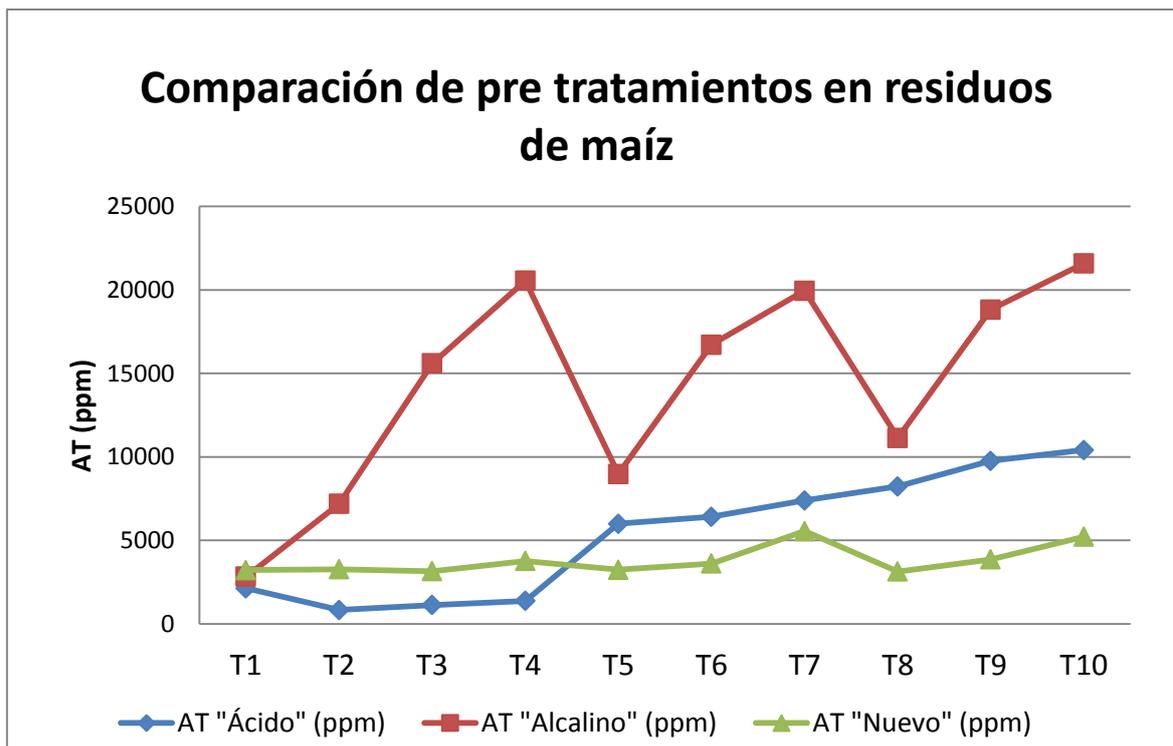


Figura 3. Comparación de AT (ppm) de los tres pre tratamientos en Residuos de Maíz

La elección de los óptimos para los residuos de maíz se basó en la mayor cantidad de azúcares totales según los análisis estadísticos, la no diferencia significativa, y en la menor cantidad de peróxido de hidrógeno. Los óptimos de los pre tratamientos son: pre tratamiento ácido el T9 (15-10), pre tratamiento alcalino el T4 (5-6) y pre tratamiento nuevo el T7 (10-15).

En los datos presentados en la Tabla 3 se observa que la mayor liberación de azúcares totales se logra con el pre tratamiento alcalino para los tres residuos lignocelulósicos, ello se debe a que el pre tratamiento alcalino rompe los enlaces hemicelulosa – lignina, ocasionando que se reduzcan los contenidos de lignina y hemicelulosa en la biomasa pre tratada, alterando la estructura de la lignina residual, y que se aumente la porosidad y la superficie externa de la biomasa; esto debido a que el álcali provoca la degradación del éster y cadenas lateral (saponificación de los enlaces éster intermoleculares), alternado de esta manera a la lignina, provocando disminución del grado de cristalinidad de la celulosa y solvatación parcial de la hemicelulosa, facilitando de esta manera la penetración de las moléculas de agua a las capas interiores de la biomasa (Gonzáles

et al. 2011, Morales 2015, Karp *et al.* 2013). Talebnia *et al.* (2010) indican que el pre tratamiento alcalino y pre tratamiento con peróxido son más eficaces en la eliminación de lignina, en tanto que el pre tratamiento con ácido diluido es más eficiente en la solubilización de hemicelulosa.

Tabla 3. Tabla resumen de valores máximos de azúcares totales (AT) de los tres residuos lignocelulósicos en cada pre tratamiento

Pre tratamiento	Cascarilla de arroz	Residuos de Caña de azúcar	Residuos de Maíz
Ácido (ppm)	3546,30	19475,79	9764,78
Alcalino (ppm)	7592,76	42472,34	20552,11
Nuevo (ppm)	758,27	6063,56	5559,61

El pre tratamiento ácido en tanto altera la estructura de la lignina, hidroliza la hemicelulosa a xilosa y otros azúcares, con la desventaja de formar sustancias tóxicas (Morales 2015); viéndose en la Tabla 3 que es el segundo valor alto en la liberación de azúcares totales. Además Wi *et al.* (2015) y Song *et al.* (2016) consideran que el pre tratamiento ácido acético – peróxido de hidrógeno elimina la lignina sin el uso de altas temperaturas o ácidos fuertes.

Yang y Wyman (2008) refieren un pre tratamiento donde se controla el pH, e indica que con este proceso se puede liberar ácidos orgánicos que se disocian en iones de hidrógeno y promueven la hidrólisis catalizada por ácido de la celulosa a glucosa, este proceso de formación de iones de hidrógeno se ve favorecido por temperaturas altas. Si se observa en la Tabla 3 para los tres residuos lignocelulósicos se aprecia que el pre tratamiento nuevo presentó una menor liberación de azúcares totales, siendo un posible indicador de que la temperatura con la que se debió de trabajar tendría que haber sido más alta.

El pre tratamiento oxidativo tiene un efecto similar al alcalino, con la diferencia que la decristalinización de la celulosa no está definida y no tiene efecto en la solubilización de hemicelulosa; además un riesgo alto de formación de inhibidores, ya que, la lignina se oxida y se forman compuestos aromáticos solubles (Hendriks y Zeeman 2009). Ello podría explicar por qué el pre tratamiento nuevo no logró una mayor liberación de azúcares totales.

En este trabajo a todos los pre tratamientos se les adicionó peróxido de hidrógeno; la adición de un agente oxidante (oxígeno/ H_2O_2) al pre tratamiento alcalino, puede mejorar el rendimiento al favorecer la eliminación de lignina (Carvalho *et al.* 2008). El peróxido de hidrógeno puede potenciar la conversión enzimática de la lignocelulosa en azúcar a través de la deslignificación oxidativa y la reducción de la cristalinidad de la celulosa. El pre tratamiento de peróxido de hidrógeno utiliza la deslignificación oxidativa para separar y solubilizar la lignina y aflojar la matriz celulósica de lignina, de este modo se podría mejorar la digestibilidad enzimática (Gould; Martel y Gould, citado por Yu *et al.* 2009).

En las Figuras 4, 5 y 6 se observa que los pre tratamientos alcalinos oscilan en un pH de 8 a 12. Talebnia *et al.* (2010) hacen mención que la deslignificación con peróxido alcalino de residuos agrícolas depende del pH, siendo el óptimo de 11.5-11.6. Además se menciona que un pH menor a 10 la deslignificación es insignificante y con pH mayor a 12.5 no hay efecto en la digestibilidad enzimática. En la Tabla 4 se muestra que los pre tratamientos con mayor liberación de azúcares totales se encuentra muy cercano al 11.5, en tanto que los pre tratamientos ácido y nuevo que presentan un pH menor a 10 presentan menor liberación de azúcares totales.

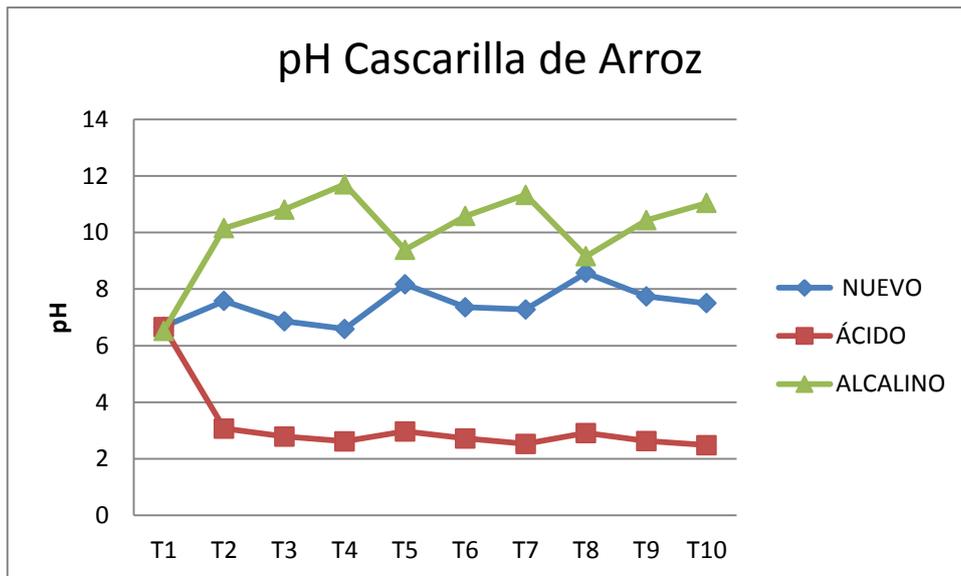


Figura 4. pH de Cascarilla de Arroz pre tratada

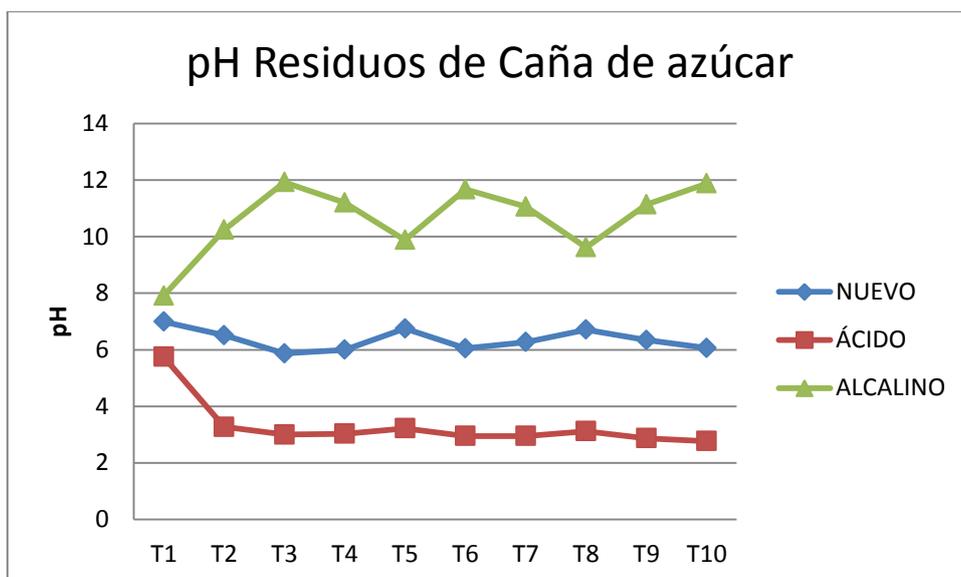


Figura 5. pH de Residuos de Caña de azúcar pre tratada.

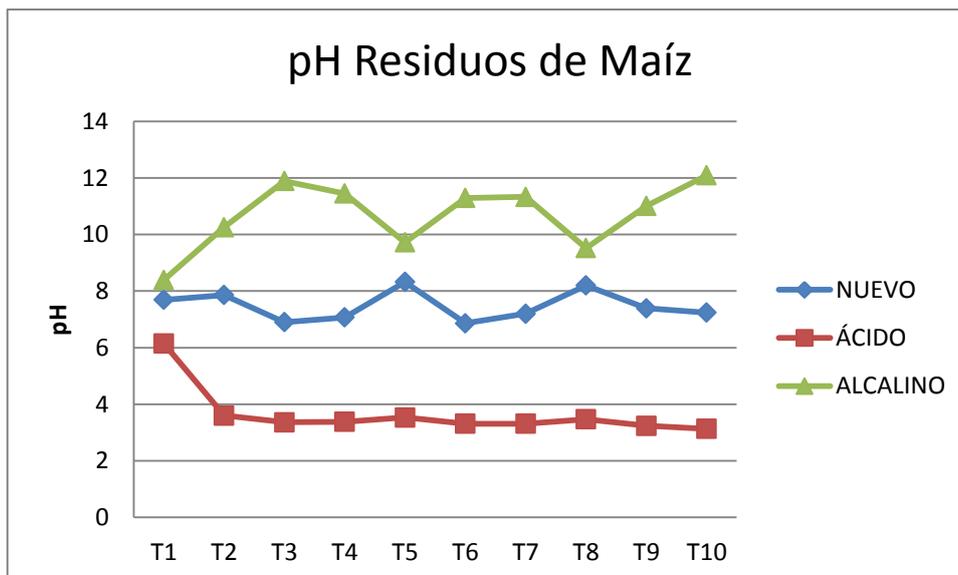


Figura 6. pH de Residuos de Maíz pre tratada

Yang y Wyman (2008) mencionan un nuevo enfoque de pre tratamiento, el cual consiste en controlar el pH cerca a condiciones neutrales (4 a 7), este control puede mejorar la susceptibilidad de celulosa a las enzimas y evitar la formación de productos de degradación de monosacáridos, furfural e hidroximetil furfural que interfieren en la hidrólisis enzimática, además de lograr una disminución de cristalinidad de la celulosa y una disociación de celulosa con lignina. En la Tabla 4 se muestra el pH de los pre tratamientos seleccionados, se observa que el pre tratamiento nuevo ingresa en un pre tratamiento de pH controlado y con altas expectativas para la etapa de hidrólisis enzimática; sin embargo, este pre tratamiento debería de ser trabajado a altas temperaturas, pese a ello los resultados de pH son muy similares a los que se indicaron en la parte de arriba.

Tabla 4. Resumen de pH de pre tratamientos seleccionados

	Cascarilla de Arroz	Residuos de caña	Residuos de maíz
Ácido	2.63	2.77	3.24
Alcalino	11.04	11.20	11.45
Nuevo	7.50	6.27	7.20

Como se aprecia en la Tabla 4 el pre tratamiento nuevo presenta un pH muy cercano a la neutralidad, esto debido a que el silicato de potasio presenta un carácter alcalino, un pH entre 10.5 – 11; este producto es usado para elevar el pH de los suelos de selva;

ayuda a suelos con déficit de silicio y potasio, el primero ayuda en el desarrollo y crecimiento de las plantas, facilita la toma de fósforo, controla metales pesados, controla toxicidad de aluminio. Aparte de darle protección mecánica a las plantas (KLAIDA s. f.).

4.2 SEGUNDA ETAPA

4.2.1 Optimización de hidrólisis enzimática

En base a la selección de los pre tratamientos óptimos se trabajó para esta etapa variando el porcentaje de la enzima Cellic Ctec2. En la Tabla 5 se muestra los tratamientos en esta etapa.

El objetivo de esta etapa fue evaluar la mayor liberación de azúcares reductores, para lo cual se trabajó a condiciones óptimas de la enzima Cellic CTec2 a 50 mM de buffer acetato de sodio, pH de 5 y a 50° C de temperatura por 72 horas. La evaluación de los azúcares se realizó para cada 24 horas para comparar valores y encontrar una máxima liberación de azúcares reductores en menor tiempo (días). Se muestra con mayor detalle el análisis estadístico de esta etapa en los Anexos 6, 7 y 8, y los resultados completos en el Anexo 2. El análisis estadístico se basó en una comparación múltiple de LSD-Fisher.

En esta etapa el peso del material pre tratado se realizó en base a su peso seco haciéndose una equivalencia al peso fresco; se determinó el porcentaje de humedad para realizar la equivalencia, el peso de cada material trabajado se muestra en el Anexo 1. Según Dagnino *et al.* (2014) se debe evitar el secado del material pre tratado por el colapso de la estructura a lo que llevaría a disminuir el rendimiento de la hidrólisis enzimática. Así mismo Viñals-Verde *et al.* (2012) mencionan que en la reacción enzimática la velocidad de reacción depende del tamaño de la partícula, materia prima, calidad y composición del complejo enzimático, inactivación enzimática, entre otros.

Tabla 5. Tratamientos trabajados en hidrólisis enzimática

% Enzima	Días		
	Día 1	Día 2	Día 3
0% E	T1	T1	T1
10 %E	T2	T2	T2
20% E	T3	T3	T3
30% E	T4	T4	T4

a. Cascarilla de arroz

- Tratamiento Ácido

Para el tratamiento ácido se seleccionó el tratamiento T4 D1 (4902,90 ppm), si bien en la Figura 7 se muestra no hay diferencias significativas entre los tratamientos T4 D3, T4 D1 y T4 D2. La selección se basó en el menor gasto de energía, días. La corrida estadística se muestra completa en el Anexo 6.

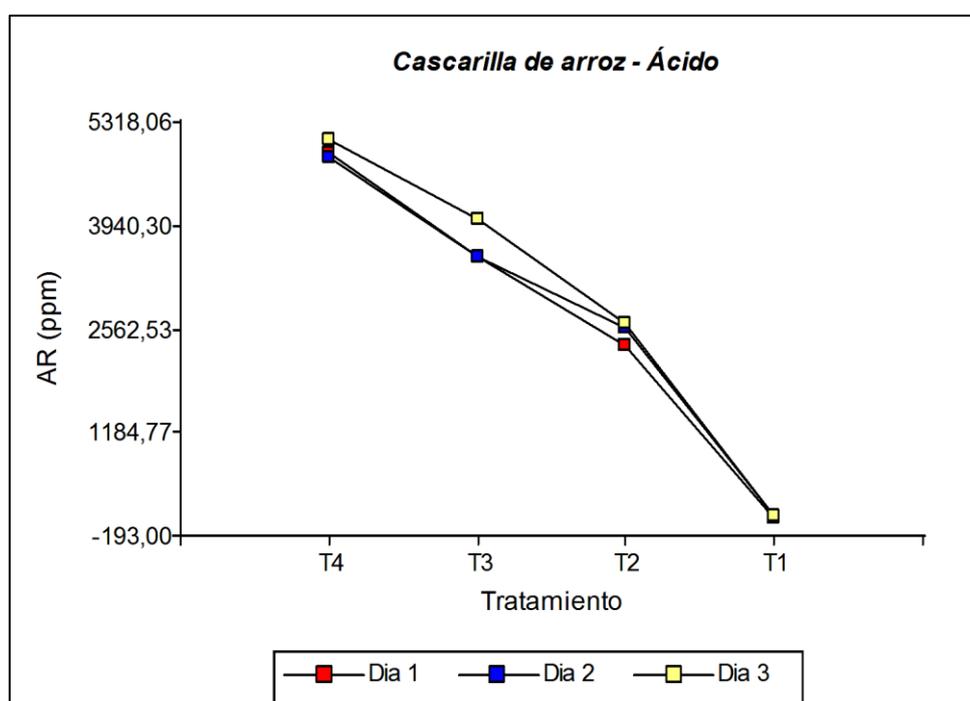


Figura 7. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Cascarilla de Arroz "Ácida"

En el estudio de Bardales *et al.* (2015) trabajaron con cascarilla de arroz la cual primero secaron para luego molerla a un tamaño de 0.5 a 1 mm; a este residuo molido lo sometieron a diferentes tratamientos de hidrólisis: una hidrólisis química con H_2SO_4 al 1.25 por ciento (v/v) con un sistema de decocción por 30 minutos el cual obtuvo 11.738 g/L de azúcares reductores, una hidrólisis químico- física con H_2SO_4 al 1.25 por ciento (v/v) con un sistema de autoclave a $120^\circ C$ por 30 minutos a 15 psi obtuvo 19.353 g/L de azúcares reductores y una hidrólisis mixta (hidrólisis química seguida de la hidrólisis químico-física) en el que se trabajó con H_2SO_4 al 1.25 por ciento (v/v) con un sistema de decocción por 30 minutos y luego una hidrólisis con H_2SO_4 al 1.25 por ciento (v/v) en autoclave a $120^\circ C$ por 30 minutos a 15 psi obteniendo un valor de azúcares reductores totales de 24.189 g/L. En este estudio se obtuvo una cantidad de 4.902 g/L de azúcares reductores cuyo material no fue reducido de tamaño, fue pre tratado con peróxido de hidrógeno y ácido acético glacial (15 por ciento -10 por ciento) y sometido a una hidrólisis enzimática con celulasas al 30 por ciento de enzimas (v/p) a 24 horas. Comparando los valores obtenidos en el estudio de Bardales *et al.* (2015) en sus diferentes hidrólisis se aprecia que el valor de este estudio fue menor ello se debería principalmente a que el material no fue reducido de tamaño, evitando de esta manera el aumento del área de superficie, además no se trabajó temperaturas elevadas ni a una presión elevada. Cabe resaltar que Talebnia *et al.* (2010) indicaron que el uso de partículas muy pequeñas puede ser no deseable por el mayor consumo de energía en la etapa de molienda.

- **Tratamiento Alcalino**

El pre tratamiento alcalino presentó una mayor liberación de azúcares reductores en el tratamiento T4 D3 (19300.85 ppm) en base a la corrida estadística que se muestra en la Figura 8. En el Anexo 6 se muestra el análisis estadístico completo.

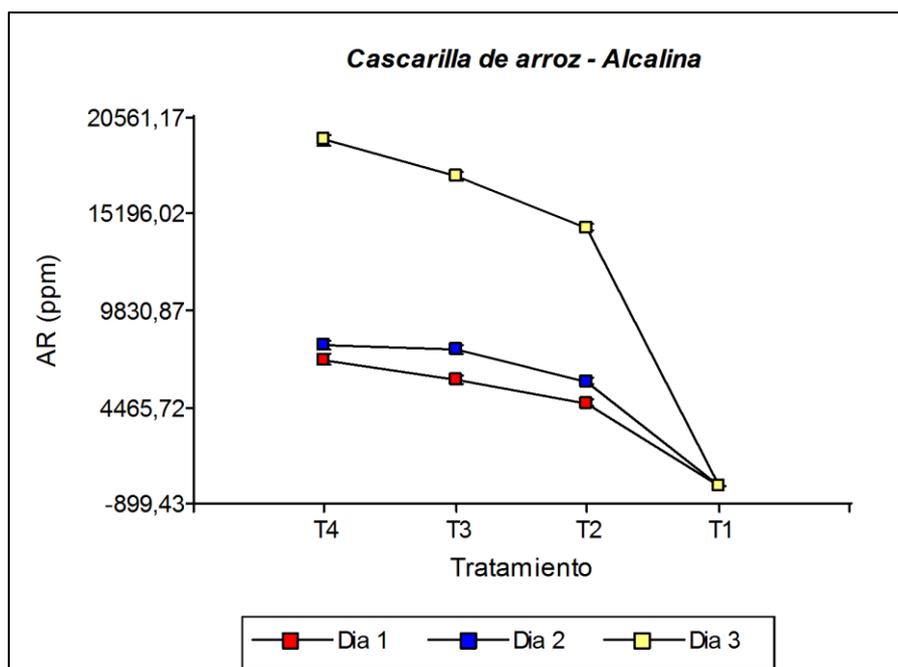


Figura 8. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Cascarilla de Arroz "Alcalina"

Bardales *et al.* (2015) trabajaron tres tipos de hidrólisis con la cascarilla de arroz molida, la hidrólisis química trabajada con NaOH al 1.25 por ciento (p/v) logró un valor de 1.273 g/L de azúcares reductores, la hidrólisis químico- física trabajada con NaOH obtuvo un valor de 1.445 g/L de azúcares reductores y la hidrólisis mixta (hidrólisis química seguida de la hidrólisis químico-física) obtuvo un valor de 0.732 g/L de azúcares reductores totales; la hidrólisis química la trabajaron bajo un sistema de decocción por 30 minutos, en tanto que la hidrólisis químico- física bajo un sistema de autoclave (120°C por 30 minutos a 15 psi). En este estudio se obtuvo un valor de 19.30 g/L de azúcares reductores, la cascarilla de arroz no fue molida, fue pre tratada con peróxido de hidrógeno e hidróxido de potasio (15 por ciento – 6 por ciento) y finalmente hidrolizado con celulasas al 30 por ciento (v/p) por 72 horas. El valor de azúcares reductores obtenido en este trabajo fue mucho mayor, aproximadamente 15 veces más para la hidrólisis química e hidrólisis químico-física, y 26 veces mayor en la hidrólisis mixta, en comparación al estudio que se mencionó al inicio.

- Tratamiento Nuevo

La hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz previamente sometida a un pre tratamiento nuevo muestra que los tratamientos T4 D2 y T4 D1 no presentan diferencia significativa; se optó por el tratamiento T4 D1 (4526.11 ppm) como mejor tratamiento por requerir menor tiempo (días) de incubación. En este tratamiento se aprecia que para lograr una mayor cantidad de azúcares reductores se requiere de una mayor cantidad de celulasas y que respecto al tiempo de incubación, entre las 24 y 48 horas, no hay una diferencia significativa cuando la cascarilla de arroz ha sido sometida a un pre tratamiento con peróxido de hidrógeno y silicato de potasio. En la Figura 9 se observa lo mencionado anteriormente. La corrida estadística completa se presenta en el Anexo 6.

