

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

SECCIÓN DE POSGRADO Y SEGUNDA ESPECIALIZACIÓN



**“REDUCCIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO Y
FENOLES DEL HIDROLIZADO HEMICELULÓSICO DEL
ASERRÍN DE CAPIRONA CON PRETRATAMIENTO
MECÁNICO-FÍSICOQUÍMICO NO CATALIZADO”**

TESIS

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN GESTIÓN AMBIENTAL**

**ELABORADO POR
CÉSAR LAGOS LIBERATO**

**ASESOR
Dr. GUY CARVAJAL CARRANZA**

LIMA - PERÚ

2014

DEDICATORIA

A la memoria de mi querida y recordada madre Victoria Liberato Martínez, quien ya goza de la gracia eterna en el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue culminada, gracias a Dios, con el apoyo y amabilidad de muchas personas a quienes me gustaría expresar mi más profunda y sincera gratitud:

- A mi familia y amigos, por su refuerzo y aliento permanente.
- Al Dr. Guy Carvajal Carranza, asesor de la presente tesis, por sus valiosos consejos y recomendaciones en el campo de los bioprocesos.
- Al Dr. Abad Flores Paucarima y colaboradores, pertenecientes a la Universidad Nacional de San Marcos (UNMSM), por su amistad y asistencia constante de algunos insumos requeridos dentro del proyecto.
- Al Ing. Emerson Collado, actual director del Instituto de Investigación (II) de la Facultad de Ingeniería Química y Textil (FIQT) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), por el soporte continuo a los proyectos de investigación dentro de dicha facultad.
- Al equipo de investigadores y trabajadores (mención especial al Ing. Mario De La Cruz Azabache, a la Ing. Magali Vivas Cuellar y al Sr. Víctor Rojas) de los laboratorios N° 23 y 23-A de la FIQT de la UNI, por las facilidades brindadas dentro de las instalaciones de dichos laboratorios y compartir experiencias en torno al trabajo desarrollado.
- A todos los tesisistas y alumnos investigadores de la FIQT de la UNI, por su amistad, interés y valoración de la investigación realizada.
- A todos mis maestros catedráticos, compañeros, personal administrativo y de laboratorio de la maestría en ciencias con mención en gestión ambiental (MGA) de la Facultad de Ingeniería Ambiental (FIA) de la UNI, por todos los conocimientos impartidos y vivencias transmitidas en diferentes etapas de los estudios de posgrado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN EJECUTIVO	xi
EXECUTIVE ABSTRACT	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Antecedentes	1
2. Justificación	5
3. Planteamiento del problema	7
4. Importancia ambiental de reducir la demanda química de oxígeno	8
5. Importancia ambiental de reducir los fenoles	10
6. Límites máximos permisibles internacionales	14
7. Temas relacionados y alcance de la investigación	16
II. MARCO TEÓRICO	19
1. Aserrín de capirona en el Perú	20
2. Química del aserrín de capirona (biomasa lignocelulósica)	23
3. Proceso de obtención de etanol combustible a partir de biomasa lignocelulósica	29
4. Tecnologías de pretratamiento para la biomasa lignocelulósica	32
5. Pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado	34
6. Subproductos del pretratamiento (hidrolizado hemicelulósico)	38
7. Demanda química de oxígeno (DQO) y técnica de biodegradación	40
8. Fenoles y técnica de biodegradación	43

9.	Comentarios finales	44
III.	OBJETIVOS	45
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	47
1.	Materiales y equipos automatizados	47
1.1.	Aserrín de capirona	47
1.2.	Hipoclorito de sodio	47
1.3.	Reactor multipropósito a nivel banco	49
1.4.	Complejo enzimático celulasa (Cellic [®] CTec2 y Cellic [®] HTec2)	51
1.5.	Levadura alcoholera (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	56
2.	Procedimientos metodológicos	56
2.1.	Acondicionamiento del aserrín de capirona	56
2.2.	Caracterización del aserrín de capirona acondicionado	58
2.3.	Molienda del aserrín de capirona acondicionado	58
2.4.	Pretratamiento químico referencial (línea base)	59
2.5.	Pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional	60
2.6.	Pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto	61
2.7.	Acondicionamiento de los hidrolizados hemicelulósicos	64
2.8.	Ciclo de esterilización de los hidrolizados hemicelulósicos acondicionados	65
2.9.	Hidrólisis enzimática	65
2.10.	Ciclo de esterilización de los hidrolizados enzimáticos	66
2.11.	Fermentación alcohólica	67
2.12.	Destilación por lote	68
2.13.	Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)	69
2.14.	Determinación de la concentración de fenoles	72
2.15.	Determinación de la concentración de azúcares reductores (glucosa)	73