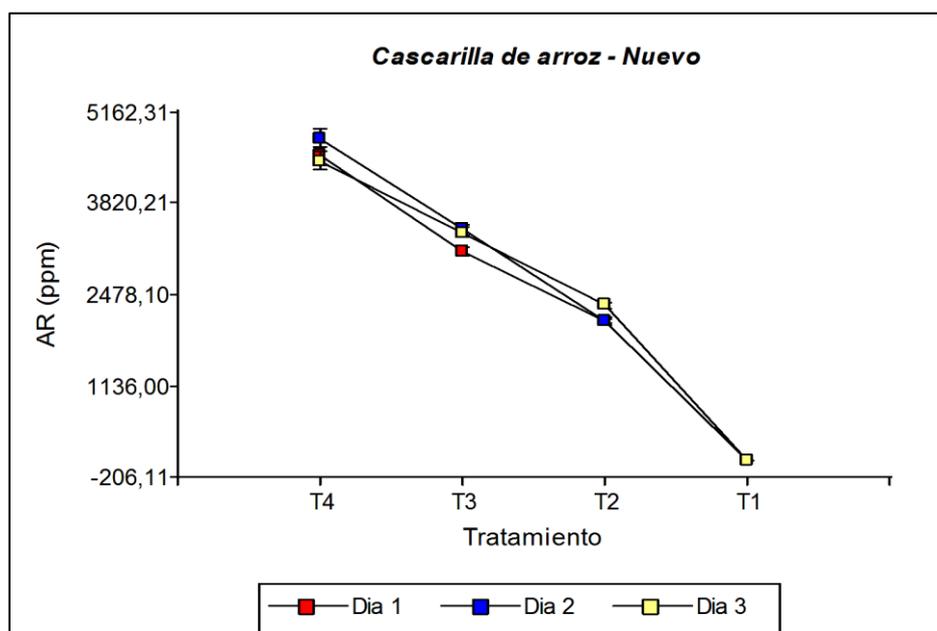


Figura 9. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Cascarilla de Arroz "Nuevo".

En la Figura 10 se muestra que no hay diferencia muy marcada entre el tratamiento nuevo y el ácido, en tanto que el tratamiento alcalino es tres veces mayor que el tratamiento ácido y cuatro veces mayor que el tratamiento nuevo. Con ello se consideró que la mayor liberación de azúcares reductores se obtiene cuando el material es pre tratado de manera alcalina, escogiéndose este para el escalamiento semi piloto.

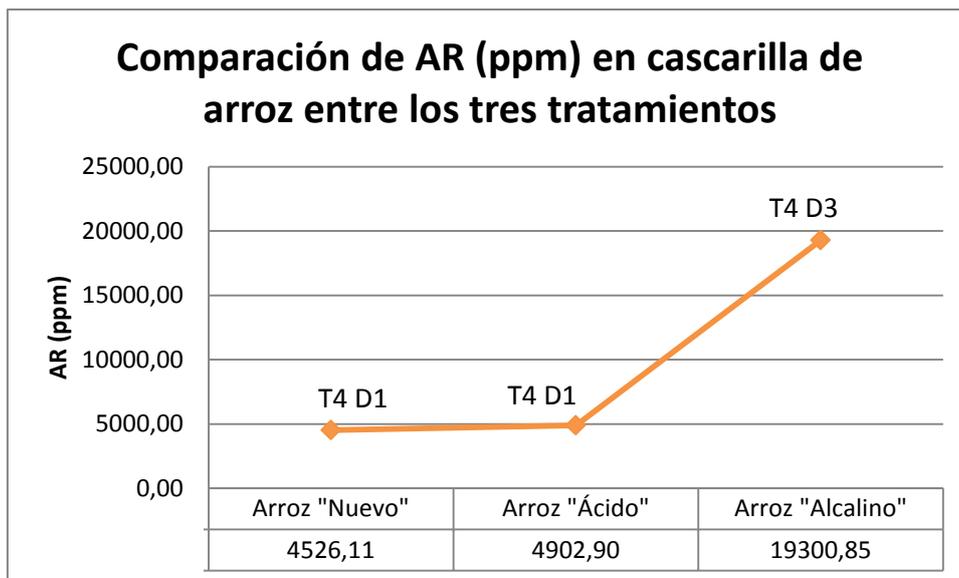


Figura 10. Comparación de los tres tratamientos óptimos en Cascarilla de Arroz.

b. Residuos de Caña de Azúcar

- Tratamiento Ácido

El análisis estadístico de azúcares reductores de residuos de caña de azúcar con tratamiento ácido no presentaron diferencias significativas los tratamientos: T4 D1, T4 D2 y T4 D3, como se observa en la Figura 11. Se seleccionó el T4 D1 (9610.30 ppm) cuyo criterio de selección se basó en el menor costo de energía, menor tiempo de incubación. En el Anexo 7 se presenta el análisis estadístico completo.

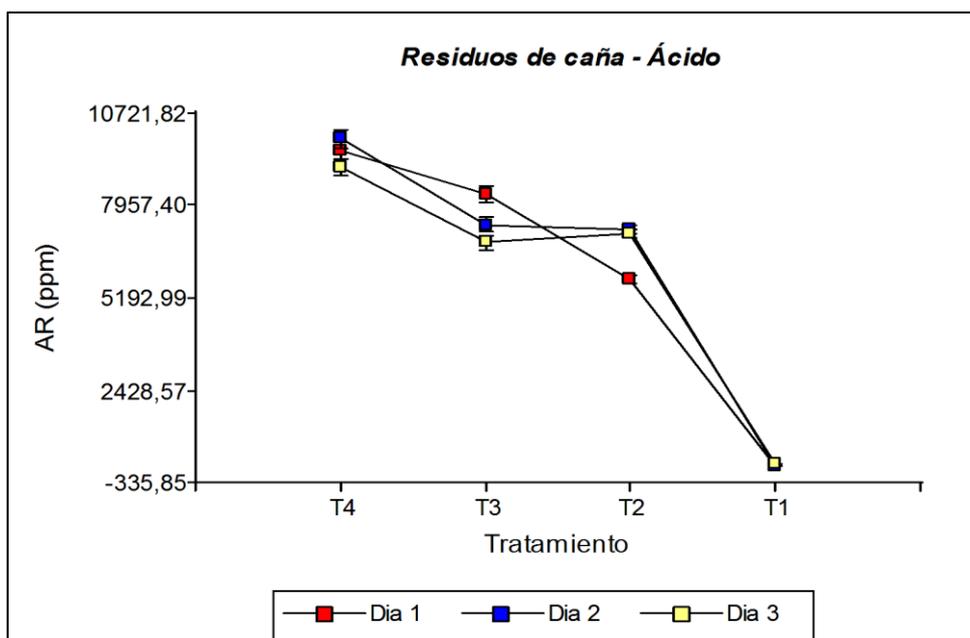


Figura 11. Comparación de los Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Caña "Ácida"

Un estudio realizado por Bardales *et al.* (2015) en el que trabajaron con tres hidrólisis diferentes para hojas de caña de azúcar obtuvieron los siguientes valores de azúcares reductores: 12.805 g/L para la hidrólisis química con H₂SO₄ al 1.25 por ciento (v/v) bajo decocción por 30 minutos; 22.836 g/L para la hidrólisis químico-física con H₂SO₄ al 1.25 por ciento (v/v) a 120°C por 30 minutos a 15 psi y 29.215 g/L la hidrólisis mixta continua (hidrólisis química seguida de una hidrólisis químico-física). En este estudio el valor obtenido de azúcares reductores fue de 9.610 g/L, siendo este valor más bajo que el estudio mencionado, cabe resaltar que en este estudio se trabajó con los residuos de la caña de azúcar en general no sólo con hojas de la misma.

- Tratamiento Alcalino

Para los residuos de caña de azúcar con tratamiento alcalino no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos T3 D2 y T3 D3, como se puede observar en la Figura 12, en este caso se seleccionó el tratamiento T3 D2 (29829.42 ppm) en el que se consideró el menor tiempo de días de incubación. En el Anexo 7 se muestra la corrida completa. Además se aprecia que en este tratamiento la mayor liberación de azúcares reductores se logra con un porcentaje de 20 por ciento (v/p) de celulasas.

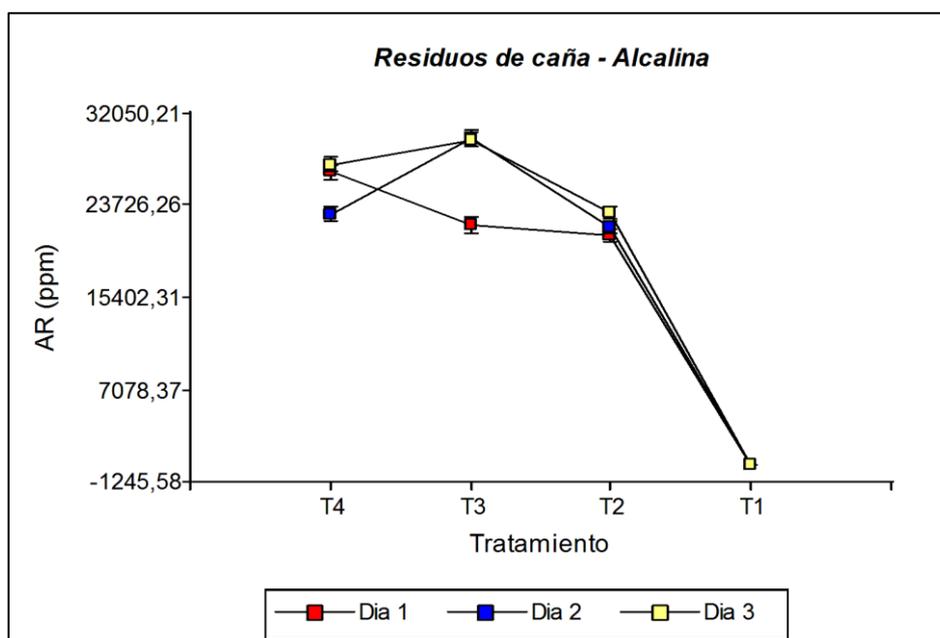


Figura 12. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Caña "Alcalino"

En el estudio de Bardales *et al.* (2015) trabajaron con hojas de caña de azúcar molido bajo una hidrólisis alcalina, NaOH al 1.25 por ciento (p/v), esta hidrólisis tuvo tres variaciones: la primera bajo un sistema de decocción por 30 minutos en el que se obtuvo 1.356 g/L de azúcares reductores, la segunda bajo un sistema de autoclave a 120°C por 30 minutos a 15 psi y se obtuvo 2.176 g/L de azúcares reductores y la tercera variación que era una combinación de las dos primeras variaciones en el que se obtuvo 1.983 g/L de azúcares reductores. En tanto que en este estudio se obtuvo 29.829 g/L de azúcares reductores, aun habiéndose trabajado con los residuos de caña de azúcar y no sólo las

hojas, a pesar de ello los resultados obtenidos en este estudio es mucho mayor al estudio Bardales *et al.* (2015).

- Tratamiento Nuevo

El análisis estadístico mostró que el tratamiento con mayor liberación de azúcares reductores fue el tratamiento T4 D2 (5307.30 ppm), para este residuo de caña de azúcar que fue sometido a un pre tratamiento nuevo necesita de un 30 por ciento (v/p) de celulasas por un periodo de incubación de 48 horas. En el Anexo 7 se muestra la corrida estadística completa, en tanto que en la Figura 13 se observa la comparación de los azúcares reductores de los tratamientos trabajados.

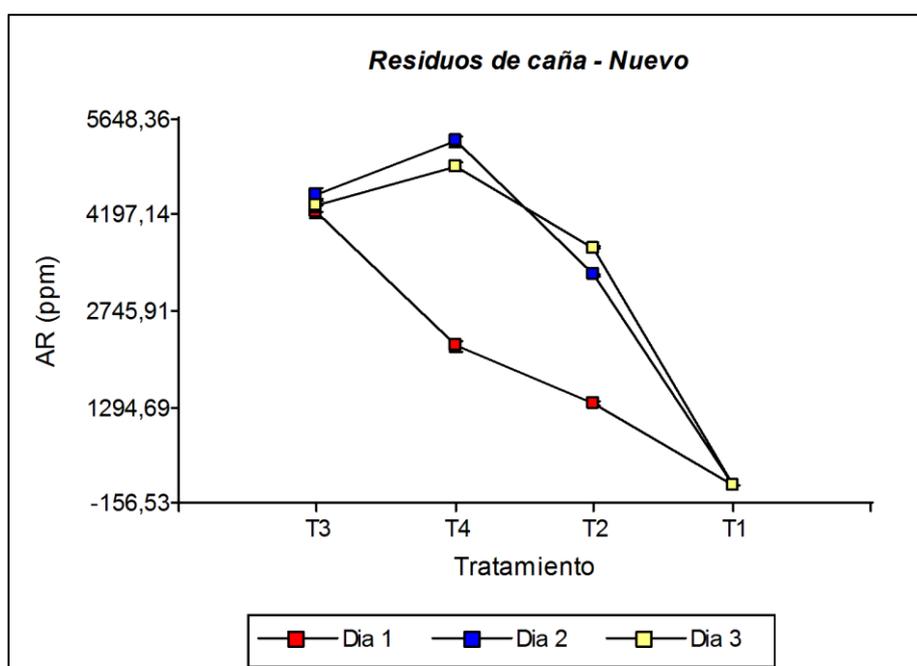


Figura 13. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Caña "Nuevo"

En la Figura 14 se aprecia que el tratamiento alcalino es tres veces mayor que el tratamiento ácido y cinco veces mayor que el tratamiento nuevo. En tanto que el tratamiento ácido es casi dos veces mayor que el tratamiento nuevo.

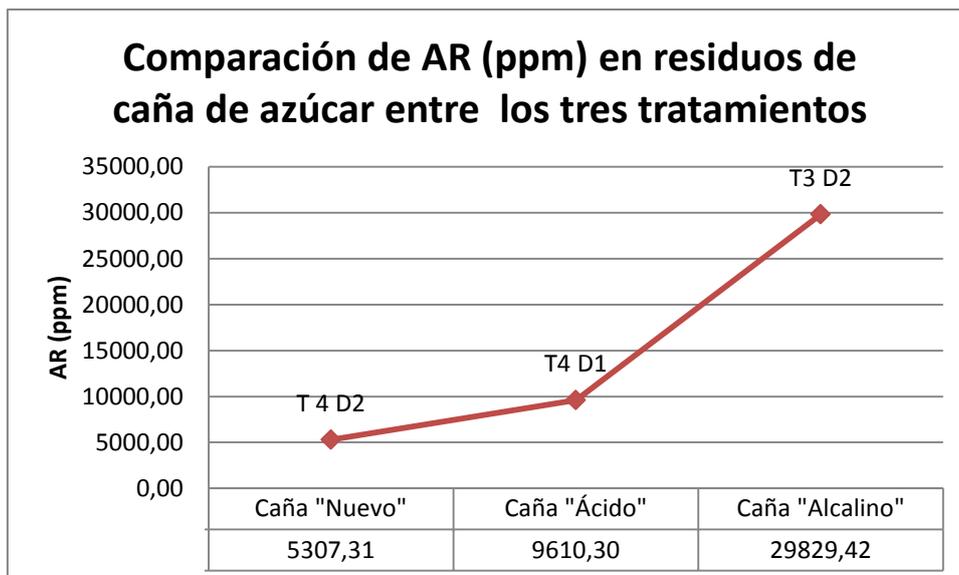


Figura 14. Comparación de los tres óptimos en los tres tratamientos de Residuos de Caña de Azúcar.

c. Residuos de Maíz

- Tratamiento Ácido

El análisis de residuos de maíz muestra que no hay diferencias significativas en los valores de azúcares reductores de los tratamientos T4 D2, T4 D1 y T4 D3, como se aprecia en la Figura 15. Se seleccionó el tratamiento T4 D1 (13955.65 ppm) por un tema de costo de energía, menor tiempo de incubación. En el Anexo 8 se muestra con más detalle la parte estadística.

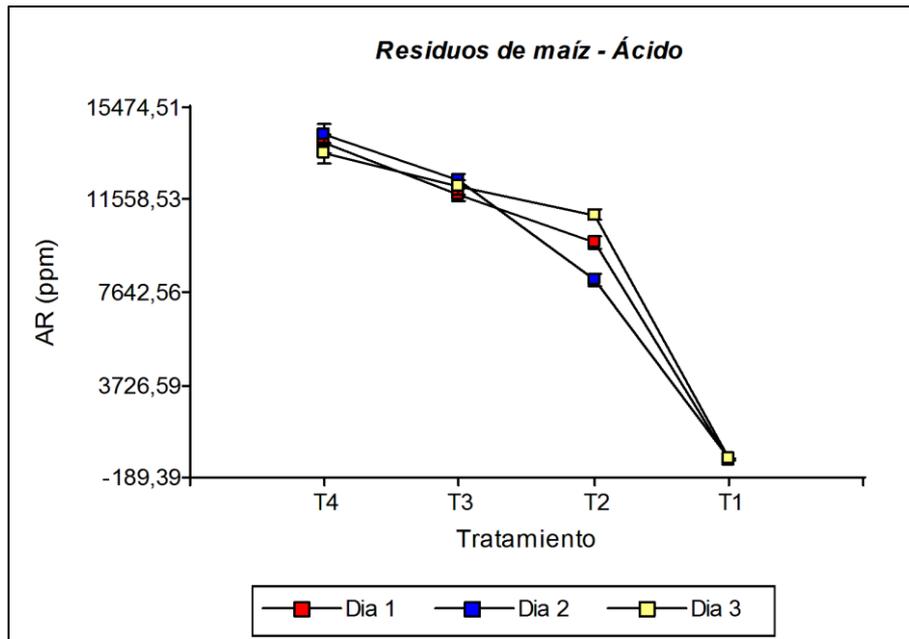


Figura 15. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Maíz "Ácido"

Chauca Espinoza *et al.* (2017) y Bardales *et al.* (2015) realizaron los mismos procesos de hidrólisis con la diferencia que los primeros trabajaron con la planta completa de maíz y los segundos trabajaron con la broza y la coronta de manera separada, además se diferencian en los procesos de secado. En el estudio de Chauca Espinoza *et al.* (2017) la planta pasó por un proceso de secado al ambiente durante 3 días y luego un secado a estufa de 4 a 6 horas en tanto que el estudio de Bardales *et al.* (2015) los materiales se secaron a 70°C por 1 hora. Posteriormente el tamaño se redujo de 0.5 mm a 1 mm. El valor de azúcares reductores obtenidos mediante la hidrólisis química en el estudio de Chauca Espinoza *et al.* (2017) de 39.14 g/L en tanto que en el estudio de Bardales *et al.* (2015) los valores que se obtuvieron fueron de 29.02 g/L y 4.1 g/L para broza y coronta, respectivamente. En la hidrólisis químico-física los valores de azúcares totales que se obtuvieron fueron de 82.94 g/L, 42.68 g/L y 9.937 g/L para los ensayos de la planta completa, broza y coronta, según el orden mencionado. Finalmente en la hidrólisis mixta se obtuvieron valores de azúcares reductores de 84.48 g/L, 53.93 g/L y 20.22 g/L, en el mismo orden que se mencionó en la hidrólisis químico-física. En el presente estudio se obtuvo un valor de 13.955 g/L, este valor es menor a los valores obtenidos en los dos estudios mencionados, esto se debería a que se trabajó con un ácido débil aun cuando fue suplementada con un agente oxidante, a la baja temperatura de trabajo y la falta de presión.

- Tratamiento Alcalino

El tratamiento alcalino mostró no tener diferencias significativas entre los tratamientos T4 D2, T4 D1 y T3 D1. Se seleccionó el T3 D1 (20663.79 ppm) por el menor uso de enzima y ahorro de energía, menor tiempo de incubación. En la Figura 16 se muestra la gráfica de comparación. En el Anexo 8 se muestra el análisis estadístico completo.

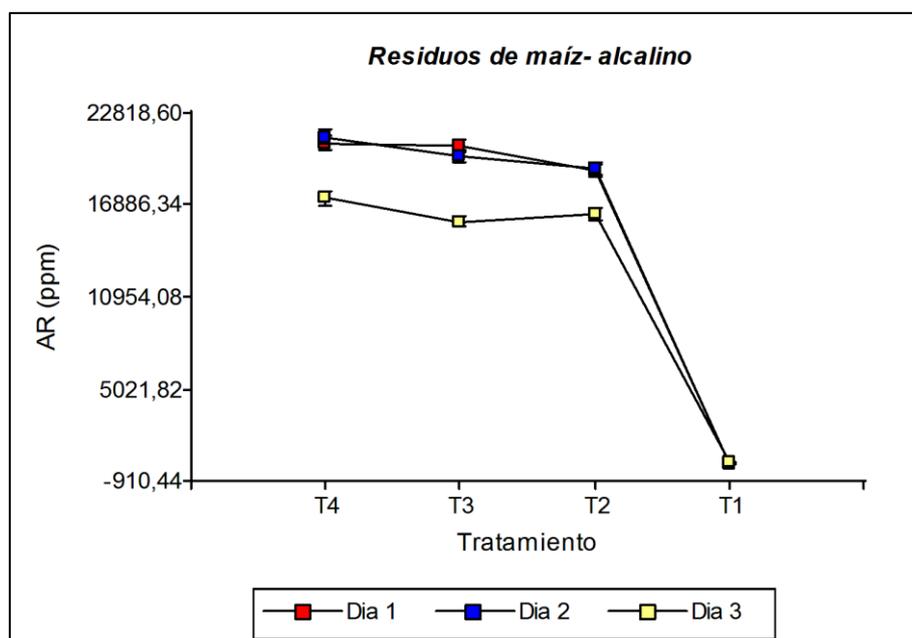


Figura 16. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Maíz "Alcalino"

Chauca Espinoza *et al.* (2017) obtuvieron valores de 1.58 g/L de azúcares reductores en la hidrólisis química, para la hidrólisis químico-física se obtuvo el valor de 2.84 g/L y la hidrólisis mixta el valor de 2.71 g/L, en los tres casos al trabajar con NaOH al 1.25 por ciento (p/v). Por otro lado Bardales *et al.* (2015) que trabajó con broza y coronta obtuvo los siguientes valores en las tres hidrólisis, en la hidrólisis química se obtuvo los valores de 1.56 g/L y 2.117 g/L, en la hidrólisis químico-física se obtuvo los valores de 2.828 g/L y 3.203 g/L y la hidrólisis mixta se obtuvo los valores de 2.68 g/L y 0.817 g/L. En este estudio se obtuvo un valor de 20.663 g/L de azúcares reductores, siendo este valor mucho mayor a los dos estudios mencionados.

- **Tratamiento Nuevo**

Para este caso se mostró que no había diferencias significativas en los tratamientos: T3 D3, T3 D2, T4 D2 y T4 D3, como se observa en la Figura 17. Se escogió el T3 D2 (14047.48 ppm) por el menor uso de enzima y menor tiempo de incubación. Se aprecia con los resultados que la cantidad de enzima usada no se diferencia significativamente, en tanto al tiempo de incubación entre las 48 y 72 horas tampoco se muestra diferencia.

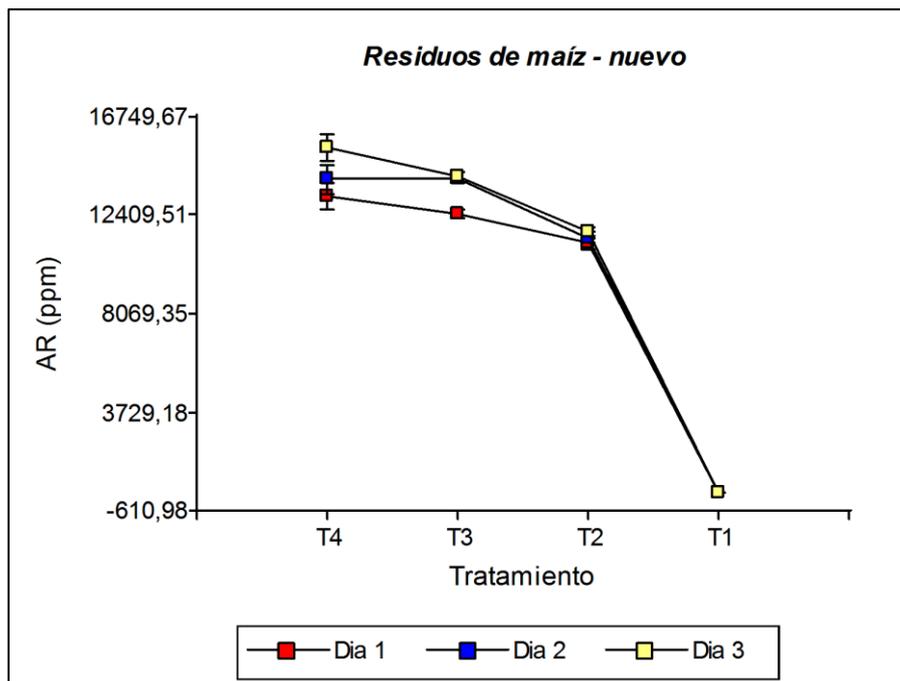


Figura 17. Comparación de Azúcares Reductores (AR) en Residuos de Maíz "Nuevo"

No se evidencia una diferencia marcada entre los tratamientos nuevo y ácido, en tanto que el tratamiento alcalino es dos veces mayor que nuevo y el ácido. Lo mencionado se observa en la Figura 18.

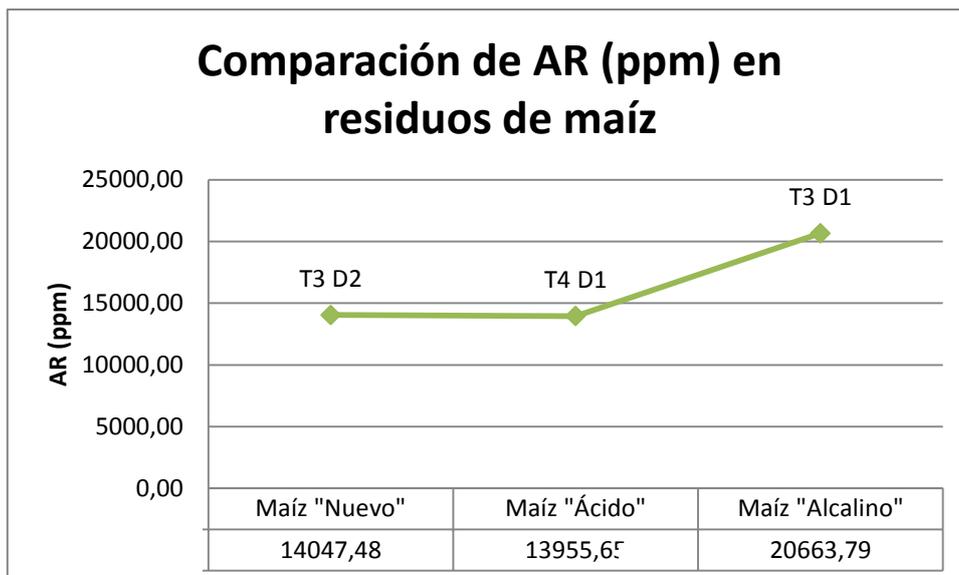


Figura 18. Comparación de los óptimos en los tres tratamientos de Residuos de Maíz.