V.	RESULTADOS	74
1.	Pretratamiento químico referencial (línea base) y posterior hidrólisis enzimática - fermentación - destilación por lote	74
2.	Pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado y posterior hidrólisis enzimática - fermentación - destilación por lote	78
3.	Pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado y posterior hidrólisis enzimática - fermentación - destilación por lote	83
4.	Contenido de DQO y fenoles en las corrientes particulares de cada etapa del proceso	88
5.	Contenido de glucosa durante la generación de hidrolizados enzimáticos y mostos fermentados	90
6.	Contenido de etanol y grado alcohólico en mostos fermentados	92
VI.	DISCUSIÓN	94
1.	Análisis de DQO y concentración de fenoles en hidrolizados hemicelulósicos y enzimáticos (comparación de pretratamientos)	94
2.	Análisis del rendimiento de sacarificación en hidrolizados enzimáticos (comparación de pretratamientos)	96
3.	Análisis del rendimiento de fermentación en mostos fermentados (comparación de pretratamientos)	97
4.	Análisis del contenido de etanol y grado alcohólico en mostos fermentados (comparación de pretratamientos)	98
VII.	CONCLUSIONES	101
VIII.	RECOMENDACIONES	106
IX.	GLOSARIO DE TÉRMINOS	109
1.	Vocabulario técnico	109
2.	Locuciones técnicas	112

X.	LITERATURA CITADA	115
XI.	LITERATURA REVISADA	124
XII.	APÉNDICES	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la transformación enzimática de residuos lignocelulósicos	17
Figura 2. Distribución de la producción de madera rolliza por especie (2011)	22
Figura 3. Producción de madera rolliza y aserrada por departamento (2011)	23
Figura 4. Modelo de la estructura de la lignina de coníferas	27
Figura 5. Reacciones involucradas en el proceso de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica	31
Figura 6. Transporte a Lima del aserrín de capirona	47
Figura 7. Hipoclorito de sodio (NaOCl), grado comercial	48
Figura 8. Determinación de la concentración inicial de NaOCl (Crp _i)	49
Figura 9. Reactor multipropósito a nivel banco	51
Figura 10. Efecto de la temperatura en Cellic [®] CTec2	54
Figura 11. Efecto del pH en Cellic [®] CTec2	54
Figura 12. Efecto de la temperatura en Cellic [®] HTec2	55
Figura 13. Efecto del pH en Cellic [®] HTec2	55
Figura 14. Acondicionamiento del aserrín de capirona	57
Figura 15. Molienda del aserrín de capirona acondicionado	59
Figura 16. Equipo de explosión en vapor a nivel banco	63
Figura 17. Destilador por lote a nivel banco	69
Figura 18. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la hidrólisis enzimática RBHE01	77
Figura 19. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la fermentación alcohólica RBF01	78
Figura 20. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la hidrólisis enzimática RBHE02	82
Figura 21. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la fermentación alcohólica RBF02	83
Figura 22. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la hidrólisis enzimática RBHE03	87
Figura 23. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la fermentación alcohólica RBF03	88

Figura 24. Comportamiento y tendencia de la DQO en las corrientes particulares de cada etapa del proceso según el pretratamiento aplicado	89
Figura 25. Comportamiento y tendencia de la concentración de fenoles en las corrientes particulares de cada etapa del proceso según el pretratamiento aplicado	90
Figura 26. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la generación de hidrolizados enzimáticos según el pretratamiento aplicado	91
Figura 27. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la generación de mostos fermentados según el pretratamiento aplicado	92
Figura 28. Máximo volumen recuperado de etanol en mostos fermentados según el pretratamiento aplicado	93
Figura 29. Grado alcohólico en mostos fermentados según el pretratamiento aplicado	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos del fenol sobre la salud humana	12
Tabla 2. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de la destilería	15
Tabla 3. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de impregnación de productos de aserradero	16
Tabla 4. Componentes importantes de las hemicelulosas y extraíbles	28
Tabla 5. Tecnologías de pretratamiento para la biomasa lignocelulósica	33
Tabla 6. Métodos de destoxificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol	39
Tabla 7. Descripción de las enzimas Cellic [®] CTec2 y Cellic [®] HTec2 y sus características	52
Tabla 8. Caracterización del aserrín de capirona acondicionado	58
Tabla 9. Seguimiento de la DQO y la concentración de fenoles durante la producción de bioetanol hidratado considerando el pretratamiento químico referencial RBPE01	76
Tabla 10. Seguimiento de la DQO y la concentración de fenoles durante la producción de bioetanol hidratado considerando el pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02	81
Tabla 11. Seguimiento de la DQO y la concentración de fenoles durante la producción de bioetanol hidratado considerando el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03	86

RESUMEN EJECUTIVO

La presente tesis busca proponer una tecnología de pretratamiento innovadora (libre de químicos) que permita generar hidrolizados hemicelulósicos más limpios durante la etapa inicial de producción de bioetanol a partir de aserrín de capirona. Para ello, se cuantificaron y compararon los valores de la demanda química de oxígeno (DQO) y la concentración de fenoles al aplicar 3 diferentes pretratamientos: el químico referencial RBPE01, el mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 y el mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03. Adicionalmente, se evaluó la influencia y efecto de los pretratamientos aplicados sobre los rendimientos de sacarificación y fermentación.