En la Figura 19 se muestra un resumen de los tres residuos lignocelulósicos trabajados, se aprecia que la mayor cantidad de azúcares reductores obtenidos fueron con un pretratamiento alcalino y en los residuos de caña de azúcar, seguido de los residuos de maíz y finalmente cascarilla.

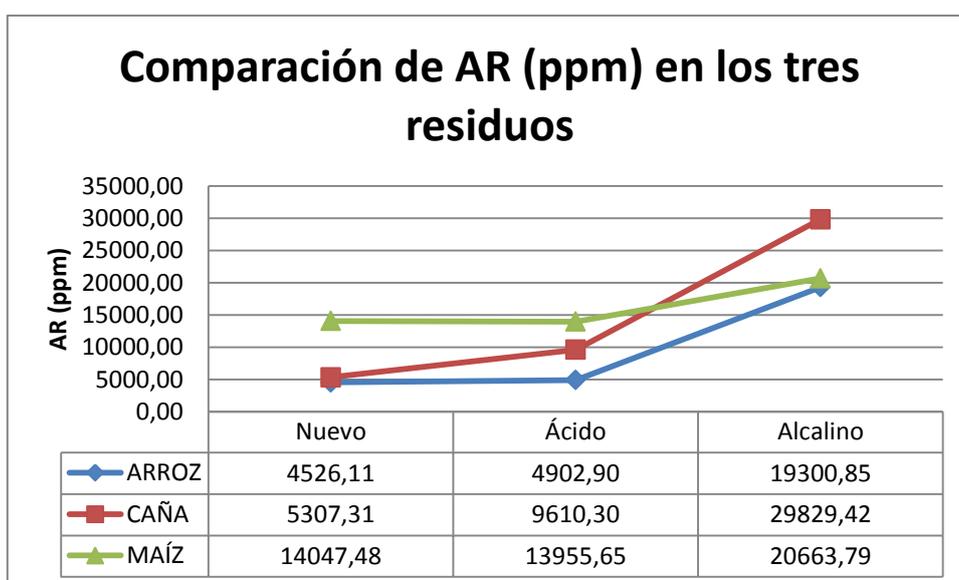


Figura 19. Resumen de hidrólisis enzimática en los tres residuos

4.3 TERCERA ETAPA

4.3.1 Escala semi piloto

En esta etapa se realizó el escalamiento de los tratamientos seleccionados en la segunda etapa, la cantidad de material usado se basó en la disponibilidad de material pre tratado de manera alcalina y a la disponibilidad de la enzima Cellic CTec2 (Novozyme). Las condiciones para el trabajo fueron de 50°C, con 50 mM de buffer acetato de sodio, el tiempo de incubación varió según la materia prima así como la selección de la hidrólisis enzimática óptima, la agitación del reactor durante el tiempo de incubación fue de 38 RPM, que representa la velocidad máxima del equipo.

a. Cascarilla de arroz

Se trabajó con equivalencia de peso seco; el peso inicial y final, así como el volumen de buffer inicial y final se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Peso y volumen obtenidos de escala semi piloto de Cascarilla de arroz

	Peso seco (g)	Volumen (L)
Inicial (Día cero)	220.00	6.40
Final (Día tres)	130.90	4.91
Diferencia	89.10	1.49

Se aprecia que el volumen del buffer es 1.3 veces menor al final que al inicio, en tanto el peso seco en el inicio es 1.7 veces mayor que el peso final. Se obtiene un rendimiento del 5.98 por ciento, es decir, que no hubo una hidrólisis significativa de la cascarilla de arroz. Además se cuantificó la cantidad de azúcares reductores del líquido obtenido en el pre tratamiento y el de la finalización de la hidrólisis enzimática para corroborar el aumento de la cantidad de azúcares reductores, en la Tabla 7 se muestran dichos resultados, mientras que en la Tabla 8 se muestra la comparación del mismo

tratamiento en los ensayos que se realizaron en los tubos de ensayo (hidrólisis enzimática – segunda etapa) y el ensayo con el reactor (tercera etapa).

Tabla 7. Azúcares reductores (ppm) de Cascarilla de arroz

	AR (ppm)
Pre tratamiento	1172,18
Hidrólisis enzimática	19300,85

La cantidad de azúcares reductores que se aprecia en la Tabla 7 a las 72 horas de incubación es aproximadamente 16 veces mayor que el del pre tratamiento, indicando la degradación de celulosa en la cascarilla de arroz pre tratada de manera alcalina (15 por ciento – 6 por ciento) y luego hidrolizado con celulasas al 30 por ciento (v/p) por 72 horas.

En la Tabla 8 se observa que no hay diferencia marcada en los valores de azúcares reductores y °Brix de los ensayos del mismo tratamiento en tubos de ensayo y en el reactor, segunda y tercera etapa, respectivamente.

Tabla 8. Azúcares reductores (ppm) en segunda y tercera etapa de Cascarilla de Arroz

	AR (ppm)	°Brix
Tubo de ensayo	19300,85	3.4
Semi piloto	19048,26	3.2

b. Residuos de Caña de azúcar

Se trabajó con equivalencia de peso seco; el peso inicial y final, así como el volumen de buffer inicial y final se muestran en la Tabla 9, lográndose un rendimiento de 23.34 `por ciento, lo que indica que hubo una disminución de los residuos de caña de azúcar durante la hidrólisis enzimática para la liberación de azúcares reductores.

Tabla 9. Escala semi piloto de Residuos de Caña de Azúcar

	Peso seco (g)	Volumen (L)
Inicial (Día cero)	210.54	4.224
Final (Día dos)	46.25	3.520
Diferencia	164.29	0.704

En la Tabla 10 se aprecia que el valor de azúcares reductores luego de agregarse celulasas al 20 por ciento (v/p) por 48 horas es seis veces mayor que el pre tratamiento alcalino (5 por ciento – 6 por ciento) luego de 3 horas de incubación.

Tabla 10. Azúcares reductores (ppm) de Residuos de Caña de Azúcar

	AR (ppm)
Pre tratamiento	4599,92
Hidrólisis enzimática	29829,42

En tanto que en la Tabla 11 se aprecia que la cantidad de azúcares reductores del mismo tratamiento es menor en la etapa semi piloto (tercera etapa) que en los ensayos de tubo de ensayo (segunda etapa). Lo mismo se refleja en los °Brix.

Tabla 11. Azúcares reductores (ppm) en segunda y tercera etapa de Residuos de Caña

	AR (ppm)	°Brix
Tubo de ensayo	29829,42	4.6
Semi piloto	25147,28	3.4

c. Residuos de Maíz

Se trabajó con equivalencia de peso seco; el peso inicial y final, así como el volumen de buffer inicial y final se muestran en la Tabla 12, donde se aprecia obtener un rendimiento de 30.9 por ciento, siendo este el mayor porcentaje con respecto a los residuos de cascarilla de arroz y residuos de caña de azúcar.

Tabla 12. Escala semi piloto de Residuos de Maíz

	Peso seco (g)	Volumen (L)
Inicial (Día cero)	246.10	4.922
Final (Día uno)	23.00	4.200
Diferencia	223.10	0.722

Con respecto a los azúcares reductores presentados en la Tabla 13 se aprecia que el valor de la etapa del pre tratamiento es 40 veces menor que el de la etapa de hidrólisis enzimática.

Tabla 13. Azúcares reductores (ppm) de Residuos de Maíz

	AR (ppm)
Pre tratamiento	510,90
Hidrólisis enzimática	20663,79

En la Tabla 14 se comparan los valores de azúcares reductores obtenidos del tratamiento con celulasas al 20 por ciento (v/p) incubado por 24 horas en la etapa de escalamiento semi piloto (tercera etapa) y tubos de ensayo (segunda etapa).

Tabla 14. Azúcares reductores (ppm) en segunda y tercera etapa de Residuos de Maíz

	AR (ppm)	°Brix
Tubo de ensayo	20663,79	2.8
Semi piloto	22989,73	3.1

Notamos que en la etapa de escalamiento semi piloto los valores de azúcares reductores son muy similares a los trabajados en los tubos de ensayo, se logró un mayor rendimiento en los residuos de maíz, seguido de los residuos de caña de azúcar y por último la cascarilla de arroz. Además se nota que la agitación no es un factor determinante en la liberación de azúcares, en tuyo de ensayo se manejó una agitación de 150 RPM mientras que en la escala semi piloto una agitación de 38 RPM.

V. CONCLUSIONES

1. La mayor cantidad de azúcares totales obtenidos en el pre tratamiento fue de 7592.76 ppm (arroz), 42472.34 ppm (caña) y 20552.11 ppm (maíz), en tanto que la mayor cantidad de azúcares reductores en la hidrólisis enzimática fue de 19300.85 ppm (arroz), 29829.42 ppm (caña) y 20663.79 ppm (maíz).
2. Las concentraciones óptimas de sustancias delignificantes para el pre tratamiento ácido fue de 15%-10% (arroz y maíz) y 15%-15% (caña), para el pre tratamiento alcalino de 15%-6% (cascarilla) y 5%-6% (caña y maíz) y para el pre tratamiento nuevo de 15%-15% (arroz) y 10%-15% (caña y maíz).
3. La concentración óptima de celulasas para la mayor liberación de azúcares reductores para la cascarilla de arroz fue de 30% (v/p), residuos de caña de azúcar residuos de maíz fue de 20% (v/p).
4. En los ensayos semi piloto los valores obtenidos de azúcares reductores fueron muy cercanos a los de la etapa de selección de hidrólisis enzimática, para la cascarilla de arroz se obtuvo un valor de 19048.26 ppm, los residuos de caña de azúcar un valor de 25147.28 ppm y los residuos de maíz un valor de 22989.73 ppm.

VI. RECOMENDACIONES

- Estudiar más a profundidad la parte líquida del pre tratamiento para su posible utilización en el proceso de fermentación para generar etanol de segunda generación, con una levadura capaz de fermentar azúcares reductores de cinco carbonos.
- Se recomienda hacer un estudio sobre recuperación de enzimas en la parte líquida del material hidrolizado, abaratando el costo y uso de las enzimas celulíticas.
- Ampliar estudios de hidrólisis enzimática complementando las celulasas con hemicelulasas para obtener un mayor rendimiento de los azúcares reductores.
- Utilizar el subproducto sólido obtenido de la hidrólisis enzimática para su uso en compostaje, bocashi, lombricultura o en abonos orgánicos acelerados (fermentación láctica) para ser aplicados en campos agrícolas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar, N. 2010. Modelo cinético de la hidrólisis del residuo de cosecha cañero. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina* 20(2):5-18.
2. Alfonsel, M; Negro, MJ; Saez, R; Martin, C. 1986. Actividad enzimática del complejo celulolítico producido por *Trichoderma reesei*. Hidrólisis enzimática de la celulosa. Centro de Investigaciones Energéticas, medioambientales y tecnológicas :1-42.
3. Álvarez, PE; Corzo, Z; Yañez, G; Pérez, Y del C. 2014. Actividades Enzimáticas de Hongos para el Pre - tratamiento de Residuos Lignocelulósicos (En desventajas del pretratamiento por su alto costo de energía (33%)). *Biotecnología y Bioingeniería A.C.* 18(3):11-29.
4. Alvira, P; Tomás-Pejó, E; Ballesteros, M; Negro, MJ. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review (en línea). *Bioresource Technology* 101(13):4851-4861.
5. Arapa, MH. 1994. Obtención de Alcohol a partir de Residuos Lignocelulósicos del Arroz. s.l., Universidad Nacional Agraria «La Molina». 1-142 p.
6. Bardales, CB; Rojas, CM; León, CA. 2015. Evaluación de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales del departamento de La Libertad , Perú como potenciales materias primas para la obtención de bioetanol. *Arnaldoa* 22(1):225-232.

7. Barrios Hernández, E. 2014. Alternativas de obtención de etanol a partir de paja de caña. s.l., s.e. 1-59 p.
8. Barroso, M. 2010. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. s.l., s.e. 151 p.
9. Bello Gil, D; Carrera B., E; Díaz M., Y. 2006. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar 40(2):45-50.
10. Carvalheiro, F; Duarte, LC; Gírio, FM. 2008. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. Journal of Scientific and Industrial Research 67(11):849-864.
11. Castro Saya, Y. 2013. Estudio de la bioquímica de enzimas lignocelulolíticas. s.l., Universidad Católica de Manizales. 1-160 p.
12. Chandra, RP; Bura, R; Mabee, WE; Berlin, A; Pan, X; Saddler, JN. 2007. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 108:67-93.
13. Chauca Espinoza, K; Grosso Gamboa, C; Cabrera Matara, J; León Torres, C; Arellano Barragán, J; Norberto Rodríguez, C; Pretel Sevillano, O. 2017. Extracción de azúcares reductores totales ART por métodos físicos y químicos de planta de Zea mays (Poaceae) “ maíz amarillo duro ”. ARNALDOA 24(1):289-300.
14. Cortes, WG. 2014. Tratamientos aplicables a materiales lignocelulósicos para obtención de etanol y productos químicos. Revista de Tecnología 13(1):39-44).
15. Cuervo, L; Folch, JL; Quiroz, RE. 2009. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares

Para la Producción de Etanol. BioTecnología 13(3):11-25.

16. Dagnino, E; Chamorro, E; Felissia, F; Area, M. 2014. Obtención de bioetanol a partir de la celulosa presente en cascarilla de arroz y aserrín de algarrobo (En composición de cascarilla de arroz). Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente 18:47-53.
17. Dagnino, EP; Chamorro, ER; Romano, SD; Felissia, FE; Area, MC. 2013. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production (en línea). Industrial Crops and Products 42(1):363-368.
18. Dagnino, EP; Chamorro, RE; Romano, SD; Felissia, F; Area, MC. 2011. Optimización de pretratamiento ácido de biomasa lignocelulósica para la obtención de bioetanol. s.l., s.e. p. 8-13.
19. De la Cruz Espinoza, JC. 2016. Fraccionamiento de nitrógeno en dos densidades de siembra de maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) en la localidad de La Molina. s.l., Universidad Nacional Agraria «La Molina». 1-89 p.
20. Dubois, M; Gilles, KA; Hamilton, JK; Rebers, PA; Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry 28(3):350-356.
21. Duque García, A. 2015. Pretratamiento de extrusión reactiva para la producción de bioetanol a partir de paja de cebada. s.l., s.e. 305 p.
22. Escalante Calderón, J; Fuentes Aquije, H. 2013. Estudio experimental de obtención de bioetanol a partir de residuos agrícolas de banano orgánico en Piura. s.l., Universidad de Piura. 1-140 p.
23. Fajardo Castillo, EE; Sarmiento Forero, SC. 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. s.l., s.e. 24-25 p.

24. Fiallos Encalada, FF. 2008. Reacción de 100 variedades de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum*) del Banco de Germoplasma del CINCAE, al Carbón (*Ustilago scitaminea* Sydow), Roya (*Puccinia melanocephala* Sydow) y Mosaico (*Sugarcane Mosaic Virus*) en la zona del Cantón El Triunfo. s.l., Escuela Superior Politécnica del Litoral. 1-56 p.
25. González, S.; Soto, NO; Rutiaga, OM; Medrano, H; Rutiaga, JG; López, J. 2011. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de Pajas de Frijol de cuatro variedades. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10(1):17-28.
26. González, P; Camacho, F; Jurado, E; Robles, A; Palacios, R. 1991. Hidrólisis de celulosa con celulasa y B-1,4-glucosidasa. *Afinidad* :91-95.
27. Gracia, C. 2004. *Biocombustibles: ¿energía o alimento*. s.l., s.e. p. 77-103.
28. Gracida, JN; Pérez, B. 2014. Factores previos involucrados en la producción de bioetanol, aspectos a considerar. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 30(2):213-227.
29. Hendriks, ATWM; Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100(1):10-18.
30. Karp, SG; Woiciechowski, AL; Soccol, VT; Soccol, R. 2013. Pretreatment Strategies for Delignification of Sugarcane Bagasse : A Review. *Brazilian archives of Biology and Technology* 56:679-689.
31. KLAIDA. s. f. *Nutrición Vegetal Especializada*. s.l., s.e. p. 1-2.
32. Kumar, P; Barrett, D; Delwiche, M; Stroeve, P. 2009. *Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production*.

33. Kumar, R; Wyman, CE. 2009. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the Deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol Prog* 25(2):302-314.
34. Lázaro, L; Arauzo, J. 1994. Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. *Hidrólisis enzimática*. s.l., s.e., vol.12. p. 227-240.
35. López Bustamante, JF. 2015. La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) para la producción de panela. Caso: Nordeste del departamento de Antioquia (en línea). s.l., Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. 1-70 p.
36. Manrique Anzules, JO. 2014. Determinación de las fases fenológicas y fenométricas e índice de balance hídrico en el cultivo de arroz (*Oryza sativa*) en condiciones de secano, Cantón Portoviejo, Provincia de Manabí. (en línea). s.l., Universidad Técnica de Cotopaxi. 1-68 p.
37. Marcelo, MD; Antonio, W; Alamo, M V. 2016. Evaluación del potencial energético de los residuos de la caña de azúcar en el Perú. *Simposio Peruano de Energía Solar y del Ambiente* (23, 2016, Huancayo, Perú). p. 14-19.
38. Mathier, D; Saleme, P; Bragachini, M; Sánchez, F; Bragachini, M; Méndez, J. 2013. La caña de azúcar como cultivo energético. s.l., s.e. p. 1-18.
39. Miller, GL. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426-428.
40. MINAGRI. 2017. Informe del Arroz. s.l., s.e. p. 1-9.

41. Morales, S. 2015. Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. s.l., s.e. 248 p.
42. Nakagame, S; Chandra, RP; Saddler, JN. 2010. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 105(5):871-879.
43. Novozymes. 2010. Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials. s.l., s.e. p. 1-9.
44. Rodríguez Zurichaqui, DP. 2017. Potencial de rendimiento de líneas mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) desarrolladas mediante aplicación de rayos gamma en condiciones del Valle de Jequetepeque. s.l., Universidad Nacional Agraria «La Molina». 1-58 p.
45. Saha, BC; Iten, LB; Cotta, MA; Wu, Y V. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnol Prog* 21(3):816-822.
46. Salcedo, J; López Galán, J; Florez Pardo, L. 2011. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *Dyna* 78(169):182-190.
47. Saritha, M; Arora, A; Lata. 2012. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Indian Journal of Microbiology* 52(2):122-130.
48. Song, Y; Wi, SG; Kim, HM; Bae, HJ. 2016. Cellulosic bioethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) using hydrogen peroxide-acetic acid (HPAC) pretreatment (en línea). *Bioresource Technology* 214:30-36.

49. Sun, Y; Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review (en línea). *Bioresource technology* 83(1):1-11.
50. Talebnia, F; Karakashev, D; Angelidaki, I. 2010. Production of bioethanol from wheat straw : An overview on pretreatment ,hydrolysis and fermentation (en línea). *Bioresource Technology* 101(13):4744-4753.
51. Tan, H; Yang, R; Sun, W; Wang, S. 2010. Peroxide-acetic acid pretreatment to remove bagasse lignin prior to enzymatic hydrolysis. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 49(4):1473-1479.
52. Tejada Sorraluz, JL. 2016. Control de malezas e interacción con dosis de nitrógeno en el cultivo de maíz amarillo duro (*Zea mays L.*). s.l., Universidad Nacional Agraria «La Molina». 1-110 p.
53. Valladares, CA. 2010. Taxonomía y Botánica de los Cultivos de Grano. La Ceiba, Universidad Nacional Autónoma de Honduras. p. 1-27.
54. Viñals-Verde, M; Bell-García, A; Michelena-Álvarez, G; Ramil-Mesa, M. 2012. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar* 46(1):7-16.
55. Viñals, M; Bell, A; Michelina, G; Ramil, M. 2012. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar* 46(1):7-16.
56. Wi, SG; Cho, EJ; Lee, D-S; Lee, SJ; Lee, YJ; Bae, H-J. 2015. Lignocellulose conversion for biofuel: a new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials. (en línea). *Biotechnology for biofuels* 8(228):1-11.
57. Wong, IP; Cao, HG; Tran, L; Cook, N; Ryden, P; Wilson, DR; Moates, GK;

- Collins, S; Elliston, A; Waldron, KW. 2016. Comparison of saccharification and fermentation of steam exploded rice straw and rice husk. *Biotechnology for Biofuels*. 9(1):1-9.
58. Yang, B; Wyman, CE. 2008. Pretreatment : the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels ,Bioproducts & Biorefining* 2:26-40.
59. Yu, J; Zhang, J; He, J; Liu, Z; Yu, Z. 2009. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull (en línea). *Bioresource Technology* 100(2):903-908.

VIII. ANEXO

Anexo 1. Descripción de los tratamientos trabajados

1.1 Tratamientos trabajados en el Pre tratamiento

Cada pre tratamiento contó con un control (T1)

	Pre tratamiento ácido	CH ₃ COOH		
		5%	10%	15%
H ₂ O ₂	5%	5 – 5 (T2)	5 – 10 (T3)	5 – 15 (T4)
	10%	10 – 5 (T5)	10 – 10 (T6)	10 – 15 (T7)
	15%	15 – 5 (T8)	15 – 10 (T9)	15 – 15 (T10)

	Pre tratamiento alcalino	KOH		
		2%	4%	6%
H ₂ O ₂	5%	5 – 2 (T2)	5 – 4 (T3)	5 – 6 (T4)
	10%	10 – 2 (T5)	10 – 4 (T6)	10 – 6 (T7)
	15%	15 – 2 (T8)	15 – 4 (T9)	15 – 6 (T10)

	Pre tratamiento nuevo	H ₂ O ₂		
		5%	10%	15%
Silicato de potasio	5%	5 – 5 (T2)	5 – 10 (T3)	5 – 15 (T4)
	10%	10 – 5 (T5)	10 – 10 (T6)	10 – 15 (T7)
	15%	15 – 5 (T8)	15 – 10 (T9)	15 – 15 (T10)

1.2 Pesos de los residuos pre tratados trabajados en la hidrólisis enzimática

Pre tratamiento	%Enzima	Material Lignocelulósico Pre tratado (gr)		
		Cascarilla de Arroz	Caña de Azúcar	Maíz
Ácido, Alcalino y Nuevo	0	Ácido: 0.99	Ácido: 1.92	Ácido: 1.16
	10	Alcalino: 2.27	Alcalino: 1.57	Alcalino: 1.08
	20			
	30	Nuevo: 0.94	Nuevo: 2.24	Nuevo: 1.48

1.3 Tratamientos trabajados en la sacarificación enzimática

Cada ensayo contó con su control (T1), el siguiente esquema fue trabajado para cada materia prima y por cada pre tratamiento aplicado (ácido, alcalino y nuevo).