El pretratamiento propuesto RBPE03 logró reducir los valores de la DQO y la concentración de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico en un 85 y 56 %, respectivamente, respecto al pretratamiento referencial RBPE01, resultando un rendimiento de sacarificación 6,6 veces menor y un consecuente rendimiento de fermentación tan sólo 1,5 veces menor debido a la disminución de los contaminantes que inhiben el crecimiento y la acción fermentativa de las levaduras. Asimismo, el pretratamiento propuesto RBPE03 logró también reducir los valores de la DQO y concentración de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico en un 90 y 72 %, respectivamente, respecto al pretratamiento opcional RBPE02, resultando un rendimiento de sacarificación 6,8 veces menor y un consecuente rendimiento de fermentación 3,4 veces menor, incremento resultante debido a la aplicación mecánica de la molienda de bolas en el pretratamiento opcional a pesar de la presencia de subproductos no deseados en su hidrolizado hemicelulósico correspondiente.

Por lo expuesto, se resalta el efecto positivo de la aplicación de la molienda de bolas (pretratamiento mecánico) y de la disminución de los subproductos no deseados en el hidrolizado hemicelulósico por la utilización de la explosión en vapor (pretratamiento fisicoquímico no catalizado) como técnicas de pretratamiento claves para mejorar los indicadores productivos y el desempeño ambiental favorable de todo el proceso.

EXECUTIVE ABSTRACT

This thesis seeks to propose an innovative pretreatment technology (free of chemicals) that allows generating cleaner hemicellulosic hydrolyzates during the initial stage of producing bioethanol from capirona sawdust. For this, they were quantified and compared the values of the chemical oxygen demand (DQO, for its acronym in Spanish) and phenols concentration by applying three different pretreatments: the referential chemical RBPE01, the optional catalyzed mechanical-physicochemical RBPE02 and the proposed not catalyzed mechanical-physicochemical RBPE03. Additionally, the influence and effect of pretreatments applied over the saccharification and fermentation yields was evaluated.

The proposed pretreatment RBPE03 achieved to reduce the values of DQO and phenols concentration in the hemicellulosic hydrolyzate by 85 and 56 %, respectively, relative to the referential pretreatment RBPE01, resulting in a saccharification yield 6,6 times lower and a consequent fermentation yield only 1,5 times lower due to the diminution of contaminants that inhibit the growth and fermentative action of yeast. Likewise, the proposed pretreatment RBPE03 also achieved to reduce the values of DQO and phenols concentration in the hemicellulosic hydrolyzate by 90 and 72 %, respectively, relative to the optional pretreatment RBPE02, resulting in a saccharification yield 6,8 times lower and a consequent fermentation yield 3,4 times lower, resultant increase due to the mechanical application of ball milling operation in the optional pretreatment despite the presence of undesired byproducts in its corresponding hemicellulosic hydrolyzate.

For the above reasons, the positive effect of applying the ball milling operation (mechanical pretreatment) and the diminution of undesired byproducts in the hemicellulosic hydrolyzate by the use of the steam explosion (not catalyzed physicochemical pretreatment) are highlighted as key pretreatment's techniques to improve the productive indicators and favorable environmental performance of the whole process.

RESUMEN

El aserrín de capirona es un residuo lignocelulósico, proveniente de la tala de árboles en las explotaciones forestales, el cual supone una de las principales reservas energéticas para la civilización actual, pero su aprovechamiento -hoy en día- se restringe a la elaboración de carbón vegetal como fuente de energía calorífica. Esta falta de interés aparente por esta materia prima se debe en su mayor parte a que los procesos de transformación convencional de la biomasa lignocelulósica por procedimientos químicos resultan muy costosos, obteniéndose además un alto nivel de efluentes contaminantes por las condiciones de los tratamientos.

Este trabajo evalúa la posibilidad de utilizar un pretratamiento mecánico-físicoquímico no catalizado (libre de químicos) del aserrín de capirona con la finalidad de reducir la generación de subproductos no deseados en el hidrolizado hemicelulósico, tales como derivados de furanos, ácidos débiles y compuestos fenólicos, previo a la obtención enzimática de azúcares reductores fermentables para la elaboración de uno de los biocombustibles líquidos de segunda generación más aceptados en la actualidad a nivel mundial, el bioetanol. El alcance e importancia de esta evaluación engloba no sólo la gestión ambiental del efluente final del proceso, sino también involucra el propio rendimiento de producción del bioetanol, ya que estos contaminantes inhiben el crecimiento y la acción fermentativa de las levaduras.

Las pruebas experimentales constaron de dos etapas. La primera de ellas tuvo como objetivo principal la definición y estandarización del proceso general para la obtención de bioetanol hidratado a partir del aserrín de capirona, lo cual implica tener una visión global de las operaciones de pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación alcohólica y destilación. Una vez dominado el proceso, la segunda etapa se focalizó en el pretratamiento mecánico-físicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 de la materia prima lignocelulósica, el cual redujo los valores de la demanda química de oxígeno (DQO) y la concentración de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico más que las técnicas de pretratamiento convencional aplicadas (pretratamiento químico referencial RBPE01 y

pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02), sin embargo, éstos no lograron ser inferiores a los estándares nacionales de calidad ambiental para agua respectivos, según el Decreto Supremo (D. S.) N° 002-2008-MINAM que señala un valor de $10 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ para el caso de la DQO correspondiente a la categoría 1, subcategoría A1, y un valor de $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ para el caso de la concentración de fenoles correspondiente a la categoría 3. Para dicho pretratamiento se utilizó una molienda de bolas (MB) seguida de una explosión en vapor (EVP), lográndose de esta manera la degradación de la hemicelulosa y transformación de la lignina (contenidas en la biomasa) por las altas temperaturas, así como la accesibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática. El lote de aserrín de capirona acondicionado pasó por el molino de bolas y permaneció en éste por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, el material lignocelulósico pulverizado fue descompuesto con vapor saturado a $152 \text{ }^\circ\text{C}$ (5 bar) por 2 minutos.

Durante la evaluación y selección del pretratamiento menos contaminante, cada material pretratado se sometió a hidrólisis enzimática (previo ciclo de esterilización) utilizando para ello un preparado comercial mixto, compuesto por la mezcla sinérgica de las enzimas Cellic[®] CTec2 y Cellic[®] HTec2, ambas proporcionadas por la empresa Novozymes Latin America L. T. D. A. y caracterizadas por tener un alto nivel de endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas, obteniéndose un contenido de azúcares reductores fermentables que se determinaron mediante el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con glucosa como estándar. Posteriormente, cada hidrolizado enzimático se sometió a una fermentación, utilizando para ello un caldo rico en base a una cepa de levadura alcoholera de alto rendimiento de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Finalmente, con el fin de determinar el contenido de etanol y grado alcohólico en cada mosto fermentado, se realizó una destilación por lote y se calcularon sus valores experimentales.

El pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 logró reducir los valores de la demanda química de oxígeno (DQO) y la concentración

de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico en un 85 y 56 %, respectivamente, respecto al pretratamiento químico referencial RBPE01, resultando un rendimiento de sacarificación (5,1 % de obtención de azúcares) 6,6 veces menor y un consecuente rendimiento de fermentación (7,1 % de transformación de azúcares) tan sólo 1,5 veces menor debido a la disminución de los contaminantes que inhiben el crecimiento y la acción fermentativa de las levaduras. En este contexto, el grado alcohólico del mosto fermentado obtenido como consecuencia de la aplicación del pretratamiento propuesto (0,9 %) resultó ser únicamente 1,1 veces menor que el resultante de la aplicación del pretratamiento referencial (1,1 %).

Asimismo, el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 logró también reducir los valores de la DQO y concentración de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico en un 90 y 72 %, respectivamente, respecto al pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02, resultando un rendimiento de sacarificación 6,8 veces menor y un consecuente rendimiento de fermentación 3,4 veces menor, lo cual significa una mayor diferencia de rendimiento de fermentación en el mosto fermentado que la calculada para el caso del pretratamiento químico referencial RBPE01, incremento resultante debido a la aplicación mecánica de la molienda de bolas en el pretratamiento opcional (mejora de la solubilidad y eficiencia fermentativa) a pesar de la presencia de subproductos no deseados en su hidrolizado hemicelulósico correspondiente. En ese contexto, el grado alcohólico en el mosto fermentado obtenido como consecuencia de la aplicación del pretratamiento propuesto (0,9 %) resultó ser 1,6 veces menor que el resultante de la aplicación del pretratamiento opcional (1,5 %).

Por lo expuesto, se resalta el efecto positivo de la aplicación de la molienda de bolas (pretratamiento mecánico) y de la disminución de los subproductos no deseados en el hidrolizado hemicelulósico por la utilización de la explosión en vapor (pretratamiento fisicoquímico no catalizado) como técnicas de pretratamiento claves para mejorar los indicadores productivos y el desempeño ambiental favorable de todo el proceso.

Cabe resaltar que el análisis y evaluación de los subproductos no deseados en el hidrolizado hemicelulósico, se realizó a través del seguimiento de la demanda química de oxígeno (DQO) y la concentración de fenoles en esta corriente, los cuales se determinaron mediante el empleo de los métodos estándares americanos SMEWW-APHA-AWWA-WEF-5220-D-2012 y SMEWW-APHA-AWWA-WEF-5530-C-2012, respectivamente.