% Enzima	Días		
	Día 1	Día 2	Día 3
10 %E	T2	T2	T2
20% E	T3	T3	T3
30% E	T4	T4	T4

Anexo 2. Resultados

2.1 Azúcares totales (ppm) y niveles de pH del pre tratamiento ácido en cascarilla de arroz

Pre tratamiento ácido (H ₂ O ₂ – CH ₃ COOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
0-0 (T1)	R1	646,42	6.73
	R2	729,86	6.65
	R3	647,81	6.61
5-5 (T2)	R1	867,52	3.08
	R2	852,92	3.07
	R3	811,21	3.05
5-10 (T3)	R1	930,10	2.80
	R2	1064,64	2.79
	R3	1037,53	2.79
5-15 (T4)	R1	1912,35	2.63
	R2	2039,59	2.61
	R3	2148,06	2.61
10-5 (T5)	R1	2015,25	2.97
	R2	2047,93	2.97
	R3	2024,99	2.96
10-10 (T6)	R1	2280,86	2.71
	R2	2237,75	2.72
	R3	2154,31	2.73
10-15 (T7)	R1	2189,77	2.52
	R2	2260,70	2.53
	R3	2068,79	2.54

Continuación

Pre tratamiento ácido (H ₂ O ₂ – CH ₃ COOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
15-5 (T8)	R1	2982,42	2.89
	R2	3140,94	2.89
	R3	2790,51	2.94
15-10 (T9)	R1	3622,79	2.64
	R2	3543,52	2.62
	R3	3472,60	2.64
15-15 (T10)	R1	3476,77	2.48
	R2	3193,09	2.47
	R3	3057,51	2.49

2.2 Azúcares totales (ppm) y niveles de pH del pre tratamiento alcalino en cascarilla de arroz

Pre tratamiento alcalino (H ₂ O ₂ – KOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
0-0 (T1)	R1	683,34	6.59
	R2	612,42	6.43
	R3	745,92	6.54
5-2 (T2)	R1	2381,26	10.19
	R2	2085,06	10.12
	R3	2051,69	10.13
5-4 (T3)	R1	4023,56	10.79
	R2	4109,77	10.79
	R3	4333,66	10.84
5-6 (T4)	R1	5702,01	11.83
	R2	6003,77	11.56
	R3	5886,96	11.71

Continuación

Pre tratamiento alcalino (H ₂ O ₂ – KOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
10-2 (T5)	R1	2969,48	9.47
	R2	2861,02	9.36
	R3	2666,33	9.35
10-4 (T6)	R1	4980,29	10.56
	R2	5016,44	10.60
	R3	4863,48	10.58
10-6 (T7)	R1	6312,48	11.24
	R2	6370,89	11.29
	R3	6554,45	11.46
15-2 (T8)	R1	2969,48	9.19
	R2	2847,11	9.20
	R3	2794,27	9.10
15-4 (T9)	R1	5391,91	10.47
	R2	5931,46	10.47
	R3	5589,37	10.35
15-6 (T10)	R1	7500,05	11.03
	R2	7658,58	10.98
	R3	7619,64	11.10

2.3 Azúcares totales (ppm) y niveles de pH del pre tratamiento nuevo en cascarilla de arroz

Pre tratamiento nuevo (Silicato de potasio - H ₂ O ₂)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
0-0 (T1)	R1	199,62	6.63
	R2	207,64	6.73
	R3	215,63	6.64

Continuación

Pre tratamiento nuevo (Silicato de potasio - H ₂ O ₂)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
5-5 (T2)	R1	441,86	7.55
	R2	441,51	7.66
	R3	452,98	7.53
5-10 (T3)	R1	518,14	6.91
	R2	527,00	6.85
	R3	531,69	6.83
5-15 (T4)	R1	676,08	6.67
	R2	631,26	6.56
	R3	681,82	6.53
10-5 (T5)	R1	591,12	8.11
	R2	562,10	8.19
	R3	532,74	8.21
10-10 (T6)	R1	607,28	7.32
	R2	563,14	7.29
	R3	576,35	7.46
10-15 (T7)	R1	688,07	7.31
	R2	681,82	7.20
	R3	755,84	7.33
15-5 (T8)	R1	527,00	8.50
	R2	488,08	8.60
	R3	501,46	8.60
15-10 (T9)	R1	550,46	7.79
	R2	562,45	7.72
	R3	607,80	7.71
15-15 (T10)	R1	777,73	7.53
	R2	754,27	7.48
	R3	742,81	7.48

2.4 Azúcares totales (ppm) y niveles de pH del pre tratamiento ácido en residuos de caña de azúcar

Pre tratamiento ácido (H ₂ O ₂ – CH ₃ COOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
0-0 (T1)	R1	3833,88	6.95
	R2	4056,37	7.04
	R3	4459,65	6.81
5-5 (T2)	R1	1560,25	3.39
	R2	1483,77	3.34
	R3	1601,97	3.40
5-10 (T3)	R1	1664,55	3.06
	R2	1747,98	3.05
	R3	1678,45	3.07
5-15 (T4)	R1	2471,09	2.88
	R2	2749,21	2.87
	R3	2804,84	2.89
10-5 (T5)	R1	2804,84	3.33
	R2	2916,08	3.32
	R3	3041,24	3.30
10-10 (T6)	R1	6225,71	3.04
	R2	6545,55	3.01
	R3	5815,48	3.02
10-15 (T7)	R1	8909,56	2.83
	R2	8130,83	2.85
	R3	8464,57	2.83
15-5 (T8)	R1	7776,22	3.18
	R2	8840,03	3.21
	R3	8353,32	3.21
15-10 (T9)	R1	10905,07	2.94
	R2	10480,94	2.93
	R3	9403,22	2.91

Continuación

Pre tratamiento ácido (H ₂ O ₂ – CH ₃ COOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
15-15 (T10)	R1	17767,67	2.76
	R2	20208,17	2.77
	R3	20451,53	2.76

2.5 Azúcares totales (ppm) y niveles de pH del pre tratamiento alcalino en residuos de caña de azúcar

Pre tratamiento alcalino (H ₂ O ₂ – KOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
0-0 (T1)	R1	6711,58	7.04
	R2	7792,08	7.11
	R3	7469,46	7.15
5-2 (T2)	R1	5653,34	9.48
	R2	5817,43	9.51
	R3	6148,39	9.42
5-4 (T3)	R1	16050,98	11.79
	R2	18136,88	11.79
	R3	17615,40	11.75
5-6 (T4)	R1	42733,08	12.23
	R2	43167,64	12.22
	R3	41516,31	12.18
10-2 (T5)	R1	6038,67	9.21
	R2	6090,82	9.21
	R3	7029,47	9.12
10-4 (T6)	R1	21091,90	11.31
	R2	21265,72	11.39
	R3	20900,69	11.50

Continuación

Pre tratamiento alcalino (H ₂ O ₂ – KOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
10-6 (T7)	R1	40821,01	12.12
	R2	43480,53	12.13
	R3	41446,78	12.10
15-2 (T8)	R1	26271,88	8.96
	R2	28618,51	8.96
	R3	25541,81	9.00
15-4 (T9)	R1	28827,10	10.91
	R2	29974,34	10.69
	R3	26636,91	10.80
15-6 (T10)	R1	31851,65	11.91
	R2	32738,16	11.92
	R3	34771,91	11.84

2.6 Azúcares totales (ppm) y niveles de pH del pre tratamiento nuevo en residuos de caña de azúcar

Pre tratamiento nuevo (H ₂ O ₂ – Silicato de potasio)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
0-0 (T1)	R1	3253,17	7.08
	R2	3984,62	7.08
	R3	3874,76	7.06
5-5 (T2)	R1	3916,48	6.83
	R2	3808,01	6.80
	R3	4316,97	6.57
5-10 (T3)	R1	5022,01	6.15
	R2	4421,27	5.93
	R3	4604,83	5.96

Continuación

Pre tratamiento nuevo (H ₂ O ₂ – Silicato de potasio)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
5-15 (T4)	R1	4602,05	5.71
	R2	4813,42	5.62
	R3	4454,64	5.70
10-5 (T5)	R1	3603,60	6.67
	R2	3542,41	6.96
	R3	3689,81	7.08
10-10 (T6)	R1	6205,41	6.20
	R2	5430,84	6.25
	R3	5693,67	6.23
10-15 (T7)	R1	5793,79	5.68
	R2	6115,02	6.13
	R3	6281,89	5.96
15-5 (T8)	R1	3640,59	6.72
	R2	3591,92	6.96
	R3	3352,04	6.80
15-10 (T9)	R1	5851,64	6.38
	R2	6037,63	6.36
	R3	5469,22	6.53
15-15 (T10)	R1	5787,32	6.12
	R2	6548,67	6.21
	R3	6588,65	5.91

2.7 Azúcares totales (ppm) y niveles de pH del pre tratamiento ácido en residuos de maíz

Pre tratamiento ácido (H ₂ O ₂ – CH ₃ COOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
0-0 (T1)	R1	2206,88	7.34
	R2	1970,48	7.39
	R3	2234,69	7.37
5-5 (T2)	R1	844,09	3.70
	R2	858,00	3.70
	R3	816,28	3.69
5-10 (T3)	R1	1177,84	3.41
	R2	1122,21	3.42
	R3	1101,35	3.41
5-15 (T4)	R1	1414,24	3.26
	R2	1289,08	3.26
	R3	1435,10	3.25
10-5 (T5)	R1	6232,66	3.64
	R2	5850,25	3.61
	R3	5919,78	3.63
10-10 (T6)	R1	6378,67	3.36
	R2	6031,02	3.36
	R3	6858,43	3.35
10-15 (T7)	R1	7004,44	3.22
	R2	7616,31	3.21
	R3	7546,78	3.19
15-5 (T8)	R1	7776,22	3.52
	R2	8568,87	3.54
	R3	8353,32	3.55
15-10 (T9)	R1	10244,54	3.32
	R2	9862,12	3.29
	R3	9187,68	3.29

Continuación

Pre tratamiento ácido (H ₂ O ₂ – CH ₃ COOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
15-15 (T10)	R1	10633,90	3.13
	R2	9952,51	3.12
	R3	10647,81	3.13

2.8 Azúcares totales (ppm) y niveles de pH del pre tratamiento alcalino en residuos de maíz

Pre tratamiento alcalino (H ₂ O ₂ – KOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
0-0 (T1)	R1	2939,03	7.70
	R2	2761,73	7.85
	R3	2813,88	7.66
5-2 (T2)	R1	7270,74	9.66
	R2	7465,43	9.66
	R3	6850,09	9.85
5-4 (T3)	R1	14863,41	11.28
	R2	15798,59	11.60
	R3	16149,71	11.36
5-6 (T4)	R1	21809,45	12.70
	R2	19490,62	12.67
	R3	20356,27	12.65
10-2 (T5)	R1	8856,02	9.02
	R2	9127,19	9.13
	R3	8946,41	9.19
10-4 (T6)	R1	17150,94	10.84
	R2	17248,28	10.72
	R3	15767,30	10.72

Continuación

Pre tratamiento alcalino (H ₂ O ₂ – KOH)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
10-6 (T7)	R1	20808,22	12.43
	R2	20578,77	12.40
	R3	18468,53	12.60
15-2 (T8)	R1	11480,78	8.99
	R2	10677,71	9.09
	R3	11268,71	8.94
15-4 (T9)	R1	17721,09	10.52
	R2	19813,94	10.43
	R3	18937,86	10.66
15-6 (T10)	R1	22337,87	11.94
	R2	20738,69	12.16
	R3	21656,48	12.01

2.9 Azúcares totales (ppm) y niveles de pH del pre tratamiento nuevo en residuos de maíz

Pre tratamiento nuevo (H ₂ O ₂ – Silicato de potasio)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
0-0 (T1)	R1	3122,59	7.46
	R2	3518,91	7.47
	R3	3051,32	7.48
5-5 (T2)	R1	3383,33	8.13
	R2	3225,14	8.23
	R3	3211,24	8.15
5-10 (T3)	R1	3051,32	7.21
	R2	3352,04	7.24
	R3	3068,70	7.13

Continuación

Pre tratamiento nuevo (H ₂ O ₂ – Silicato de potasio)	R	Azúcares totales (ppm)	pH
5-15 (T4)	R1	3732,71	6.34
	R2	3638,85	6.29
	R3	3941,30	6.46
10-5 (T5)	R1	3445,90	8.45
	R2	3080,87	8.70
	R3	3197,33	8.74
10-10 (T6)	R1	3727,50	7.51
	R2	3581,49	7.10
	R3	3555,41	7.13
10-15 (T7)	R1	5902,05	6.36
	R2	5437,93	6.29
	R3	5338,85	6.32
15-5 (T8)	R1	3239,05	8.99
	R2	3152,14	9.00
	R3	3030,46	9.08
15-10 (T9)	R1	3854,39	7.77
	R2	3983,02	7.49
	R3	3760,53	7.49
15-15 (T10)	R1	5098,98	7.20
	R2	5213,70	7.18
	R3	5356,24	7.30

2.10 Azúcares Reductores (ppm) del hidrolizado de Cascarilla de Arroz pre tratado con ácido

Tratamiento ácido	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
Control (T1)	R1	48,94	54,86	62,75
	R2	47,36	58,41	64,33
	R3	52,69	61,57	65,12
10% Enzima (T2)	R1	2399,61	2518,81	2749,30
	R2	2331,73	2652,21	2460,39
	R3	2306,47	2549,59	2662,86
20% Enzima (T3)	R1	3623,10	3566,27	3893,06
	R2	3406,82	3574,16	3956,21
	R3	3534,70	3428,92	4234,06
30% Enzima (T4)	R1	4884,48	4805,54	5264,15
	R2	4704,51	4788,18	4791,34
	R3	5119,70	4955,52	5148,12

2.11 Azúcares Reductores (ppm) del hidrolizado de Cascarilla de Arroz pre tratado con álcali

Tratamiento alcalino	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
Control (T1)	R1	51,50	72,23	76,57
	R2	50,12	63,54	78,74
	R3	51,50	63,35	78,54
10% Enzima (T2)	R1	4495,33	6227,95	14634,49
	R2	4708,45	5683,30	14101,68
	R3	4799,23	5781,97	14652,25
20% Enzima (T3)	R1	5896,42	8086,86	17381,42
	R2	6026,66	7952,67	17322,22
	R3	6026,66	6855,48	17144,62

Continuación

Tratamiento alcalino	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
30% Enzima (T4)	R1	6887,05	7463,28	19319,27
	R2	7512,61	8094,75	19994,16
	R3	6930,47	8106,59	18589,12

2.12 Azúcares Reductores (ppm) del hidrolizado de Cascarilla de Arroz en pre tratamiento nuevo

Tratamiento nuevo	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
Control (T1)	R1	40,26	37,89	35,13
	R2	39,07	37,89	36,31
	R3	37,89	40,26	36,31
10% Enzima (T2)	R1	2189,25	2190,44	2439,08
	R2	1993,10	2019,15	2292,26
	R3	2034,94	2072,83	2223,59
20% Enzima (T3)	R1	2964,00	3447,87	3453,39
	R2	3108,45	3344,46	3230,01
	R3	3245,40	3503,12	3492,86
30% Enzima (T4)	R1	4431,39	4636,62	4409,29
	R2	4456,65	4881,32	4771,60
	R3	4690,30	4835,54	4170,12

2.13 Azúcares Reductores (ppm) del hidrolizado de Residuos de Caña pre tratado con ácido

Tratamiento ácido	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
Control (T1)	R1	158,07	177,21	198,52
	R2	148,40	178,79	190,23
	R3	154,32	165,37	193,78
10% Enzima (T2)	R1	5789,86	6819,96	7198,84
	R2	5671,46	7435,65	7092,28
	R3	5770,13	7488,93	7056,76
20% Enzima (T3)	R1	7808,61	7879,66	6464,75
	R2	8590,07	7181,08	7275,81
	R3	8501,27	7074,52	6831,80
30% Enzima (T4)	R1	9590,57	9472,16	9472,16
	R2	9815,53	10123,37	9034,08
	R3	9424,80	10277,30	8832,79

2.14 Azúcares Reductores (ppm) del hidrolizado de Residuos de Caña pre tratado con álcali

Tratamiento alcalino	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
Control (T1)	R1	194,18	258,12	287,72
	R2	198,92	278,24	311,00
	R3	211,94	285,94	315,54
10% Enzima (T2)	R1	20341,47	20720,36	22650,31
	R2	21318,29	22666,10	24639,47
	R3	21561,01	22038,57	22081,98
20% Enzima (T3)	R1	22228,01	28724,34	30571,41
	R2	21935,95	29268,99	28653,30
	R3	21817,55	31494,94	29825,48

Continuación

Tratamiento alcalino	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
30% Enzima (T4)	R1	26825,96	23609,37	25894,53
	R2	27508,74	22389,83	28298,09
	R3	26056,34	22875,28	28045,50

2.15 Azúcares Reductores (ppm) del hidrolizado de Residuos de Caña en pre tratamiento nuevo

Tratamiento nuevo	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
Control (T1)	R1	105,77	108,54	104,98
	R2	106,56	104,98	102,62
	R3	106,17	113,67	103,40
10% Enzima (T2)	R1	1276,37	3319,99	3664,15
	R2	1352,15	3277,37	3666,52
	R3	1406,62	3257,63	3786,50
20% Enzima (T3)	R1	4125,13	4520,59	4328,78
	R2	4262,47	4370,22	4598,74
	R3	4327,20	4640,18	4095,53
30% Enzima (T4)	R1	2243,32	5160,75	4925,53
	R2	2177,81	5216,00	5033,67
	R3	2233,06	5545,16	4833,17

2.16 Azúcares Reductores (ppm) del hidrolizado de Residuos de Maíz pre tratado con ácido

Tratamiento ácido	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
Control (T1)	R1	513,86	590,83	584,91
	R2	505,58	531,63	563,59
	R3	525,71	578,99	577,80

Continuación

Tratamiento ácido	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
10% Enzima (T2)	R1	9862,89	7640,88	11046,91
	R2	9957,61	8603,88	11023,23
	R3	9401,12	8264,46	10750,91
20% Enzima (T3)	R1	11828,36	11538,28	12077,01
	R2	12337,49	12526,94	11496,84
	R3	11271,87	13030,15	12692,70
30% Enzima (T4)	R1	13687,28	13740,56	13553,09
	R2	13497,83	15356,75	13497,83
	R3	14681,85	14006,96	13537,30

2.17 Azúcares Reductores (ppm) del hidrolizado de Residuos de Maíz pre tratado con álcali

Tratamiento alcalino	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
Control (T1)	R1	160,24	222,60	348,10
	R2	155,50	217,86	325,61
	R3	151,95	221,41	368,82
10% Enzima (T2)	R1	18072,10	19496,87	16903,87
	R2	19619,22	19717,89	15755,37
	R3	19642,90	18502,29	16252,65
20% Enzima (T3)	R1	20369,10	20909,80	15846,14
	R2	21024,26	18861,45	16134,25
	R3	20598,01	20175,71	15467,25
30% Enzima (T4)	R1	21513,65	21568,91	17547,18
	R2	19899,44	21549,17	18111,57
	R3	21091,35	20673,00	16217,13

2.18 Azúcares Reductores (ppm) del hidrolizado de Residuos de en pre tratamiento nuevo

Tratamiento nuevo	R	Días – Azúcares Reductores (ppm)		
		Día 1	Día 2	Día 3
Control (T1)	R1	209,18	196,94	181,55
	R2	211,54	190,63	180,76
	R3	198,92	191,02	180,37
10% Enzima (T2)	R1	11027,18	11784,95	11638,92
	R2	11063,49	11691,81	11556,04
	R3	11342,92	10814,05	11919,14
20% Enzima (T3)	R1	12100,69	13485,20	14772,63
	R2	12684,81	14354,27	13688,86
	R3	12661,13	14302,97	13758,32
30% Enzima (T4)	R1	12937,40	13896,45	13955,6545
	R2	12935,82	13300,50	16134,2521
	R3	13837,25	14733,16	16007,9566

Anexo 3. Análisis estadísticos de azúcares totales en pretratamientos para cascarilla de arroz

3.1 Análisis de la varianza para pre tratamiento ácido

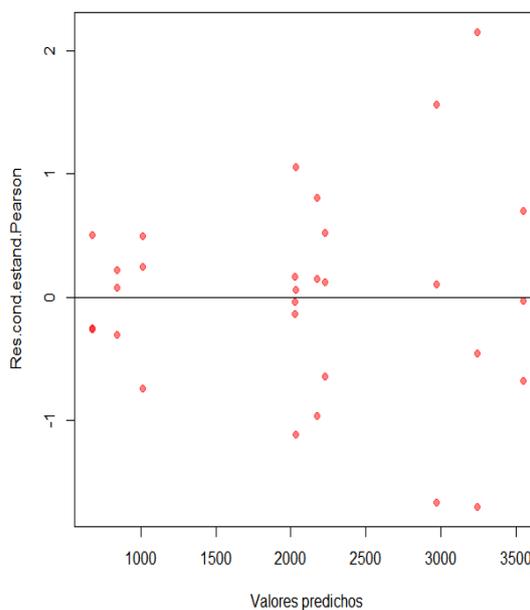
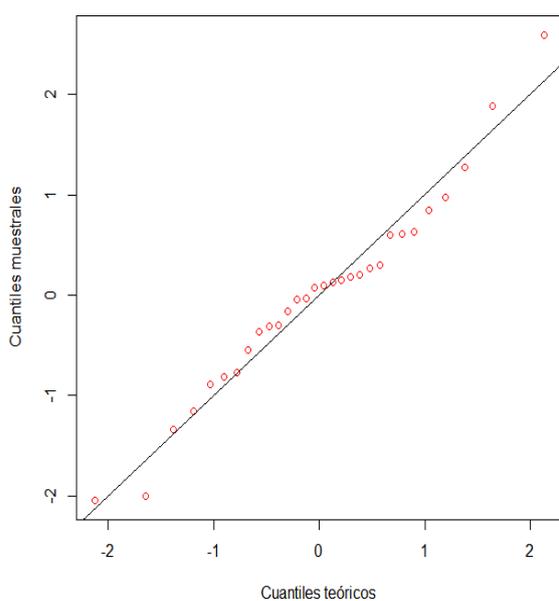
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	26927619,7	9	2991957,74	253,2	0
Pre tratamiento Ácido	26927619,7	9	2991957,74	253,2	0
Error	236331,24	20	11816,56		
Total	27163950,9	29			

3.2 Cumplimiento de supuestos

La normalidad con un $r > 0.96$ demuestra una distribución normal, en este caso se presenta un de r de 0.981. La homocedasticidad, demuestra una dispersión de datos. Los modelos se tomaron en cuenta las medidas de ajuste del modelo; para ello se consideraron valores de AIC y BIC menores como un mejor ajuste del modelo. Para el pre tratamiento ácido de cascarilla de arroz presentó un valor de 277.289 y 288.242. No se modeló la corrida.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de varianzas



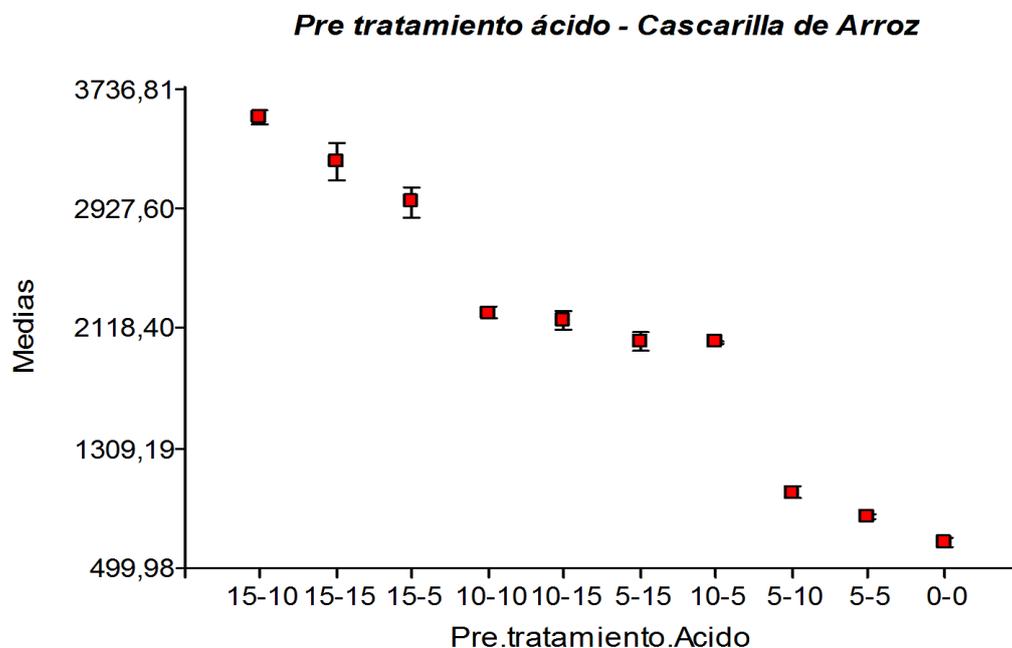
3.3 Comparación múltiple de pre tratamiento ácido

Para la elección del pre tratamiento óptimo se tomó en consideración una comparación de LSD-Fisher.

Pre tratamiento Ácido	Medias	E.E.	Grupos							
			A	B	C	D	E	F	G	
15-10	3546,3	62,76	A							
15-15	3242,46	62,76		B						
15-5	2971,29	62,76			C					
10-10	2224,31	62,76				D				
10-15	2173,09	62,76				D	E			
5-15	2033,33	62,76					E			
10-5	2029,39	62,76					E			
5-10	1010,76	62,76						F		
5-5	843,88	62,76						F	G	
0-0	674,7	62,76								G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.4 Gráficas de comparación



3.5 Análisis de la varianza para pre tratamiento alcalino

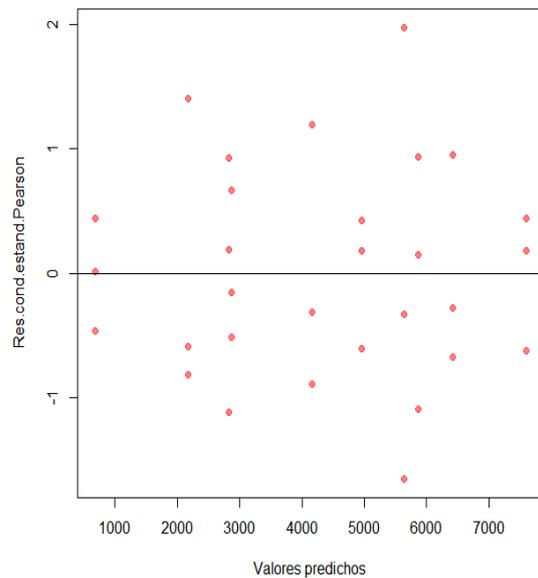
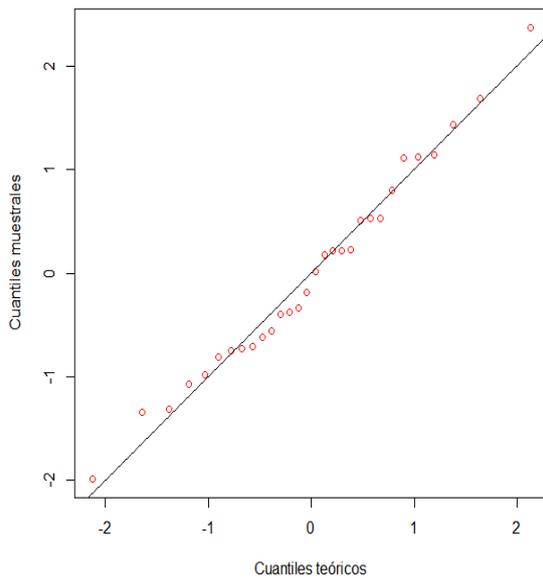
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	125430947	9	13936771,9	629,21	<0,0001
Pre tratamiento Alcalino	125430947	9	13936771,9	629,21	<0,0001
Error	442994,25	20	22149,71		
Total	125873941	29			

3.6 Cumplimiento de supuestos

La normalidad con un $r > 0.96$ demuestra una distribución normal, en este caso se presenta un de r de 0.991. La homocedasticidad, demuestra una dispersión de datos. Los modelos se tomaron en cuenta las medidas de ajuste del modelo; para ello se consideraron valores de AIC y BIC menores como un mejor ajuste del modelo. Para el pre tratamiento alcalino de cascarilla de arroz presentó un valor de 289.855 y 300.808. No se modeló la corrida.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de la varianza