ABSTRACT

Capirona sawdust is a lignocellulosic residue from tree cutting in forestry, which assumes one of the principal energy reserves for the current civilization, but its use -nowadays- is restricted to the elaboration of charcoal as a source of heat energy. This apparent lack of interest in this raw material is due largely to conventional transformation processes of lignocellulosic biomass by chemical procedures which result expensive, besides obtaining a high level of contaminated effluents for those treatment conditions.

This study assesses the possibility of using a not catalyzed mechanical-physicochemical pretreatment (free of chemicals) for the capirona sawdust in order to reduce the generation of undesirable byproducts in the hemicellulosic hydrolyzate, such as derivatives of furan, weak acids and phenolic compounds prior to the enzymatic production of fermentable reducing sugars for the elaboration of one of the second-generation liquid biofuels most currently accepted worldwide, the bioethanol. The scope and importance of this evaluation includes both the environmental management of the final effluent of the process, but also involves the performance of bioethanol production itself, since these contaminants inhibit the growth and fermentative action of yeast.

Experimental tests consisted of two stages. The first one had, as a main objective, the definition and standardization of the general process for obtaining hydrated bioethanol from capirona sawdust, implying a global view of the operations of pretreatment, enzymatic hydrolysis, alcoholic fermentation and distillation. After dominating the process, the second stage was focused on the proposed not catalyzed mechanical-physicochemical pretreatment RBPE03 of the lignocellulosic feedstock, which reduced the values of the chemical oxygen demand (DQO, for its acronym in Spanish) and phenols concentration in the hemicellulosic hydrolyzate more than conventional pretreatment techniques applied (referential chemical pretreatment RBPE01 and optional catalyzed mechanical-physicochemical pretreatment RBPE02), however, these two parameters failed to be below the respective national environmental quality standards for water, according to the Supreme Decree (D. S., for its acronym in

Spanish) N° 002-2008-MINAM which indicates a value of 10 mg O₂ L⁻¹ for the case of the DQO corresponding to category 1, subcategory A1, and a value of 0,001 mg L⁻¹ for the case of the phenols concentration corresponding to category 3. For such pretreatment, a ball milling operation (MB, for its acronym in Spanish) was utilized followed by a steam explosion (EVP, for its acronym in Spanish), achieving in this way the degradation of hemicellulose and transformation of lignin (both contained in the biomass) by the high temperatures reached, as well as the accessibility of cellulose to enzymatic hydrolysis. The batch of capirona sawdust conditioned went through the ball mill and remained in it for 5 minutes at room temperature. Subsequently, the lignocellulosic material pulverized was decomposed with saturated steam at 152 °C (5 bar) for 2 minutes.

During the evaluation and selection of the less contaminating pretreatment, each pretreated material was subjected to enzymatic hydrolysis (with previous sterilization cycle) using a mixed commercial preparation for this purpose, comprised of the synergistic blend of enzymes Cellic[®] CTec2 and Cellic[®] HTec2, both provided by the enterprise Novozymes Latin America L. T. D. A. and characterized by having a high level of endoglucanases, cellobiohydrolases and β-glucosidases, which made possible to obtain a content of fermentable reducing sugars that were determined by the method of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) with glucose as standard. Later, each enzymatic hydrolyzate was subjected to fermentation using a rich broth based on a strain of high performance alcoholic yeast from *Saccharomyces cerevisiae* species, provided by the Laboratory of Environmental Microbiology and Biotechnology from Faculty of Biological Sciences (FCB, for its acronym in Spanish) of the Major National University of San Marcos (UNMSM, for its acronym in Spanish). Finally, in order to determine the content of ethanol and alcoholic strength in each fermented must, batch distillation was conducted and their experimental values were calculated.

The proposed not catalyzed mechanical-physicochemical pretreatment RBPE03 achieved to reduce the values of the chemical oxygen demand (DQO, for its acronym in Spanish) and phenols concentration in the hemicellulosic hydrolyzate by 85 and 56 %, respectively, relative to the referential chemical pretreatment RBPE01, resulting in a saccharification yield (5,1 % of obtained sugars) 6,6 times

lower and a consequent fermentation yield (7,1 % of converted sugars) only 1,5 times lower due to the diminution of contaminants that inhibit the growth and fermentative action of yeast. In this context, the alcoholic strength in the fermented must obtained as a result of the implementation of the proposed pretreatment (0,9 %) proved to be just 1,1 times lower than that resulting from the application of the referential pretreatment (1,1 %).

Likewise, the proposed not catalyzed mechanical-physicochemical pretreatment RBPE03 also achieved to reduce the values of DQO and phenols concentration in the hemicellulosic hydrolyzate by 90 and 72 %, respectively, relative to the optional catalyzed mechanical-physicochemical pretreatment RBPE02, resulting in a saccharification yield 6,8 times lower and a consequent fermentation yield 3,4 times lower, which means a greater difference of fermentation yield in the fermented must with respect to that calculated for the case of the referential chemical pretreatment RBPE01, resultant increase due to the mechanical application of ball milling operation in the optional pretreatment (improved solubility and fermentative efficiency) despite the presence of undesired byproducts in its corresponding hemicellulosic hydrolyzate. In this context, the alcoholic strength in the fermented must obtained as a result of the implementation of the proposed pretreatment (0,9 %) proved to be 1,6 times lower than that resulting from the application of the optional pretreatment (1,5 %).

For the above reasons, the positive effect of applying the ball milling operation (mechanical pretreatment) and the diminution of undesired byproducts in the hemicellulosic hydrolyzate by the use of the steam explosion (not catalyzed physicochemical pretreatment) are highlighted as key pretreatment's techniques to improve the productive indicators and favorable environmental performance of the whole process.

It should be noted that the analysis and evaluation of undesired byproducts in the hemicellulosic hydrolyzate was realized by monitoring the chemical oxygen demand (DQO, for its acronym in Spanish) and phenols concentration in this stream, which were determined by using the american standards methods

SMEWW-APHA-AWWA-WEF-5220-D-2012 and SMEWW-APHA-AWWA-WEF-5530-C-2012, respectively.

I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

El mundo asiste a un déficit de materias primas derivado de una cultura de consumo asentada en la explotación de los recursos naturales. El camino hacia un desarrollo sostenible ha de basarse en la búsqueda y utilización de nuevas fuentes de recursos, entre las que de manera relevante destaca la biomasa y, en especial, los materiales lignocelulósicos.

Los residuos y subproductos de la tala de árboles en las explotaciones forestales y de las actividades propiamente agrícolas representan una fuente poco aprovechada de materia prima orgánica lignocelulósica, ya que este material se nos ofrece como una fuente renovable, permanentemente disponible y de carácter poco contaminante, contrariamente a lo que sucede con los recursos minerales y fósiles.

Hasta hace relativamente poco tiempo la utilización de residuos celulósicos se limitaba a la producción de fibras y carbón vegetal. En Europa, sólo se producía levadura y alcohol a partir de hidrolizados de madera, evidenciándose una falta de coordinación entre las industrias maderera y química. Mientras los combustibles fósiles, el gas y la hulla tuvieron precios bajos, hubo muy poco interés por la investigación y desarrollo de los subproductos que pudiesen dar los residuos celulósicos. Una vez que el petróleo, el gas y la hulla aumentaron su precio, comenzó la comunidad científica a ocuparse de esta biomasa disponible.

La biomasa es la única vía de disponer de una fuente abundante de materias primas en cantidad apreciable. Actualmente, el aprovechamiento industrial de la biomasa está centrado en procesos cuyo objetivo es la obtención de energía y productos utilizables en la

industria química, y en la obtención de fibras celulósicas en el sector de la pasta celulósica y papel, pero cada vez más y ante el declive de las fuentes de combustibles fósiles, la biomasa está reconocida como la mayor fuente de energía renovable del mundo.

Adicionalmente, el uso de biomasa lignocelulósica proveniente de cultivos agrícolas o forestales para obtener energía y otros productos químicos, proporciona ventajas medioambientales añadidas y evita la problemática, tan en boga actualmente, sobre el uso de cereales, azúcares y almidones alimentarios para la obtención de biocombustibles que entra en conflicto con la disposición de alimentos (primera generación). Dentro de este contexto, hoy en día se están desarrollando procesos que permitan producir biocombustibles a partir de residuos y subproductos de las actividades forestales o agrícolas, lo cual se investiga y estudia bajo el nombre de biocombustibles de segunda generación.

Es posible notar un gran avance en las investigaciones biotecnológicas dentro de este campo⁽¹⁾. Particularmente, se ha venido realizando un progreso significativo en las tecnologías para la conversión de biomasa celulósica a través de mejores pretratamientos⁽²⁾, enzimas y organismos fermentativos⁽³⁾, dando como consecuencia una mejoría en la economía de los procesos de conversión biológica. El interés en estas investigaciones se debe a variadas razones: (a) los propios avances significativos logrados en algunas áreas claves llevados a cabo por diversas agencias alrededor del mundo; (b) la gran preocupación sobre el cambio climático global y la necesidad de generar combustibles neutros en contenido de carbono, haciendo necesaria la obtención a gran escala y bajo costo de combustibles orgánicos líquidos; (c) el incremento dramático en los precios del petróleo, lo cual ha motivado la competencia de combustibles alternativos y (d) la adaptación de políticas gubernamentales que animan la comercialización de biocombustibles debido a la subida en los precios del petróleo.

Uno de los biocombustibles de segunda generación de gran importancia es el bioetanol. Una opción de proceso que resulta muy interesante y se emplea típicamente para su síntesis, consiste en una Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF)⁽⁴⁾. Cabe resaltar que el rendimiento de obtención en esta etapa del proceso está directamente ligado con el pretratamiento al que se somete la materia prima.