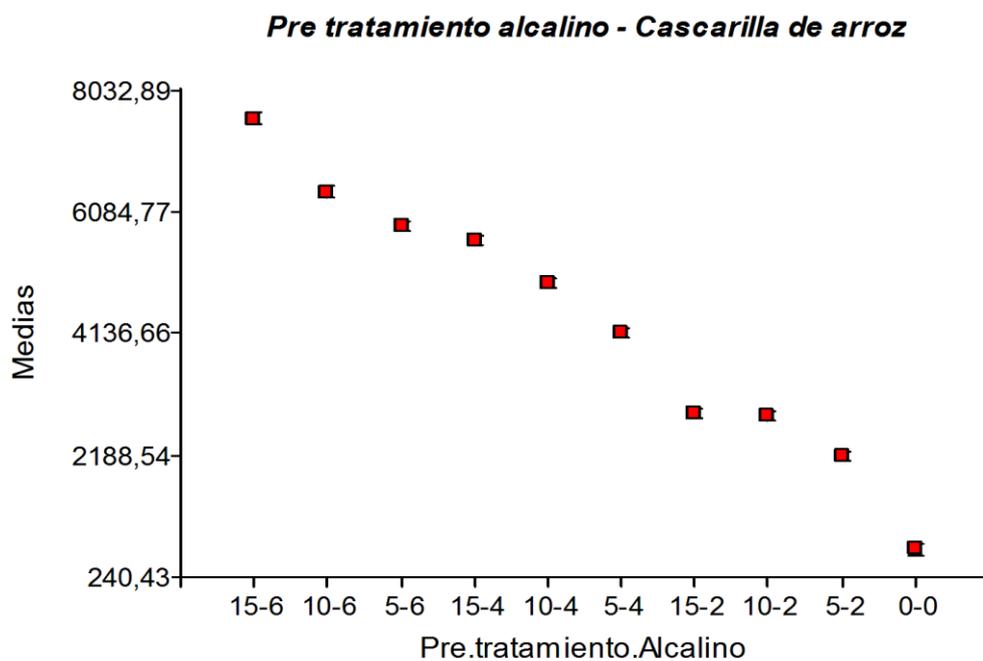


3.7 Comparación múltiple

Pre tratamiento Alcalino	Medias	E.E.	Grupos								
15-6	7592,76	85,93	A								
10-6	6412,6	85,93		B							
5-6	5864,25	85,93			C						
15-4	5637,58	85,93			C						
10-4	4953,4	85,93				D					
5-4	4155,66	85,93					E				
15-2	2870,29	85,93						F			
10-2	2832,28	85,93						F			
5-2	2172,67	85,93							G		
0-0	680,56	85,93								H	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.8 Gráficas de comparación



3.9 Análisis de la varianza para pre tratamiento nuevo

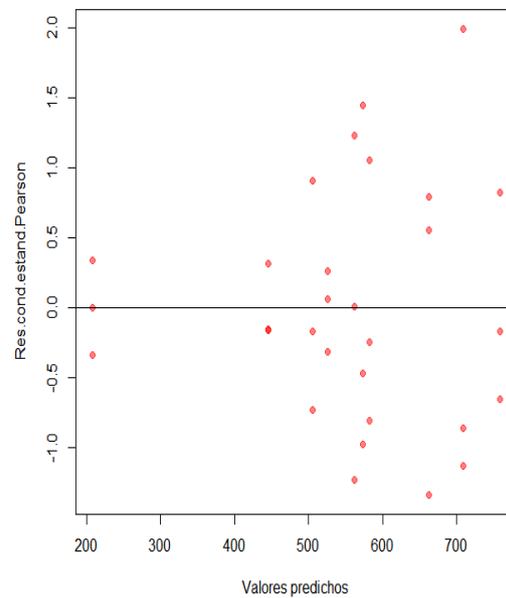
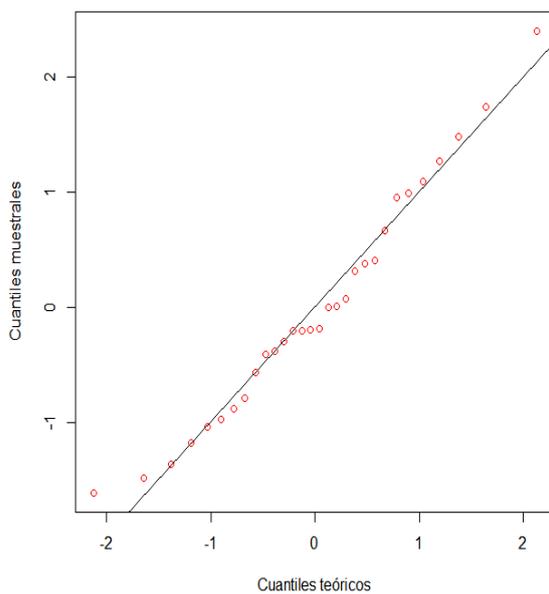
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	640991,14	9	71221,24	127,33	<0,0001
Pre tratamiento Nuevo	640991,14	9	71221,24	127,33	<0,0001
Error	11186,72	20	559,34		
Total	652177,86	29			

3.10 Cumplimientos de supuestos

La normalidad con un $r > 0.96$ demuestra una distribución normal, en este caso se presenta un de r de 0.988. La homocedasticidad, demuestra una dispersión de datos. Los modelos se tomaron en cuenta las medidas de ajuste del modelo; para ello se consideraron valores de AIC y BIC menores como un mejor ajuste del modelo. Para el pre tratamiento nuevo de cascarilla de arroz presentó un valor de 216.18 y 227.23. No se modeló la corrida.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de varianzas

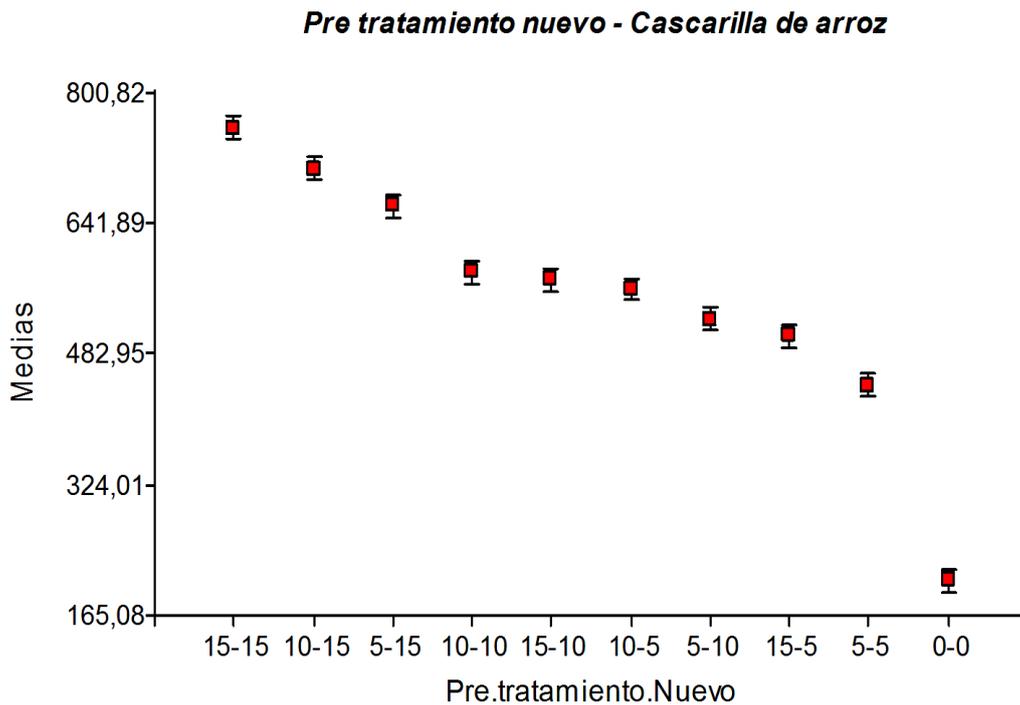


3.11 Comparación múltiple

Pre tratamiento Nuevo	Medias	E.E.	Grupos							
15-15	758,27	13,65	A							
10-15	708,58	13,65		B						
5-15	663,05	13,65			C					
10-10	582,26	13,65				D				
15-10	573,57	13,65				D				
10-5	561,99	13,65				D	E			
5-10	525,61	13,65					E	F		
15-5	505,51	13,65						F		
5-5	445,45	13,65							G	
0-0	207,63	13,65								H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

2.12 Gráficos de comparación



Anexo 4. Análisis estadísticos de azúcares totales en pretratamientos para residuos de caña de azúcar

4.1 Análisis de la varianza para pre tratamiento ácido

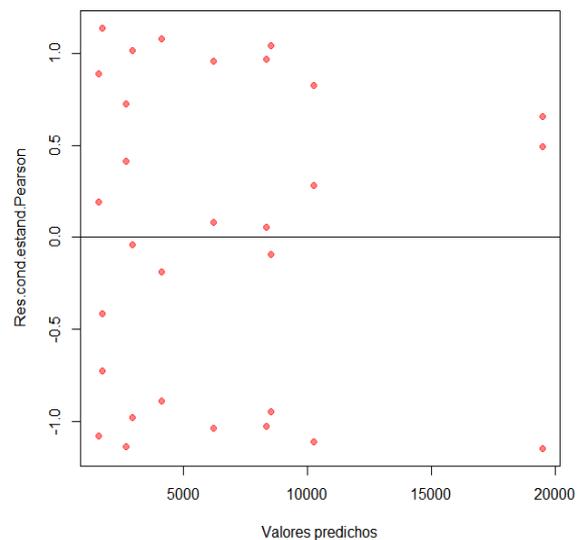
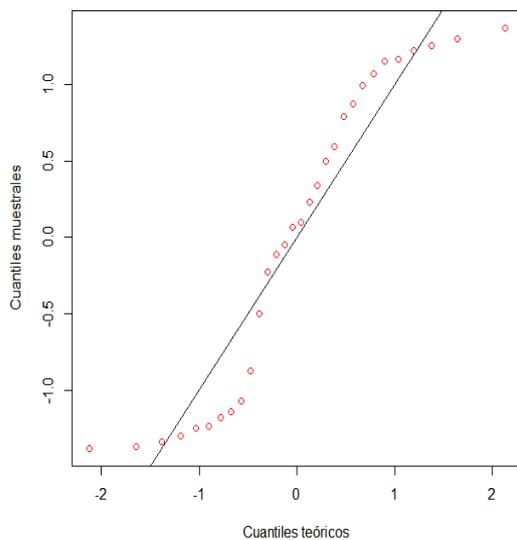
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	811830977	9	90203441,8	255,91	<0,0001
Pre tratamiento Ácido	811830977	9	90203441,8	255,91	<0,0001
Error	7049759,25	20	352487,96		
Total	818880736	29			

4.2 Cumplimiento de supuesto

La normalidad con un $r > 0.96$ demuestra una distribución normal, en este caso se presenta un r de 0.935. La homocedasticidad, demuestra una dispersión de datos. Los modelos se tomaron en cuenta las medidas de ajuste del modelo; para ello se consideraron valores de AIC y BIC menores como un mejor ajuste del modelo. Para el pre tratamiento ácido de residuo de caña de azúcar presentó un valor de 330.04 y 350.518. Se modeló la corrida aplicando Valident.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de varianza

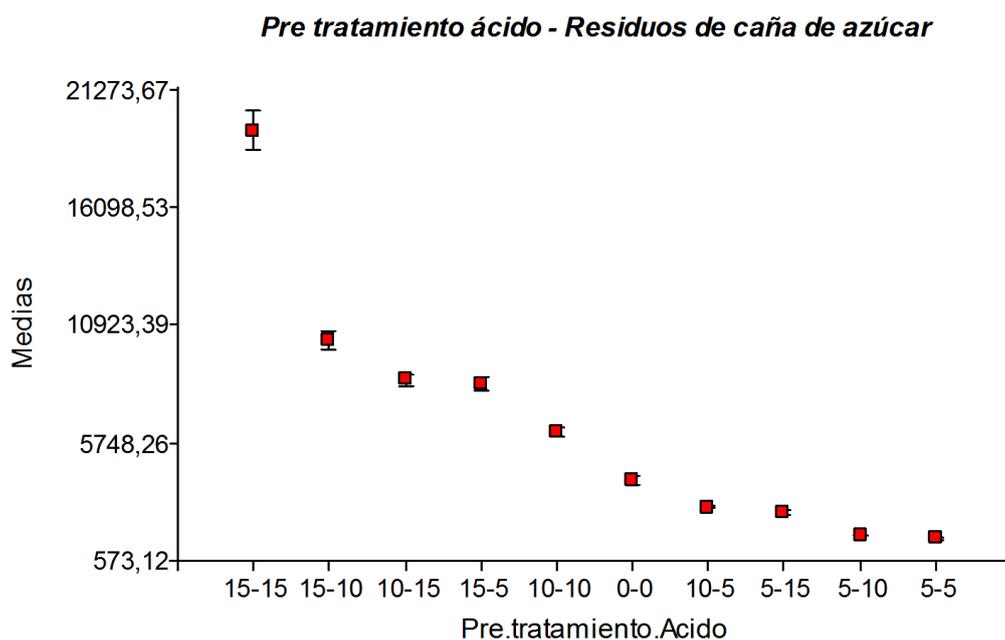


4.3 Comparación múltiple

Pre tratamiento Ácido	Medias	E.E.	Grupos								
15-15	19475,79	856,94	A								
15-10	10263,08	447,02		B							
10-15	8501,65	225,56			C						
15-5	8323,19	307,46			C						
10-10	6195,58	211,29				D					
0-0	4116,63	183,14					E				
10-5	2920,72	68,28						F			
5-15	2675,05	103,23						F			
5-10	1696,99	25,81							G		
5-5	1548,66	34,61								H	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.4 Gráficos de comparación



4.5 Análisis de la varianza para pre tratamiento alcalino

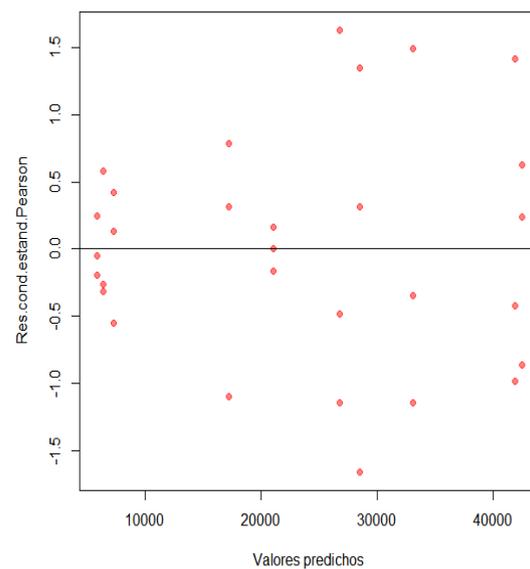
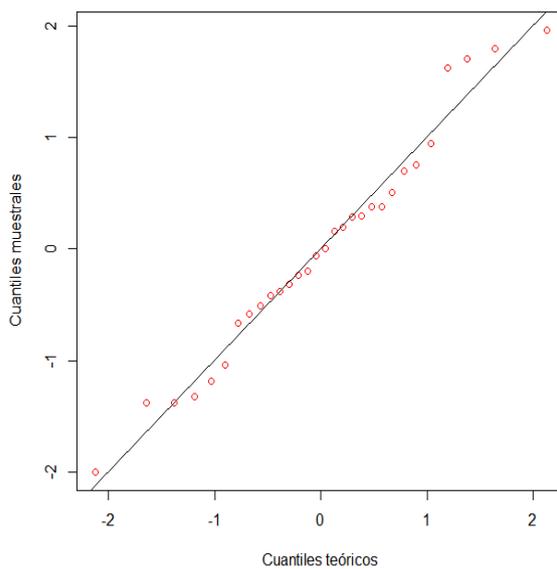
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5206507642	9	578500849	471,81	<0,0001
Pre tratamiento Alcalino	5206507642	9	578500849	471,81	<0,0001
Error	24522539,1	20	1226126,95		
Total	5231030181	29			

4.6 Cumplimiento de supuesto

La normalidad con un $r > 0.96$ demuestra una distribución normal, en este caso se presenta un de r de 0.989. La homocedasticidad, demuestra una dispersión de datos. Los modelos se tomaron en cuenta las medidas de ajuste del modelo; para ello se consideraron valores de AIC y BIC menores como un mejor ajuste del modelo. Para el pre tratamiento ácido de residuo de caña de azúcar presentó un valor de 370.131 y 381.084. No se modeló la corrida.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de la varianza

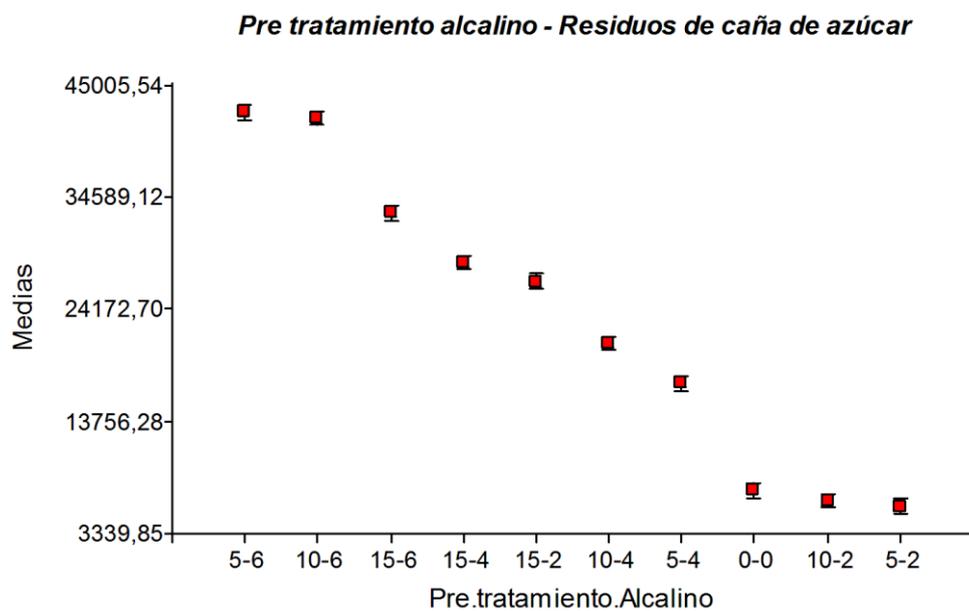


4.7 Comparación múltiple

Pre tratamiento Alcalino	Medias	E.E.	Grupos					
5-6	42472,34	639,3	A					
10-6	41916,11	639,3	A					
15-6	33120,57	639,3		B				
15-4	28479,45	639,3			C			
15-2	26810,73	639,3			C			
10-4	21086,1	639,3				D		
5-4	17267,75	639,3					E	
0-0	7324,37	639,3						F
10-2	6386,32	639,3						F
5-2	5873,05	639,3						F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.8 Gráficos de comparación



4.9 Análisis de la varianza para pre tratamiento nuevo

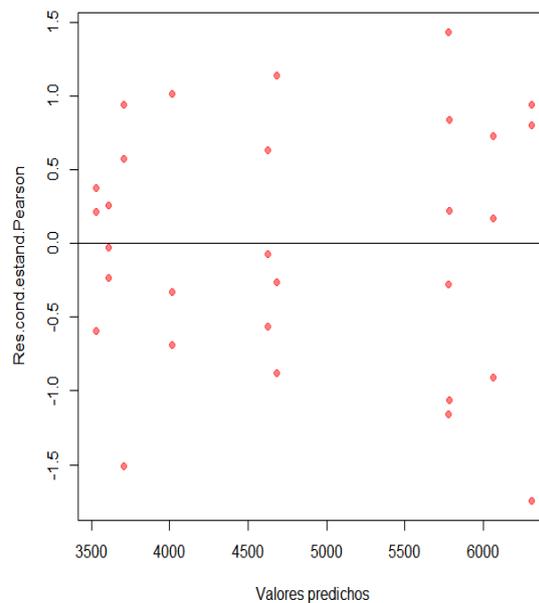
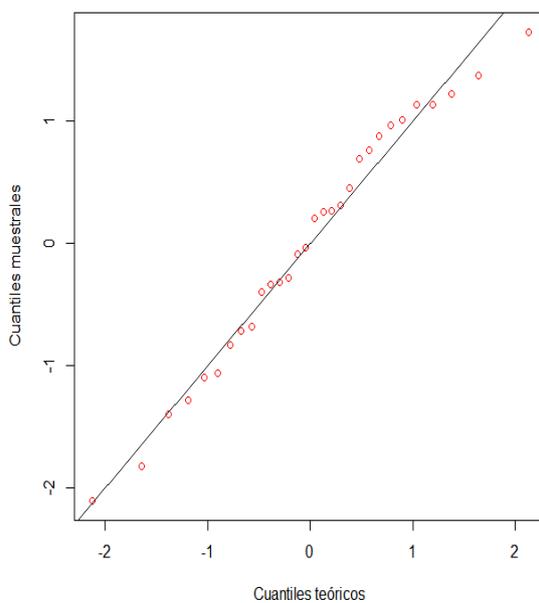
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32068617,5	9	3563179,72	40,1	<0,0001
Pre tratamiento Nuevo	32068617,5	9	3563179,72	40,1	<0,0001
Error	1777327,61	20	88866,38		
Total	33845945,1	29			

4.10 Cumplimiento de supuesto

La normalidad con un $r > 0.96$ demuestra una distribución normal, en este caso se presenta un de r de 0.991. La homocedasticidad, demuestra una dispersión de datos. Los modelos se tomaron en cuenta las medidas de ajuste del modelo; para ello se consideraron valores de AIC y BIC menores como un mejor ajuste del modelo. Para el pre tratamiento ácido de residuo de caña de azúcar presentó un valor de 317.641 y 328.595. No se modeló la corrida.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de la varianza

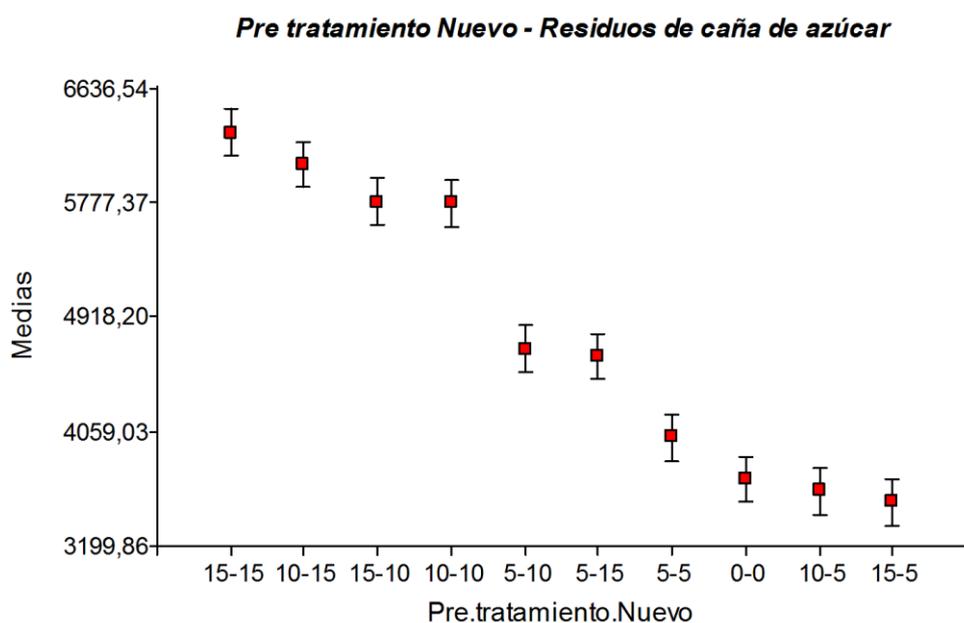


4.11 Comparación múltiple

Pre tratamiento Nuevo	Medias	E.E.	Grupos			
15-15	6308,22	172,11	A			
10-15	6063,56	172,11	A	B		
15-10	5786,16	172,11		B		
10-10	5776,64	172,11		B		
5-10	4682,7	172,11			C	
5-15	4623,37	172,11			C	
5-5	4013,82	172,11				D
0-0	3704,18	172,11				D
10-5	3611,94	172,11				D
15-5	3528,18	172,11				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

4.12 Gráficos de comparación



Anexo 5. Análisis estadísticos de azúcares totales en pretratamientos para residuos de maíz

5.1 Análisis de la varianza para pre tratamiento ácido

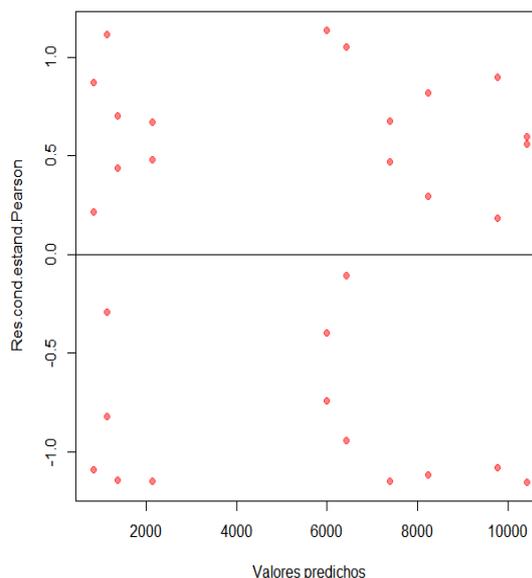
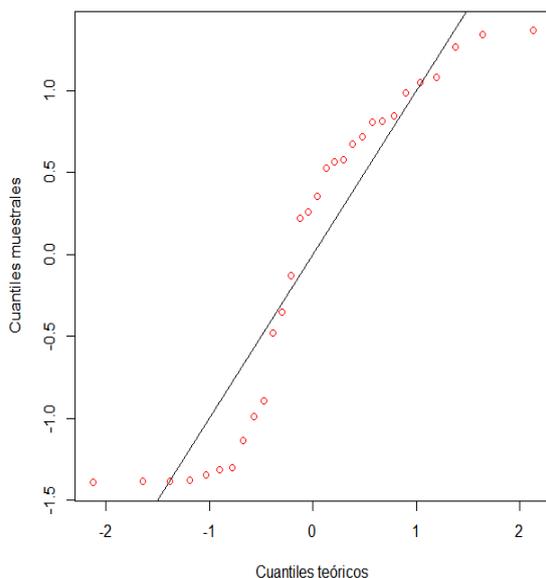
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	370063054	9	41118117,1	424,8	<0,0001
Pre tratamiento Ácido	370063054	9	41118117,1	424,8	<0,0001
Error	1935890,51	20	96794,53		
Total	371998944	29			

5.2 Cumplimiento de supuestos

La normalidad con un $r > 0.96$ demuestra una distribución normal, en este caso se presenta un de r de 0.978. La homocedasticidad, demuestra una dispersión de datos. Los modelos se tomaron en cuenta las medidas de ajuste del modelo; para ello se consideraron valores de AIC y BIC menores como un mejor ajuste del modelo. Para el pre tratamiento nuevo de residuos de maíz presentó un valor de 313.839 y 333.753. Se modeló la corrida aplicando Valident.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de la varianza