El pretratamiento permite que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten de menos del 20 % de los rendimientos teóricos a valores mayores al 90 %⁽⁵⁾. Los métodos de pretratamiento de los residuos lignocelulósicos pueden ser divididos en mecánicos, físicos y químicos, y una combinación de los dos últimos se usa comúnmente (físicoquímicos catalizados). Asimismo, el pretratamiento biológico también está siendo investigado⁽²⁾. Sin embargo, ninguno de los métodos de pretratamiento propuestos se puede aplicar en forma genérica a las diferentes materias primas⁽⁶⁾. Esto justifica la realización de análisis detallados de estas tecnologías en cada caso en particular.

Existen estudios que han combinado pretratamientos físicos para mejorar la eficiencia de la hidrólisis enzimática, por ejemplo, del eucalipto⁽⁷⁾. Específicamente, en el pretratamiento químico o en el físicoquímico catalizado, se forman subproductos ambientalmente nocivos, tales como furaldehídos, ácidos débiles y derivados fenólicos, los cuales también tienen impactos negativos en la salud humana. Los dos furaldehídos más comunes, el HMF (5-hidroximetil-2-furaldehído) y el furfural (2-furaldehído), son generados en condiciones severas a partir de las hexosas y pentosas, respectivamente; los ácidos débiles de los residuos lignocelulósicos, tales como el ácido acético, fórmico y levulínico son principalmente formados por la desacetilación de la hemicelulosa o la ruptura del HMF y los compuestos fenólicos se forman generalmente durante la ruptura de la lignina y se pueden encontrar en numerosas variantes,

dependiendo del tipo de lignina que esté contenida en la materia prima⁽⁴⁾.

Tecnológicamente, cabe resaltar que muchos de estos subproductos generados por el empleo de pretratamientos químicos o fisicoquímicos catalizados, inhiben también el crecimiento y la acción fermentativa de las levaduras. En este sentido, se han desarrollado trabajos que implican la identificación de los genes requeridos para la tolerancia a algunos de los inhibidores de hidrolizados lignocelulósicos más efectivos, tales como la Vanillina⁽⁸⁾. Por otro lado, en muchas industrias a nivel mundial, dependiendo del tipo de pretratamiento e hidrólisis utilizados convencionalmente, es necesario llevar a cabo la destoxificación de las corrientes que van a ser sometidas a fermentación, lo cual implica un mayor gasto de energía en el proceso por los métodos que más se emplean para tales propósitos (evaporación, extracción, intercambio iónico, etc.), cuando lo que realmente interesa y se debe buscar es la producción de energía (bioetanol) al menor costo energético.

Dentro de los pretratamientos fisicoquímicos no catalizados (libre de químicos), existe el denominado hidrotérmico, mediante el cual se somete al lavado del material lignocelulósico con agua (agua comprimida caliente) en contracorriente, a altas temperaturas y presiones intermedias por un lapso de tiempo determinado. Este proceso se enfrenta con el posible carácter de los materiales lignocelulósicos frente a la degradación de su estructura química. Particularmente, una publicación reciente demuestra la efectividad del pretratamiento hidrotérmico de la paja de trigo, explicado principalmente por un incremento de la digestibilidad al aumentar la accesibilidad de la celulosa a través de la relocalización de la lignina y un retiro parcial de la hemicelulosa, más que por la alteración o degradación de las fibras de la pared celular⁽⁹⁾.

Finalmente, cabe mencionar que los diferentes estudios revisados no especifican la concentración de los subproductos ambientalmente nocivos generados en los hidrolizados hemicelulósicos por el empleo de pretratamientos químicos o fisicoquímicos catalizados, pero sí mencionan y resaltan las características negativas tanto para los equipos, como para el mismo proceso y el medio ambiente; por ejemplo, el uso de químicos requiere de reactores resistentes a la corrosión, y las corrientes deben ser tratadas para reducir sus impactos negativos en procesos subsiguientes (fermentación) y en el ambiente.

2. Justificación

Focalizando la realidad nacional, en el Perú existe una gran actividad agrícola y forestal, donde la producción forestal va contribuyendo potencialmente cada vez más al Producto Bruto Interno (PBI) Nacional. Consecuentemente, estas actividades generan una alta cantidad de residuos y subproductos, los cuales deben ser tratados y dispuestos de manera segura para minimizar sus impactos en el ambiente.

En la tecnología para la producción de bioetanol de segunda generación se requiere la utilización de los residuos y subproductos forestales o agrícolas como materia prima lignocelulósica.

Aguas arriba del proceso, durante el pretratamiento químico o fisicoquímico catalizado de la materia prima lignocelulósica (convencionalmente utilizado) que permite la posterior obtención enzimática de azúcares reductores fermentables, se forman compuestos ambientalmente nocivos en el hidrolizado hemicelulósico, tales como los furaldehídos, ácidos débiles y derivados fenólicos.