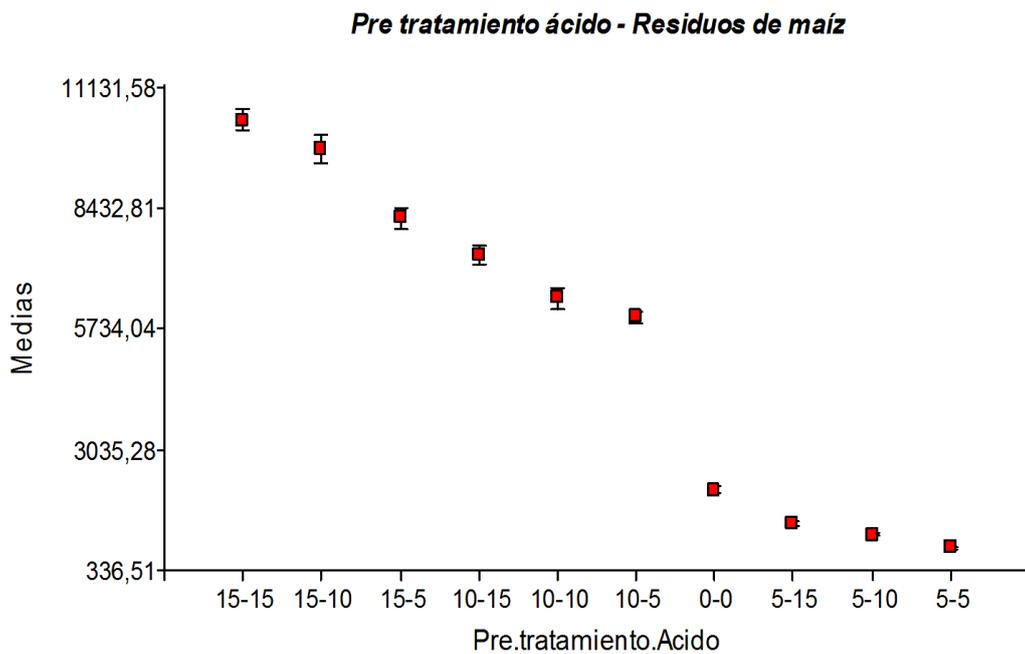


5.3 Comparación múltiple

Pre tratamiento Ácido	Medias	E.E.	Grupos							
15-15	10411,41	229,48	A							
15-10	9764,78	308,95	A							
15-5	8232,8	236,62		B						
10-15	7389,18	193,41			C					
10-10	6422,71	239,86				D				
10-5	6000,89	117,61				D				
0-0	2137,35	83,82					E			
5-15	1379,47	45,59						F		
5-10	1133,8	22,83							G	
5-5	839,46	12,26								H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

5.4 Gráficas de comparación



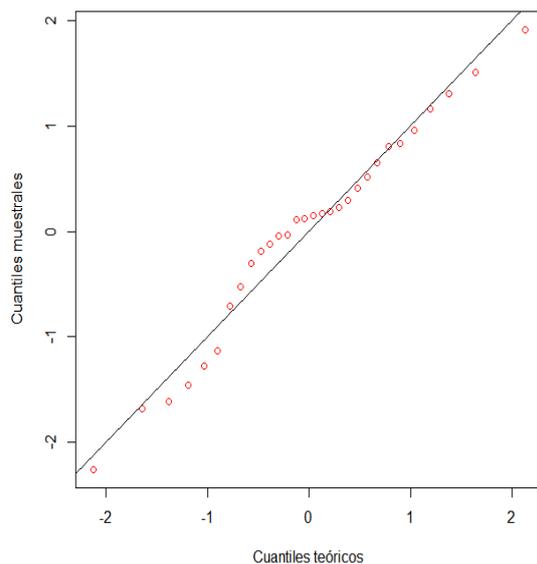
5.5 Análisis de la varianza para pre tratamiento alcalino

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1116527137	9	124058571	199,68	<0,0001
Pre tratamiento Alcalino	1116527137	9	124058571	199,68	<0,0001
Error	12425508,9	20	621275,45		
Total	1128952646	29			

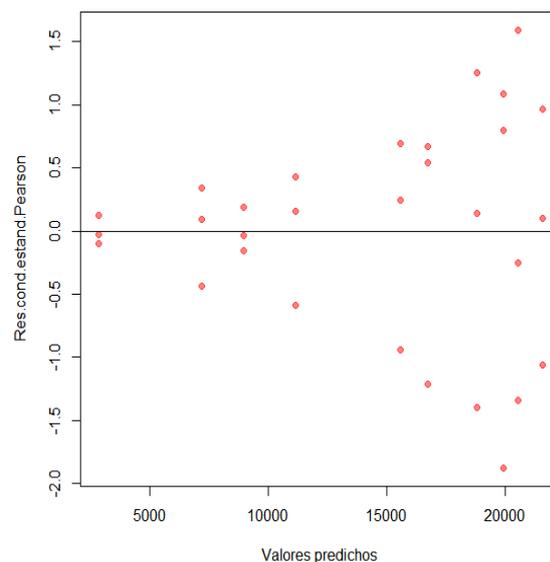
5.6 Cumplimiento de supuestos

La normalidad con un $r > 0.96$ demuestra una distribución normal, en este caso se presenta un r de 0.986. La homocedasticidad, demuestra una dispersión de datos. Los modelos se tomaron en cuenta las medidas de ajuste del modelo; para ello se consideraron valores de AIC y BIC menores como un mejor ajuste del modelo. Para el pre tratamiento nuevo de residuos de maíz presentó un valor de 356.53 y 367.49. No se modeló la corrida estadística.

i) Normalidad de errores



ii) Homogeneidad de la varianza

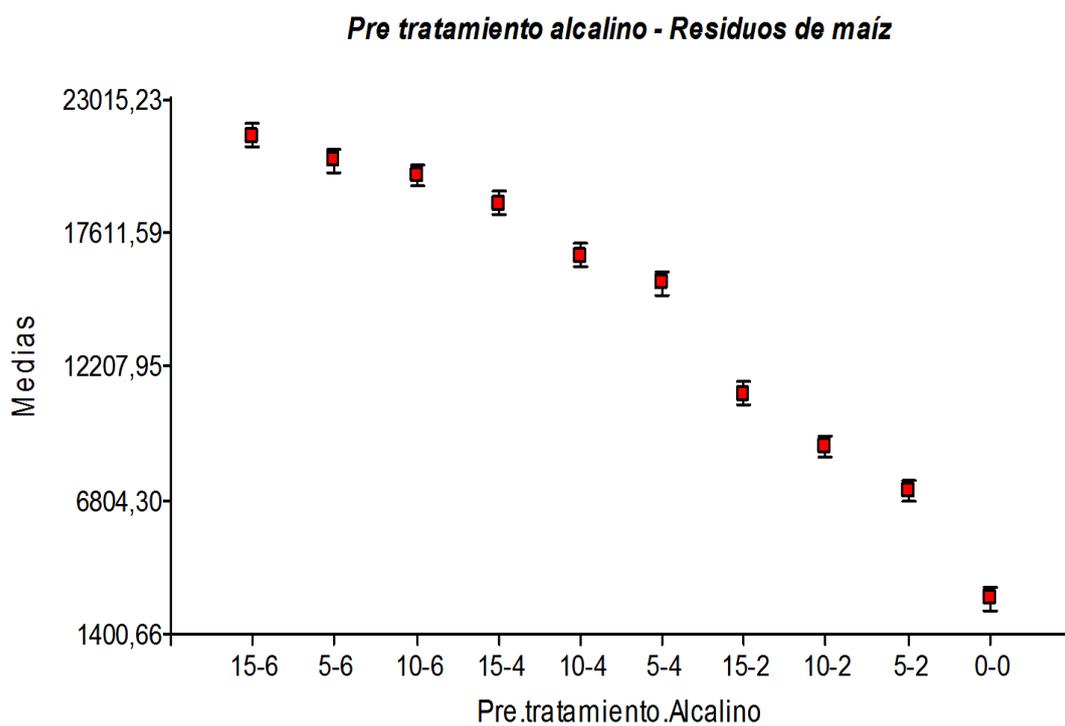


5.7 Comparación múltiple

Pre tratamiento Alcalino	Medias	E.E.	Grupos							
15-6	21577,68	455,07	A							
5-6	20552,11	455,07	A	B						
10-6	19951,84	455,07		B	C					
15-4	18824,3	455,07			C					
10-4	16722,17	455,07				D				
5-4	15603,9	455,07				D				
15-2	11142,4	455,07					E			
10-2	8976,54	455,07						F		
5-2	7195,42	455,07							G	
0-0	2838,21	455,07								H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

5.8 Gráficas de comparación



5.9 Análisis de la varianza para pre tratamiento nuevo

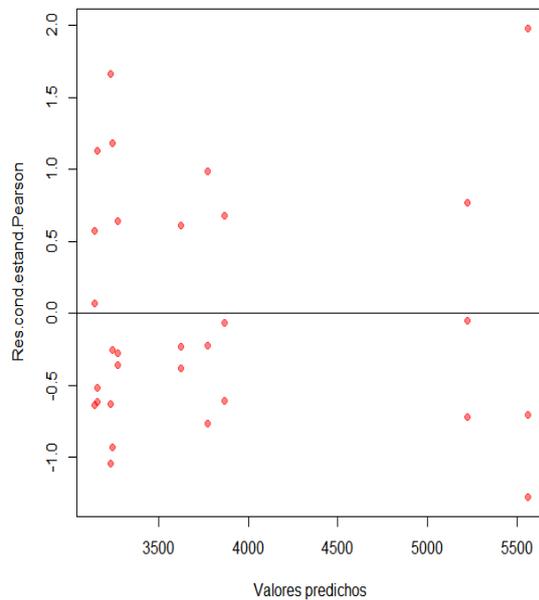
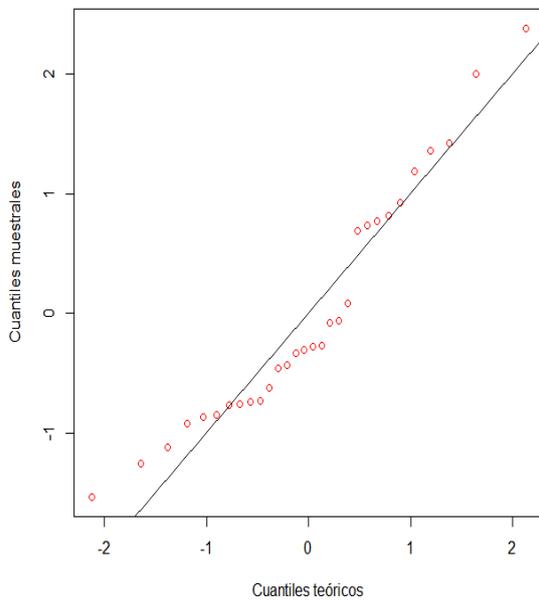
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20756058,1	9	2306228,67	77,16	<0,0001
Pre tratamiento Nuevo	20756058,1	9	2306228,67	77,16	<0,0001
Error	597810,93	20	29890,55		
Total	21353869	29			

5.10 Cumplimiento de supuestos

La normalidad con un $r > 0.96$ demuestra una distribución normal, en este caso se presenta un de r de 0.967. La homocedasticidad, demuestra una dispersión de datos. Los modelos se tomaron en cuenta las medidas de ajuste del modelo; para ello se consideraron valores de AIC y BIC menores como un mejor ajuste del modelo. Para el pre tratamiento nuevo de residuos de maíz presentó un valor de 295.85 y 306.903. No se modeló la corrida estadística.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de varianza

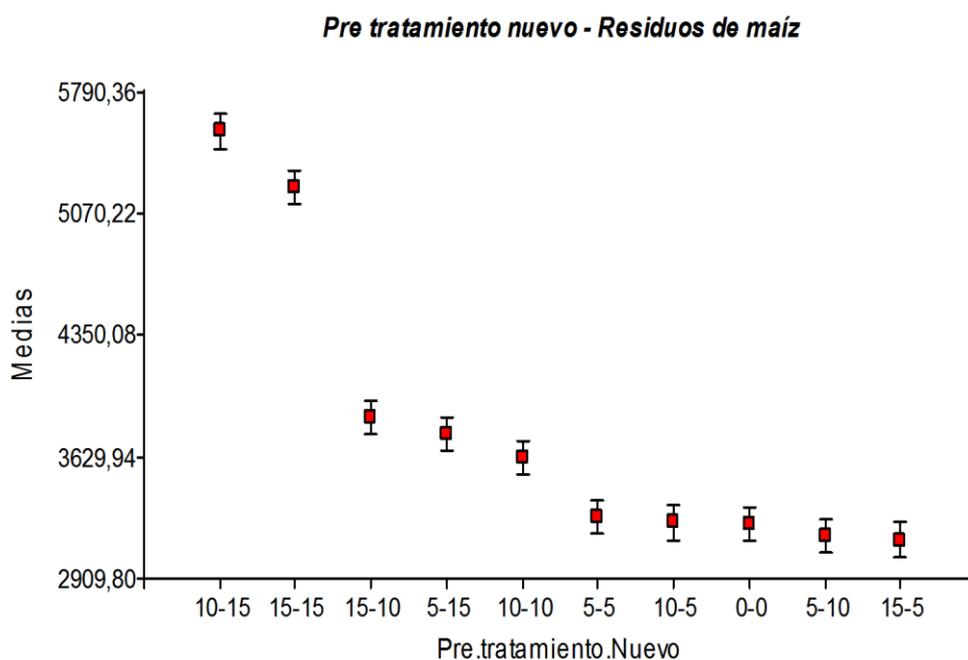


5.11 Comparación múltiple

Pre tratamiento Nuevo	Medias	E.E.	Grupos			
10-15	5559,61	99,82	A			
15-15	5222,97	99,82		B		
15-10	3865,98	99,82			C	
5-15	3770,95	99,82			C	
10-10	3621,47	99,82			C	
5-5	3273,24	99,82				D
10-5	3241,37	99,82				D
0-0	3230,94	99,82				D
5-10	3157,35	99,82				D
15-5	3140,55	99,82				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

5.12 Gráficas de comparación



Anexo 6. Análisis estadístico de azúcares reductores en sacarificación enzimática para cascarilla de arroz

6.1 Análisis de la varianza para la hidrólisis en sustrato “ácido”

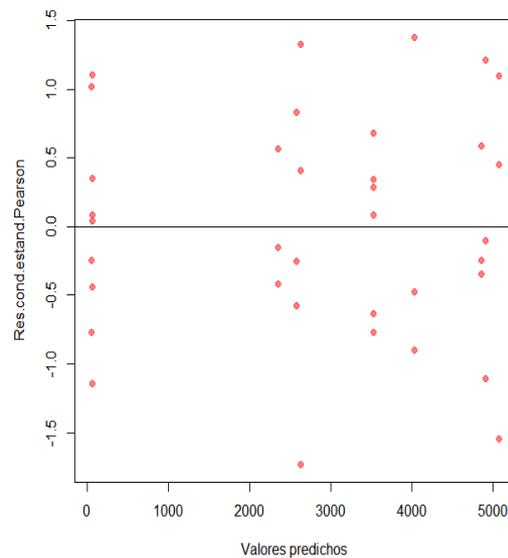
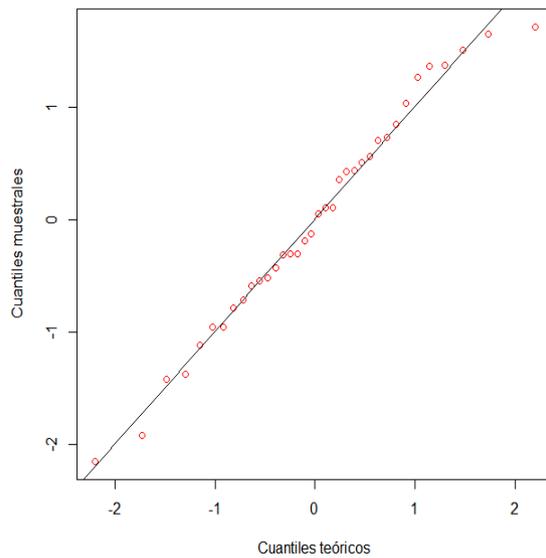
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	117366585	13	9028198,83	368,9	<0,0001
Tratamiento	116798016	3	38932672,1	1590,83	<0,0001
Día	392574,47	2	196287,23	8,02	0,0024
Unidad	175994,13	8	21999,27	0,9	0,5342
Error	538409,97	22	24473,18		
Total	117904995	35			

6.2 Cumplimiento de supuesto

Las medidas de ajuste del modelo se tomaron en base a valores de AIC y BIC menores. Para el tratamiento ácido de cascarilla de arroz se obtuvo valores de 303.05 y 325.43

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de varianza

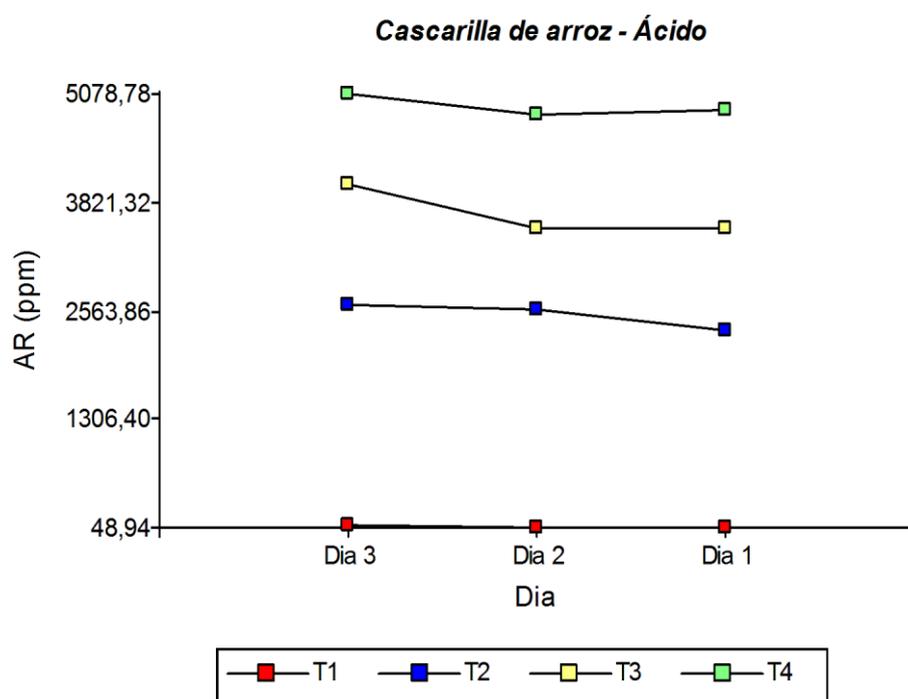


6.3 Comparación múltiple

Tratamiento "Ácido"	Día	Medias	E.E.	Grupos								
T4	Dia 3	5067,87	103,28	A								
T4	Dia 1	4902,9	103,28	A								
T4	Dia 2	4849,75	103,28	A								
T3	Dia 3	4027,78	86,22		B							
T3	Dia 2	3523,12	86,22			C						
T3	Dia 1	3521,54	86,22			C						
T2	Dia 3	2624,18	54,51				D					
T2	Dia 2	2573,54	54,51				D					
T2	Dia 1	2345,94	54,51					E				
T1	Dia 3	64,07	1,72						F			
T1	Dia 2	58,28	1,72							G		
T1	Dia 1	49,66	1,72								H	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

6.4 Gráficos de comparación



6.5 Análisis de la varianza para hidrólisis en sustrato “alcalino”

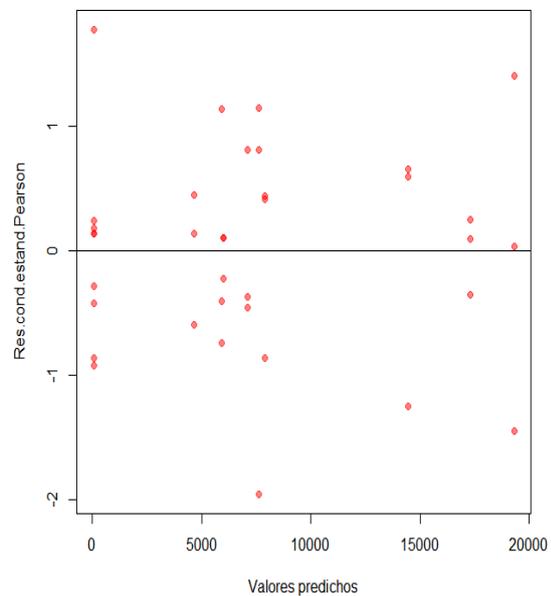
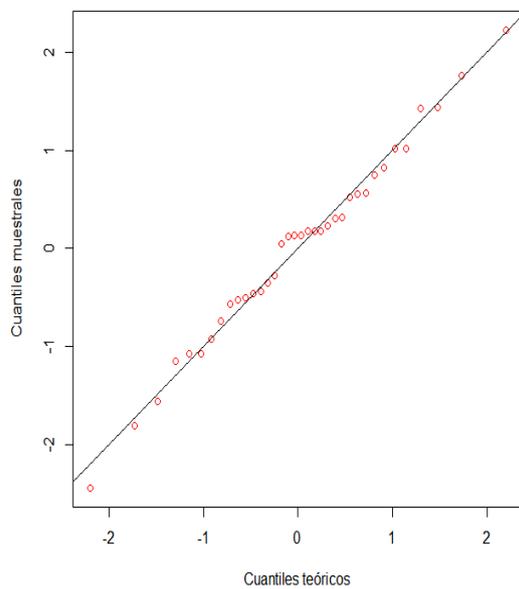
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1215395195	13	93491938,1	11,76	<0,0001
Tratamiento	713584145	3	237861382	29,92	<0,0001
Día	500437093	2	250218547	31,48	<0,0001
Unidad	1373956,56	8	171744,57	0,02	>0,9999
Error	174887324	22	7949423,82		
Total	1390282519	35			

6.6 Cumplimiento de supuestos

Las medidas de ajuste del modelo se tomaron en base a valores de AIC y BIC menores. Para el tratamiento alcalino de cascarilla de arroz se obtuvo valores de 344.79 y 367.17.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de varianza

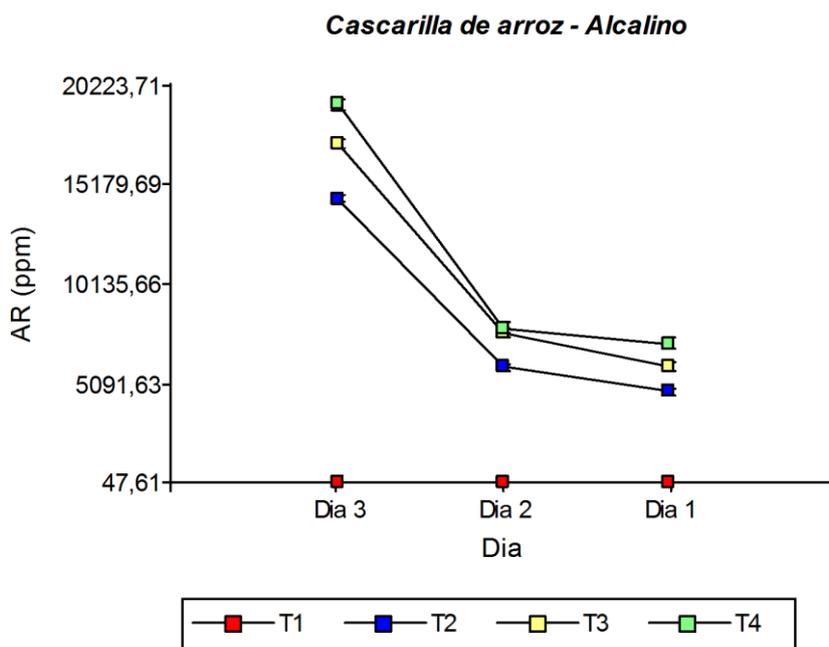


6.7 Comparación múltiple

Tratamiento "Alcalino"	Dia	Medias	E.E.	Grupos											
T4	Dia 3	19300,85	284,84	A											
T3	Dia 3	17282,75	229,22		B										
T2	Dia 3	14462,81	167,01			C									
T4	Dia 2	7888,21	284,84				D								
T3	Dia 2	7631,67	229,22				D								
T4	Dia 1	7110,04	284,84				D								
T3	Dia 1	5983,25	229,22					E							
T2	Dia 2	5897,74	167,01					E							
T2	Dia 1	4667,67	167,01						F						
T1	Dia 3	77,95	1,9							G					
T1	Dia 2	66,37	1,9								H				
T1	Dia 1	51,04	1,9									I			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

6.8 Gráficos de comparación



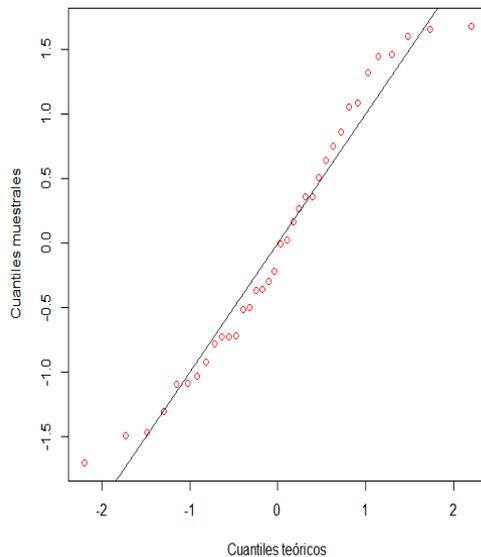
6.9 Análisis de la varianza para hidrólisis en sustrato “neutro”

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	100998485	13	7769114,2	300,26	<0,0001
Tratamiento	100671008	3	33557002,6	1296,9	<0,0001
Día	148810,4	2	74405,2	2,88	0,0777
Unidad	178666,45	8	22333,31	0,86	0,5607
Error	569243,05	22	25874,68		
Total	101567728	35			

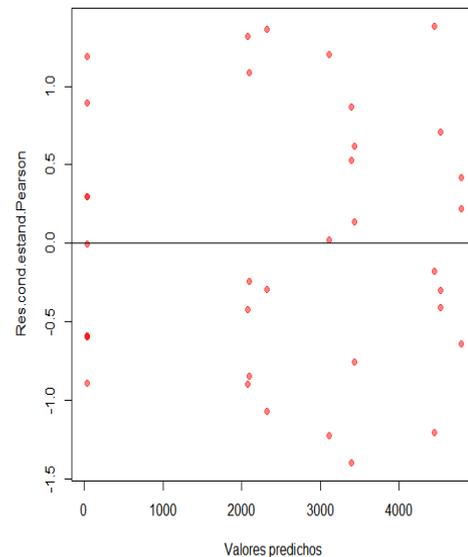
6.10 Cumplimiento de supuestos

Las medidas de ajuste del modelo se tomaron en base a valores de AIC y BIC menores. Para el tratamiento “nuevo” se obtuvieron valores de 294.77 y 317.15.

i) Normalidad de errores



ii) Homogeneidad de varianza

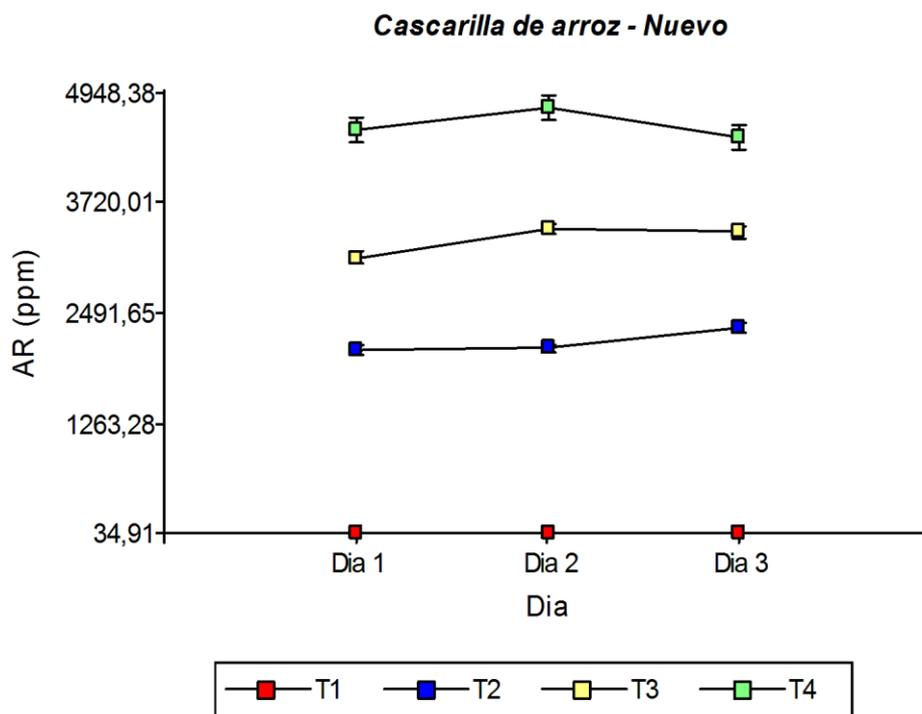


6.11 Comparación múltiple

Tratamiento "Nuevo"	Dia	Medias	E.E.	Grupos									
T4	Dia 2	4784,49	133,8	A									
T4	Dia 1	4526,11	133,8	A	B								
T4	Dia 3	4450,34	133,8		B								
T3	Dia 2	3431,82	66,81			C							
T3	Dia 3	3392,09	66,81			C							
T3	Dia 1	3105,95	66,81				D						
T2	Dia 3	2318,31	51,14					E					
T2	Dia 2	2094,14	51,14						F				
T2	Dia 1	2072,43	51,14						F				
T1	Dia 1	39,07	0,77									G	
T1	Dia 2	38,68	0,77									G	
T1	Dia 3	35,92	0,77										H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

6.12 Gráficos de comparación



Anexo 7. Análisis estadístico de azúcares reductores en sacarificación enzimática para residuos de caña de azúcar

7.1 Análisis de la varianza para hidrólisis en sustrato “ácido”

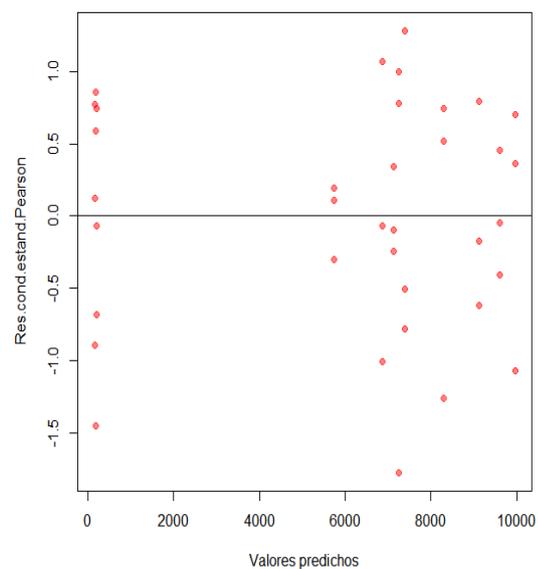
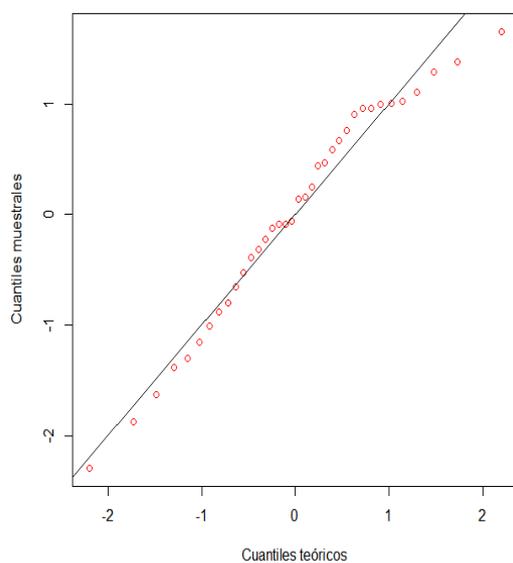
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	445661466	13	34281651,2	80,18	<0,0001
Tratamiento	444589371	3	148196457	346,59	<0,0001
Día	840904,52	2	420452,26	0,98	0,3899
Unidad	231189,85	8	28898,73	0,07	0,9997
Error	9406794,08	22	427581,55		
Total	455068260	35			

7.2 Cumplimiento de supuestos

Las medidas de ajuste del modelo se tomaron en base a valores de AIC y BIC menores. Para el tratamiento “ácido” de residuos de caña de azúcar se obtuvieron valores de 337.45 y 359.83.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de varianza

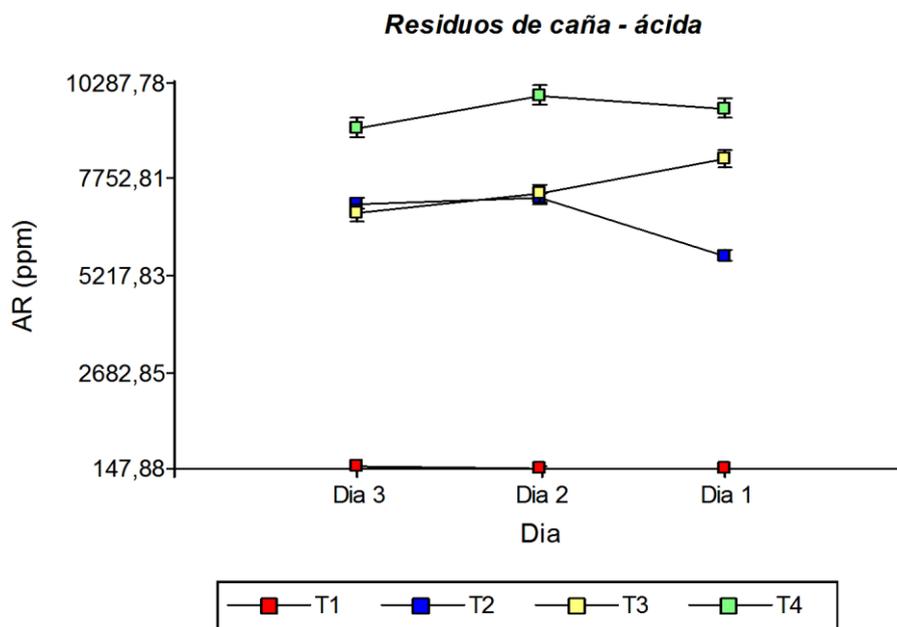


7.3 Comparación múltiple

Tratamiento "Ácido"	Día	Medias	E.E.	Grupos							
T4	Dia 2	9957,61	261,77	A							
T4	Dia 1	9610,3	261,77	A							
T4	Dia 3	9113,01	261,77	A							
T3	Dia 1	8299,98	225,43		B						
T3	Dia 2	7378,42	225,43			C					
T2	Dia 2	7248,18	139,07			C					
T2	Dia 3	7115,96	139,07			C					
T3	Dia 3	6857,45	225,43			C					
T2	Dia 1	5743,82	139,07				D				
T1	Dia 3	194,18	3,36					E			
T1	Dia 2	173,79	3,36						F		
T1	Dia 1	153,6	3,36							G	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

7.4 Gráficos de comparación



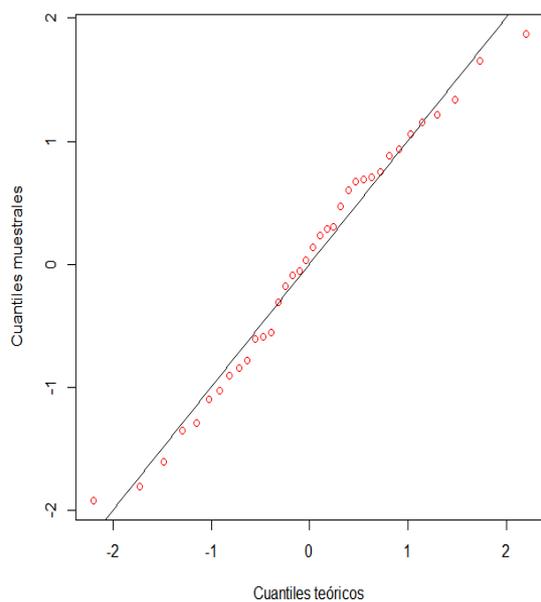
7.5 Análisis de la varianza para hidrólisis en sustrato “alcalino”

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4295017286	13	330385945	54,9	<0,0001
Tratamiento	4247441704	3	1415813901	235,25	<0,0001
Día	41109304	2	20554652	3,42	0,0511
Unidad	6466278,46	8	808284,81	0,13	0,9968
Error	132402881	22	6018312,76		
Total	4427420167	35			

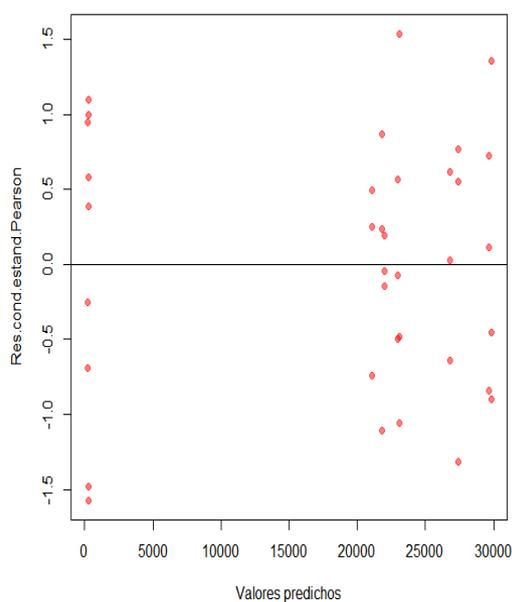
7.6 Cumplimiento de supuestos

Las medidas de ajuste del modelo se tomaron en base a valores de AIC y BIC menores. Para el tratamiento “alcalino” de residuos de caña de azúcar se obtuvo valores de 396.81 y 419.19.

i) Normalidad de errores



ii) Homogeneidad de varianza

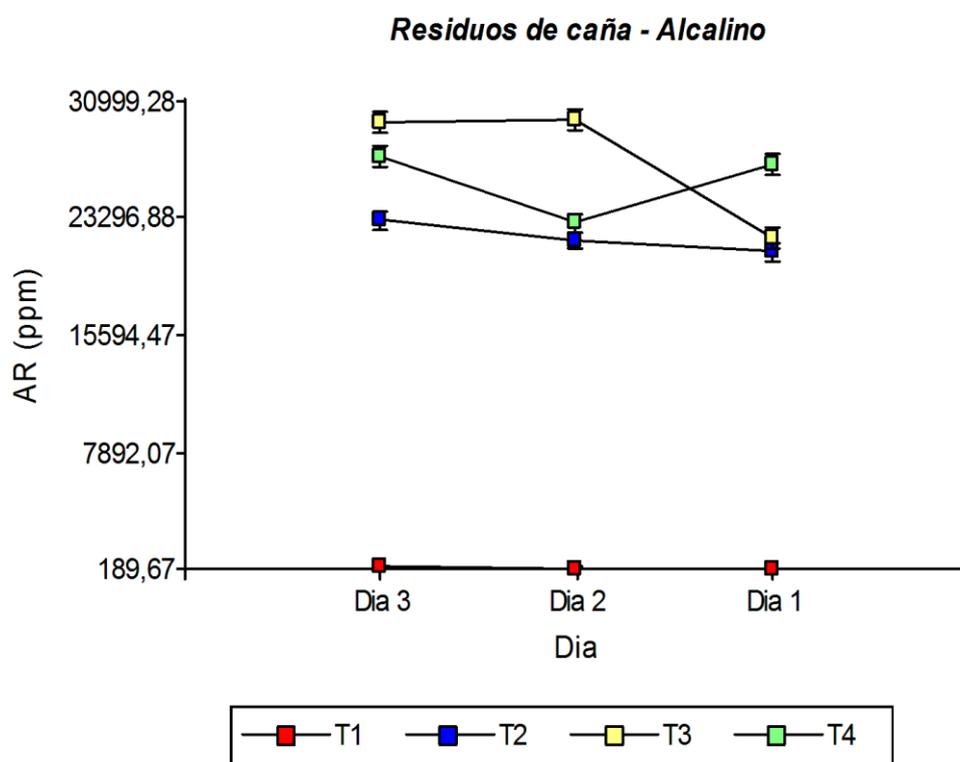


7.7 Comparación múltiple

Tratamiento "Alcalino"	Dia	Medias	E.E.	Grupos							
T3	Dia 2	29829,42	707,34	A							
T3	Dia 3	29683,4	707,34	A							
T4	Dia 3	27412,71	664,53		B						
T4	Dia 1	26797,01	664,53		B						
T2	Dia 3	23123,92	568,35			C					
T4	Dia 2	22958,16	664,53			C					
T3	Dia 1	21993,84	707,34			C	D				
T2	Dia 2	21808,34	568,35			C	D				
T2	Dia 1	21073,59	568,35				D				
T1	Dia 3	304,75	6,24					E			
T1	Dia 2	274,1	6,24						F		
T1	Dia 1	201,68	6,24							G	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

7.8 Gráficos de comparación



7.9 Análisis de la varianza para hidrólisis en sustrato “neutro”

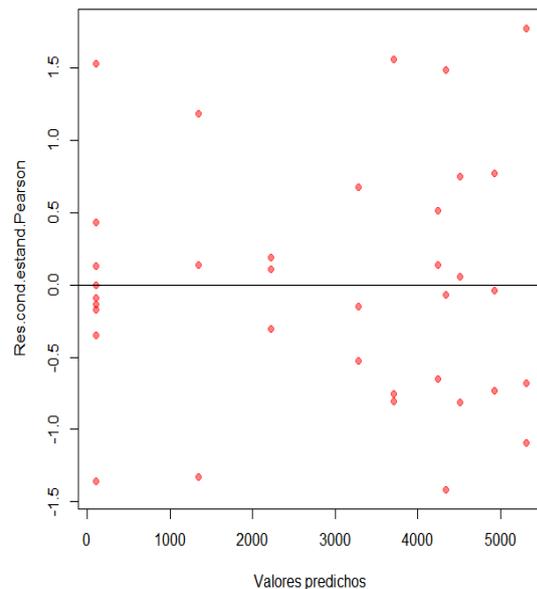
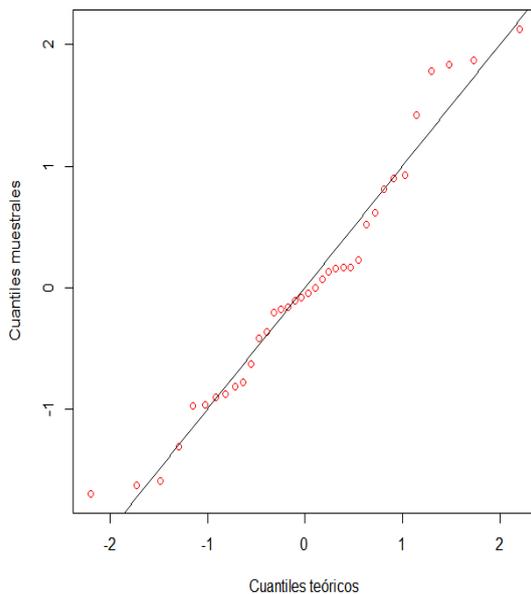
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	117424377	13	9032644,41	15,03	<0,0001
Tratamiento	103663107	3	34554369	57,49	<0,0001
Día	13729431,4	2	6864715,68	11,42	0,0004
Unidad	31838,95	8	3979,87	0,01	>0,9999
Error	13223442,6	22	601065,57		
Total	130647820	35			

7.10 Cumplimiento de supuestos

Las medidas de ajuste del modelo se tomaron en base a valores de AIC y BIC menores. Para el tratamiento “neutro” se obtuvieron valores de 297.85 y 320.23.

i) Normalidad de errores

ii) Homogeneidad de varianza

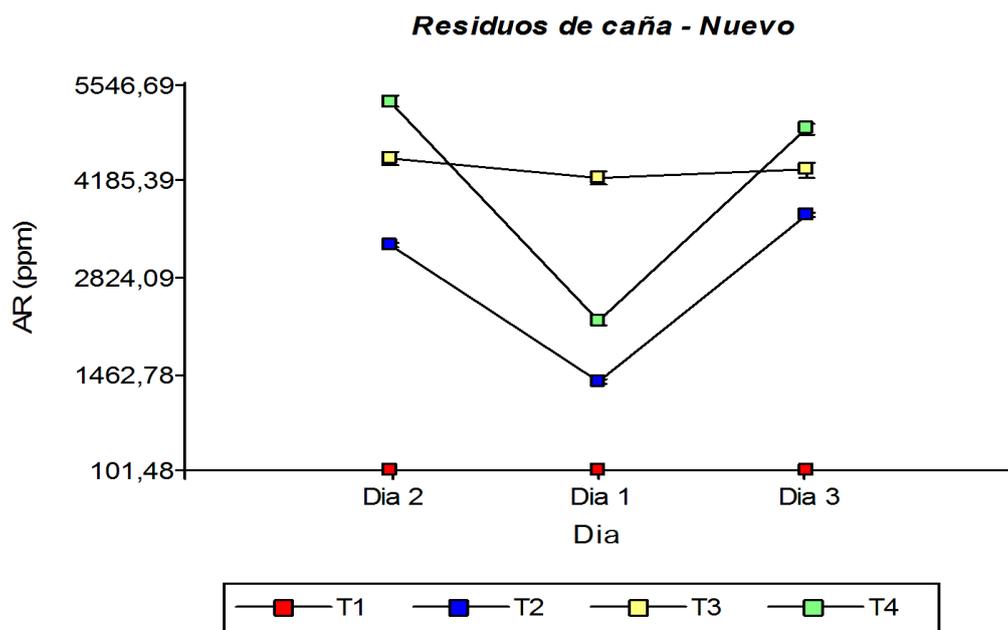


7.11 Comparación múltiple

Tratamiento "Nuevo"	Dia	Medias	E.E.	Grupos									
T4	Dia 2	5307,3	77,2	A									
T4	Dia 3	4930,79	77,2		B								
T3	Dia 2	4510,33	99,87			C							
T3	Dia 3	4341,02	99,87			C							
T3	Dia 1	4238,27	99,87			C							
T2	Dia 3	3705,72	29,91				D						
T2	Dia 2	3285	29,91					E					
T4	Dia 1	2218,06	77,2							F			
T2	Dia 1	1345,05	29,91								G		
T1	Dia 2	109,06	1,74									H	
T1	Dia 1	106,17	1,74									H	
T1	Dia 3	103,67	1,74									H	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

7.12 Gráficos de comparación



Anexo 8. Análisis estadístico de azúcares reductores en sacarificación enzimática para residuos de maíz

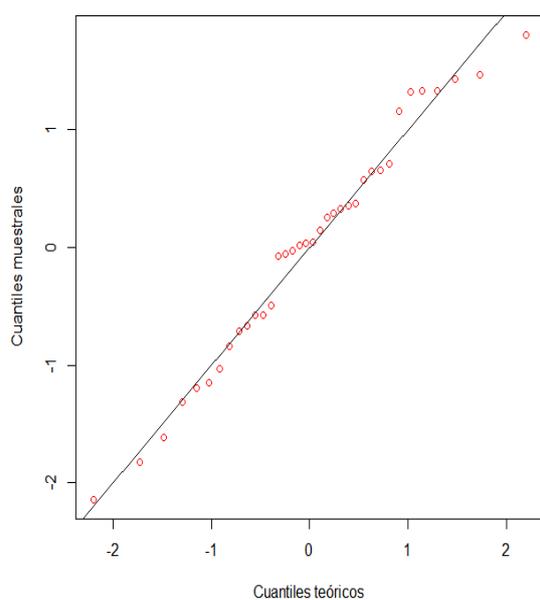
8.1 Análisis de la varianza para hidrólisis en sustrato “ácido”

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	954186285	13	73398945	98,33	<0,0001
Tratamiento	952046748	3	317348916	425,14	<0,0001
Día	1076969,88	2	538484,94	0,72	0,4972
Unidad	1062567,06	8	132820,88	0,18	0,9917
Error	16422006,1	22	746454,82		
Total	970608291	35			

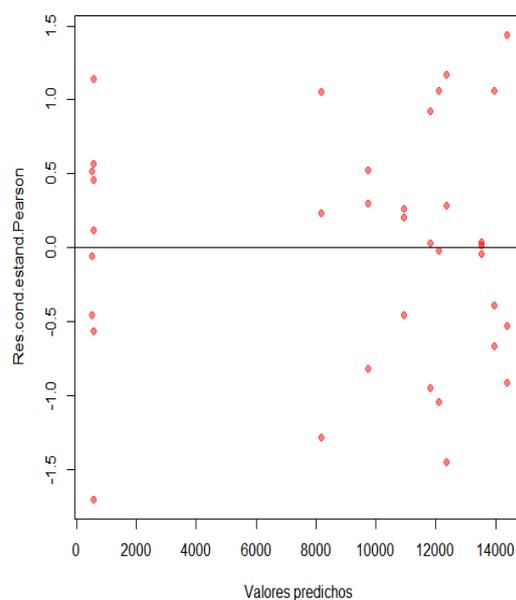
8.2 Cumplimiento de supuestos

Las medidas de ajuste del modelo se tomaron en base a valores de AIC y BIC menores. Para el tratamiento “ácido” de residuos de maíz se obtuvieron valores de 378.98 y 401.37.

i) Normalidad de errores



ii) Homogeneidad de varianza

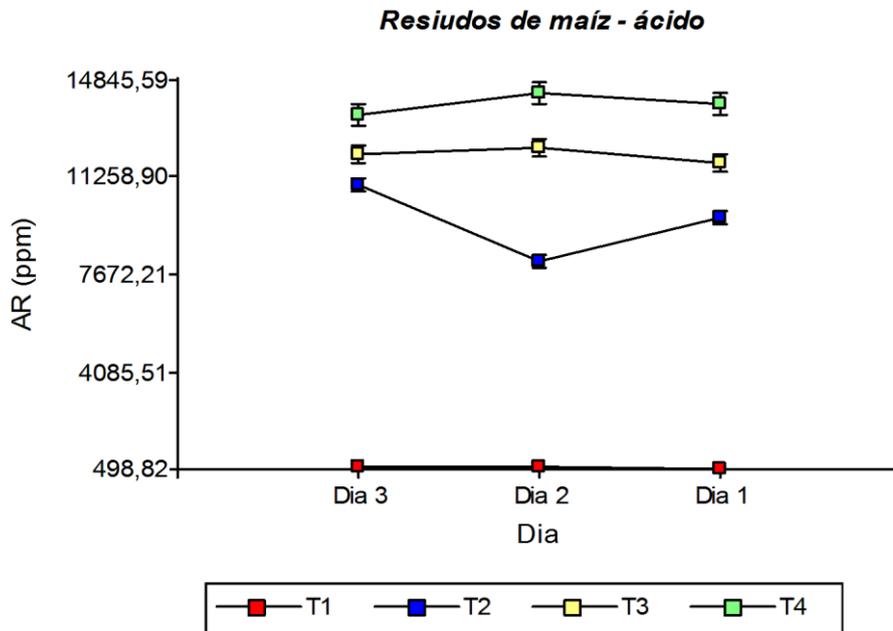


8.3 Comparación múltiple

Tratamiento "Ácido"	Dia	Medias	E.E.	Grupos							
T4	Dia 2	14368,09	395,97	A							
T4	Dia 1	13955,65	395,97	A							
T4	Dia 3	13529,41	395,97	A							
T3	Dia 2	12365,12	328,01		B						
T3	Dia 3	12088,85	328,01		B						
T3	Dia 1	11812,57	328,01		B						
T2	Dia 3	10940,35	238,14			C					
T2	Dia 1	9740,54	238,14				D				
T2	Dia 2	8169,74	238,14					E			
T1	Dia 3	575,43	12,01							F	
T1	Dia 2	567,15	12,01							F	
T1	Dia 1	515,05	12,01								G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

8.4 Gráficos de comparación



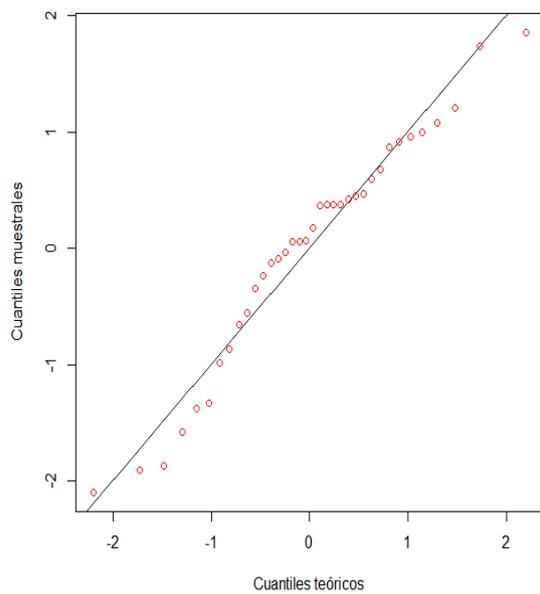
8.5 Análisis de la varianza para hidrólisis en sustrato “alcalino”

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2434558299	13	187273715	120,49	<0,0001
Tratamiento	2372807051	3	790935684	508,87	<0,0001
Día	60242771,7	2	30121385,8	19,38	<0,0001
Unidad	1508475,48	8	188559,43	0,12	0,9977
Error	34194313,7	22	1554286,99		
Total	2468752612	35			

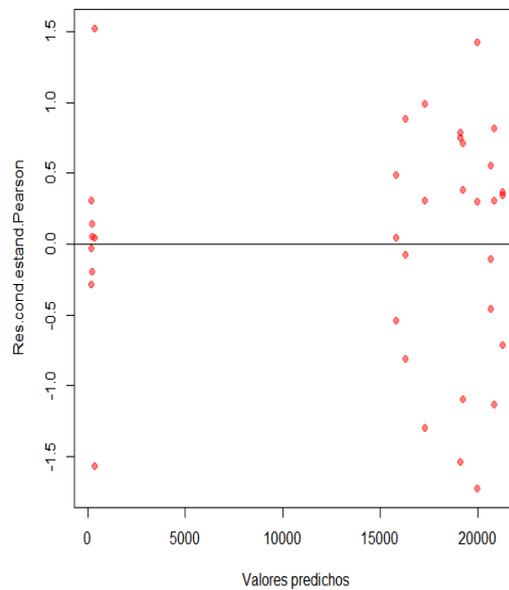
8.6 Cumplimiento de supuestos

Las medidas de ajuste del modelo se tomaron en base a valores de AIC y BIC menores. Para el tratamiento “alcalino” de residuos de maíz se obtuvieron valores de 383.93 y 406.31.

i) Normalidad de errores



ii) Homogeneidad de varianza

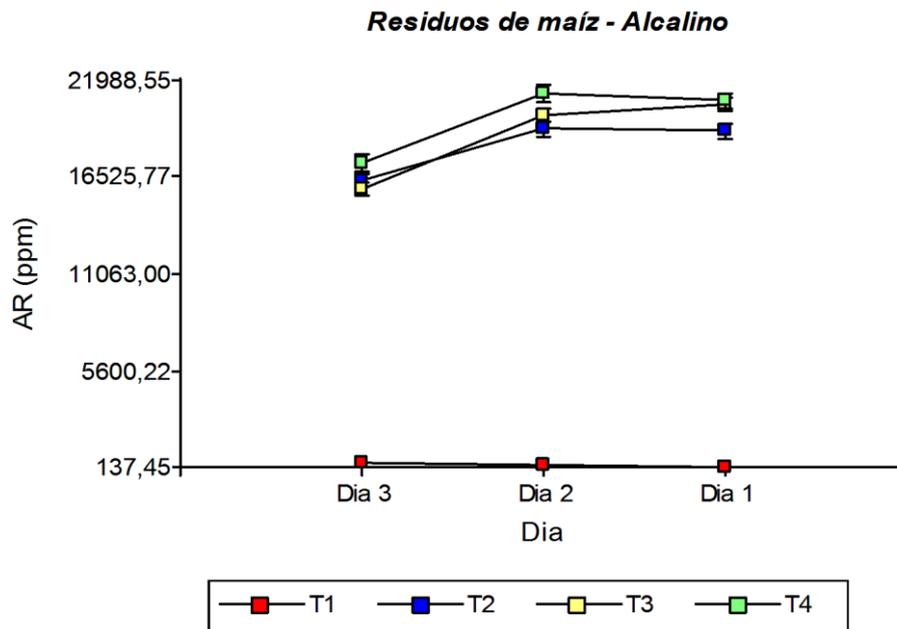


8.7 Comparación múltiple

Tratamiento "Alcalino"	Día	Medias	E.E.	Grupos									
T4	Día 2	21263,69	478,42	A									
T4	Día 1	20834,81	478,42	A	B								
T3	Día 1	20663,79	374,93	A	B								
T3	Día 2	19982,32	374,93		B	C							
T2	Día 2	19239,02	389,71			C							
T2	Día 1	19111,41	389,71			C							
T4	Día 3	17291,96	478,42				D						
T2	Día 3	16303,96	389,71				D	E					
T3	Día 3	15815,88	374,93					E					
T1	Día 3	347,51	8,06						F				
T1	Día 2	220,62	8,06							G			
T1	Día 1	155,9	8,06								H		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

8.8 Gráficos de comparación



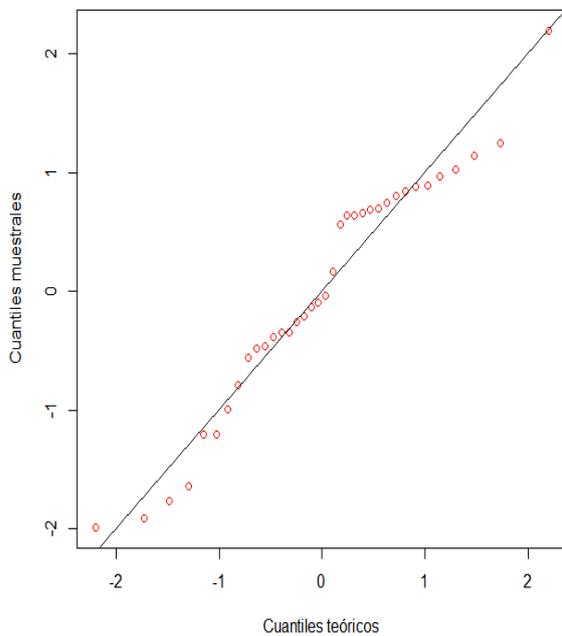
8.9 Análisis de la varianza para hidrólisis en sustrato “neutro”

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1162898483	13	89453729,5	200,59	<0,0001
Tratamiento	1153540575	3	384513525	862,21	<0,0001
Día	6889635,52	2	3444817,76	7,72	0,0029
Unidad	2468271,95	8	308533,99	0,69	0,6947
Error	9811151,91	22	445961,45		
Total	1172709635	35			

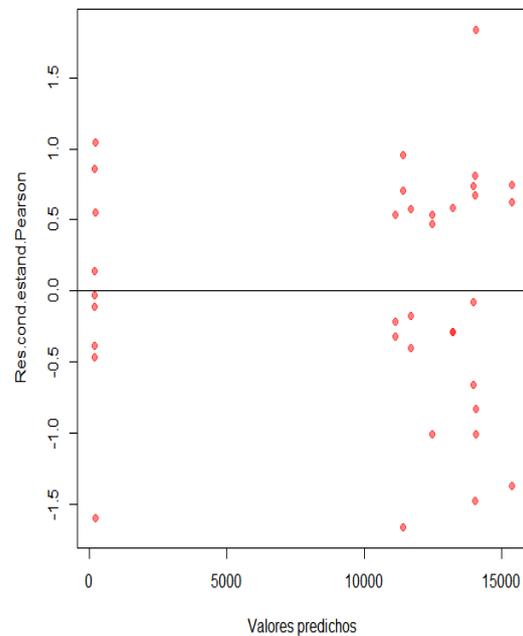
8.10 Cumplimiento de supuestos

Las medidas de ajuste del modelo se tomaron en base a valores de AIC y BIC menores. Para el tratamiento “nuevo” de residuos de maíz se obtuvieron valores de 359.998 y 382.381.

i) Normalidad de errores



ii) Homogeneidad de varianza

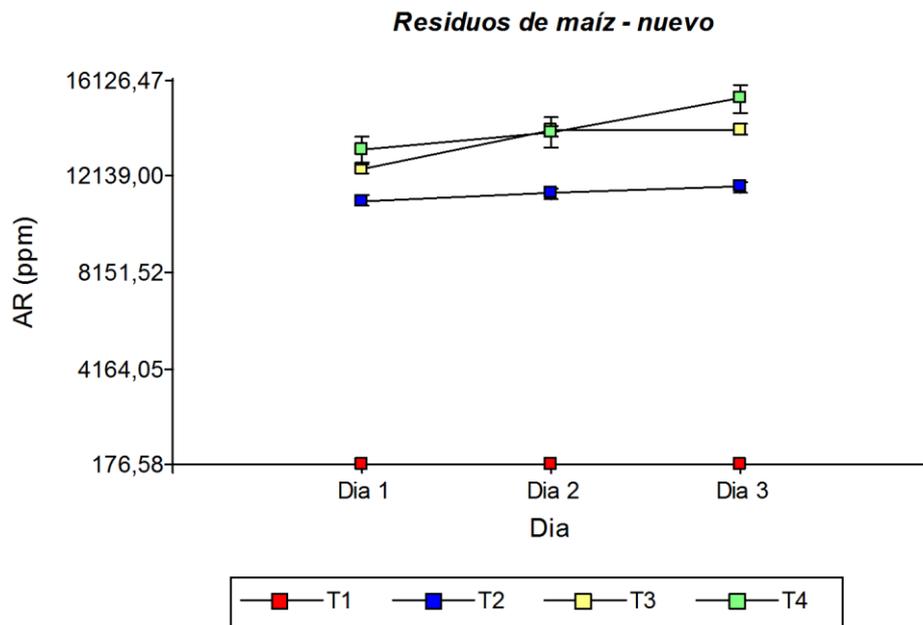


8.11 Comparación múltiple

Tratamiento Nuevo	Dia	Medias	E.E.	Grupos							
T4	Dia 3	15365,95	594,6	A							
T3	Dia 3	14073,27	219,47	A	B						
T3	Dia 2	14047,48	219,47	A	B						
T4	Dia 2	13976,7	594,6	A	B						
T4	Dia 1	13236,82	594,6		B	C					
T3	Dia 1	12482,21	219,47			C					
T2	Dia 3	11704,7	213,87				D				
T2	Dia 2	11430,27	213,87				D				
T2	Dia 1	11144,53	213,87				D				
T1	Dia 1	206,55	2,75					E			
T1	Dia 2	192,86	2,75						F		
T1	Dia 3	180,89	2,75							G	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

8.12 Gráficos de comparación



Anexo 9. Métodos de análisis

9.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES

Se empleó el método modificado de Dubois *et al.* (1956). Azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, incluidos los éteres metílicos libres con grupos reductores libres o potencialmente libres, dan un color naranja-amarillo cuando son tratados con fenol y ácido sulfúrico concentrado. La reacción es sensible y de coloración estable (Dubois *et al.* 1956).

Procedimiento:

Se tomó 200 ul de la muestra (concentrada o diluida), se agrega 200 ul de agua destilada y 200 ul de solución de fenol al 5%; finalmente se agrega 1ml de Ácido sulfúrico concentrado. Se deja enfriar y se procede a la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

La concentración de azúcares totales se realiza mediante la interpolación de absorbancia en la curva estándar. La curva se la Figura 1.

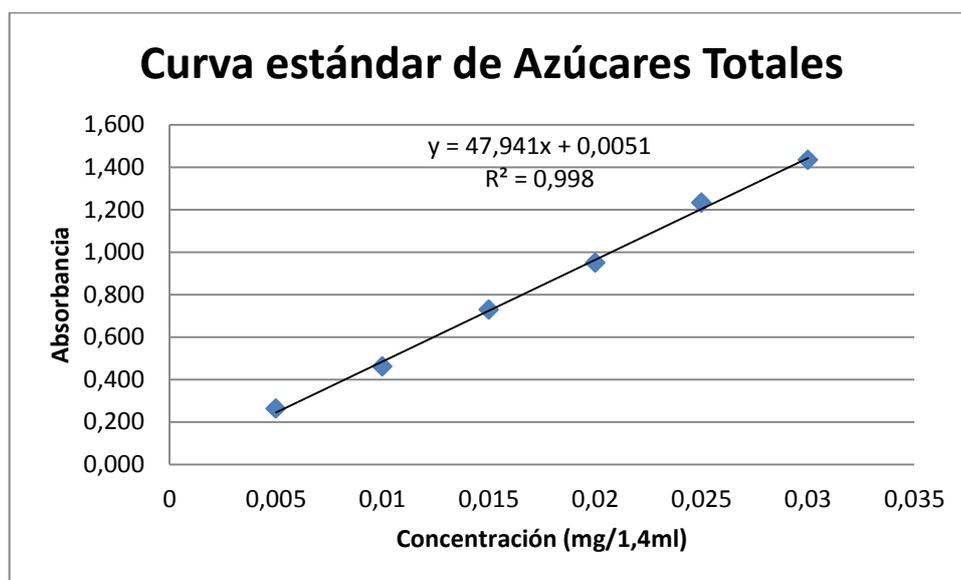


Figura 1. Curva de calibración estándar de azúcares totales

9.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Se empleó el método modificado de Miller (1959). El método de DNS se base en una reacción redox que ocurre entre los azúcares reductores y el ácido 3,5-dinitrosalicílico bajo ciertas condiciones, produciéndose una coloración más intensa a medida que aumentan los azúcares reductores. La coloración varía en un naranja. Este método ha pasado por modificaciones, su ventaja principal radica en su alta sensibilidad y productividad (Bello Gil *et al.* 2006, Fajardo Castillo y Sarmiento Forero 2007).

Procedimiento:

Se tomó 100 ul de la muestra (concentrada o diluida) y se agrega 100 ul de DNS; se dispuso a ebullición por 5 minutos y se enfrían los tubos con agua de caño. Finalmente se agrega 1ml de agua destilada, se deja reposar por 15 minutos. Se procede a la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. La curva está en la Figura 2.

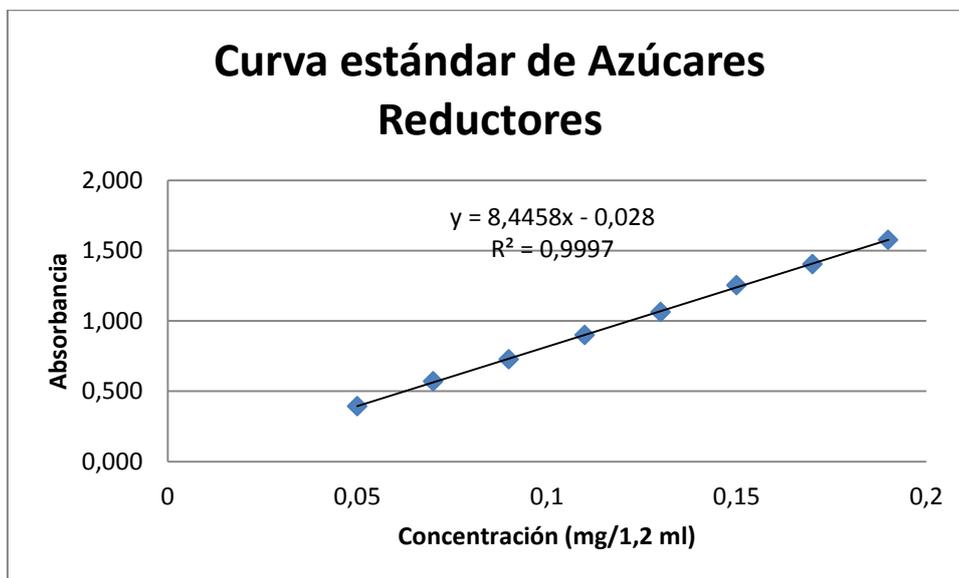


Figura 2. Curva de calibración de azúcares reductores (ppm)

Anexo 10. Ensayos preliminares

En la Tabla 1 se aprecia la medición de los °Brix por cada hora de incubación, así como el pH final de la misma. Por ejemplo, en el pre tratamiento “Nuevo” se agrega silicato de potasio y peróxido de hidrógeno; entonces si se trabaja con 5% de Silicato de potasio y 15% de H₂O₂, la proporción 1:1 indica que se agrega el mismo volumen de ambos reactivos. Por tanto se obtenían valores según la concentración de los reactivos y proporciones de las mismas a cada hora de la incubación y la medición de pH al finalizar la incubación. Estos resultados son de los residuos de caña de azúcar.

Tabla 1. Valores obtenidos durante las 3 horas de incubación en residuos de caña de azúcar con pre tratamiento “Nuevo”

PRE TRATAMIENTO “N” (5%-15%)	°Brix 1h	°Brix 2h	°Brix 3h	pH
1:1	3,2	2,8	3,0	6,81
1:0.5	2,4	2,2	2,4	7,15
1:0.2	1,4	1,4	1,6	7,93
0.5:1	3,6	3,4	3,2	5,10
0.5:0.5	2,0	1,8	2,0	5,93
0.5:0.2	1,0	1,2	1,4	6,52
0.2:1	3,8	3,2	3,4	4,74
0.2:0.5	2,4	2,0	2,0	5,07
0.2:0.2	1,2	1,2	1,2	5,68

Según los datos que se obtenía se descartaban las proporciones que presentaban menor °Brix y se apreciaba que los mismos concordaban con un pH muy cercano a 5 lo que facilitaría en el acondicionamiento del residuo para la etapa de hidrólisis enzimática.

Para los pre tratamientos ácido y alcalino, lo que se varió sólo fue el porcentaje de reactivo más no la cantidad de los mismos a agregar. Como se observa en la Tabla 2 se mantenía fijo la concentración de ácido acético y se variaba la concentración del peróxido de

hidrógeno. Para este caso se apreciaba que a medida que se aumenta la concentración de peróxido de hidrógeno se aumenta los °Brix a cada hora; sin embargo, el pH tendía a bajar más. Por tanto, se descartaban aquellos que tuviesen un pH más ácido por tema de costos para el acondicionamiento del material pre tratado. El criterio para el pre tratamiento alcalino se basó en los °Brix, dado que, a medida que la concentración de peróxido de hidrógeno aumentaba dejaba de aumentar los °Brix.

Tabla 2. ° Brix de cada hora pre- tratamiento ácido x-5% en caña de azúcar

PRE TRATAMIENTO ÁCIDO	°Brix 1h	°Brix 2h	°Brix 3h	pH
1% - 5%	2,6	2,6	2,6	3,24
5% - 5%	3,0	3	3,2	3,07
10% - 5%	4,2	4,2	4,2	3,01
15% - 5%	5,4	5,4	5,4	2,94
20% - 5%	5,2	6,0	6,4	2,88
25% - 5%	5,4	6,4	7,2	2,91

A parte de las mediciones de °Brix y pH, se medía cualitativamente los azúcares reductores con el reactivo de Benedict. En las siguientes fotografías se aprecia lo que se obtenía, en esta parte las mediciones también se hacían a cada hora de la incubación.



Fotografía 1. Pre tratamiento ácido en caña de azúcar



Fotografía 2. Pre tratamiento “nuevo” en caña de azúcar



Fotografía 3. Pre tratamiento alcalino en caña de azúcar

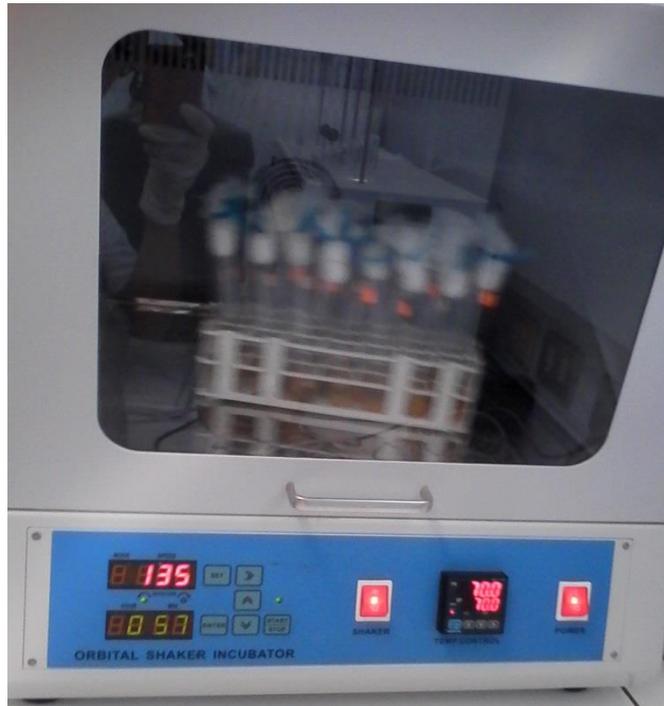
Luego realizar la reacción de Benedict se apuntaba los colores de la reacción, en la Tabla 3 se muestra como ejemplo los resultados obtenidos en el pre tratamiento ácido de caña de azúcar. Los colores que se obtenían era celeste, verde y naranja; el primero indicaba ausencia de azúcares reductores, el segundo color indicaba trazas, en tanto que el color naranja indicaba abundancia de los azúcares. Es por ello que se consideró un potencial el líquido obtenido en el pre tratamiento para fermentar. Aquí el criterio de selección fue descartar aquellos que indicaban ausencia de azúcares reductores.

Tabla 3. Colores obtenidos en la reacción de Benedict en pre tratamiento ácido de caña de azúcar

PRE- TRATAMIENTO ÁCIDO	1h	2h	3h
1% - 20%	Verde	Verde	Verde
5% - 20%	Verde	Verde	Verde
10% - 20%	Verde	Celeste	Verde
15% - 20%	Celeste	Celeste	Verde
20% - 20%	Celeste	Celeste	Celeste
25% - 20%	Celeste	Celeste	Celeste

Como se ha visto en las Tablas y Fotografías, los ensayos preliminares fueron extensos para cada uno de los residuos trabajados (cascarilla de arroz, residuos de caña de azúcar y residuos de maíz). Los pre tratamientos seleccionados para los ensayos definitivos del presenta trabajo de investigación fueron una intersección entre los °Brix, pH y azúcares reductores.

Anexo 11. Registro Fotográfico



Fotografía 1. Inicio de incubación de pre tratamiento, 70°C por 3 horas.



Fotografía 2. Parte sólida y líquida listos para ser almacenados



Fotografía 3. Medición de azúcares totales mediante método fenol-ácido



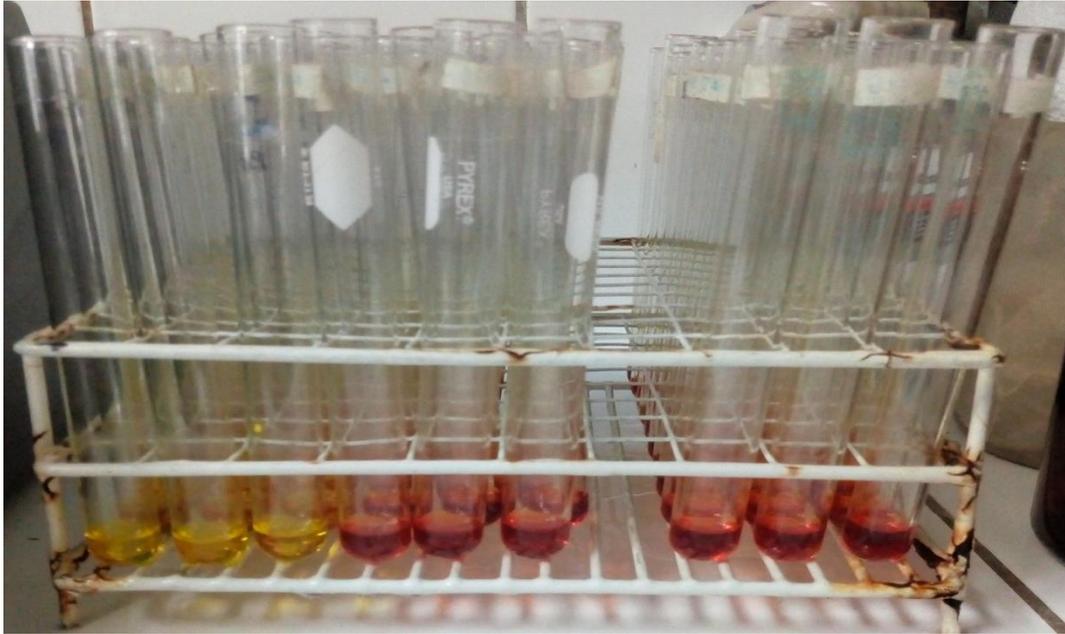
Fotografía 4. Replicación de pre tratamiento óptimo para obtener material en hidrólisis enzimática



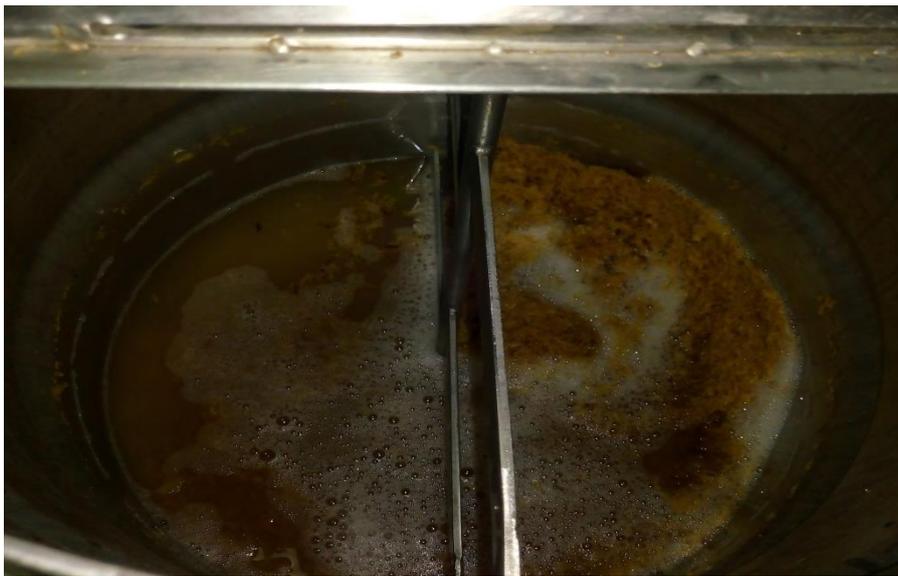
Fotografía 5. Incubación de la etapa hidrólisis enzimática, 50°C por 72 horas



Fotografía 6. Término de incubación a 50°C, listo para separación de parte sólida y líquida y su respectivo análisis.



Fotografía 7. Cuantificación de azúcares reductores mediante metodología de Miller



Fotografía 8. Escala semi piloto de hidrólisis enzimática en cascarilla de arroz