Los subproductos ambientalmente nocivos que componen los hidrolizados hemicelulósicos generados a partir de residuos

lignocelulósicos no sólo inhibirán el crecimiento y la acción fermentativa de las levaduras, sino que serán parte de los efluentes industriales aguas abajo del proceso de producción de bioetanol, los cuales no deberán exceder los límites máximos permisibles de furaldehídos (HMF y furfural), ácidos débiles (ácido acético, fórmico y levulínico) y derivados fenólicos (numerosas variantes, dependiendo del tipo de lignina que esté contenida en la materia prima) en los puntos de descarga a un cuerpo receptor natural de agua.

La industria de producción de bioetanol de segunda generación en el Perú es aún un terreno virgen por explorar en materia tecnológica y ambiental, razón por la cual no existen límites máximos permisibles normados para estos subproductos contaminantes. Debido a ello, se cuenta como referencia normativa legal a algunos de los parámetros establecidos en los estándares de calidad nacional para agua según el D. S. N° 002-2008-MINAM, tanto para uso poblacional y recreacional (categoría 1) como para riego de vegetales y bebidas de animales (categoría 3), fundamentalmente.

El principal parámetro regulatorio que permite evaluar la contaminación de furaldehídos y ácidos débiles es la demanda química de oxígeno (en adelante DQO, en $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), ya que ellos son susceptibles de ser oxidados por combustión en presencia de oxígeno; asimismo, se toma como referencia base a la concentración regulatoria de fenoles para el caso de la evaluación total de los contaminantes derivados fenólicos. Los valores de la DQO y concentración de fenoles más exigentes para el caso de la categoría 1 son de $10 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ y $0,003 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, perteneciente a las aguas superficiales que pueden ser potabilizadas con desinfección destinadas a la producción de agua potable (subcategoría A1). Por otro lado, los valores de la DQO y concentración de fenoles para el caso de la categoría 3 son de $40 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ y $0,001 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, perteneciente a las aguas destinadas al riego de vegetales y bebidas de animales.

Por lo expuesto, el presente trabajo propone el empleo de un pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado (libre de químicos) de la materia prima lignocelulósica que permitirá reducir la concentración de dichos subproductos ambientalmente nocivos generados en el hidrolizado hemicelulósico y que formarán parte de los efluentes industriales de la planta a un valor de DQO inferior a $10 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ y de concentración de fenoles menor a $0,001 \text{ mg L}^{-1}$. Como ninguno de estos métodos se puede aplicar en forma genérica a las diferentes materias primas, se realizará un análisis detallado de las tecnologías existentes para el caso particular del aserrín de capirona.

Dado que en la bibliografía consultada no se especifica cuantitativamente la concentración de los subproductos ambientalmente nocivos generados en los hidrolizados hemicelulósicos por el empleo de pretratamientos químicos o fisicoquímicos catalizados y, menos aún, para el caso particular del aserrín de capirona, se realizará un pretratamiento químico de esta materia prima, tomando los valores de DQO ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) y concentración de fenoles (mg L^{-1}) obtenidos en estos hidrolizados hemicelulósicos como línea base referencial para poder comparar y establecer, adicionalmente, el porcentaje de reducción de la contaminación lograda con el pretratamiento propuesto en este proyecto.

3. Planteamiento del problema

De acuerdo a los antecedentes y justificación mencionados, se puede sintetizar la formulación del problema con las siguientes preguntas:

- ¿La aplicación del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto reducirá la demanda química de oxígeno (DQO) y concentración de fenoles generados en el hidrolizado hemicelulósico del aserrín de capirona?

- A nivel de cuantificación, ¿la posible reducción de dichos parámetros ambientales logrará ser inferior a los estándares nacionales de calidad ambiental para agua respectivos, según el Decreto Supremo (D. S.) N° 002-2008-MINAM?

4. Importancia ambiental de reducir la demanda química de oxígeno

El efluente no tratado es perjudicial para el ambiente y las personas. Los efectos de la salud pueden representar un cuadro clínico de una enfermedad, asociada a los agentes contaminantes presentes en dicho efluente. Las principales sustancias que causan los efectos de la salud y del ambiente están relacionadas con los parámetros físicos y químicos del agua.

Los parámetros físicos definen las características del agua que responden a los sentidos de la vista, del tacto, del gusto o del olor. En este parámetro se encuentran sólidos suspendidos, turbiedad, color, gusto, olor y caída de la temperatura⁽¹⁰⁾.

Los parámetros químicos son los que están relacionados con la capacidad solvente del agua y entre ellos se encuentran la materia orgánica desintegrable o no desintegrable, la materia inorgánica y los gases disueltos.

Los constituyentes químicos de los efluentes son con frecuencia clasificados en inorgánicos y orgánicos, componentes ambos sujetos a la oxidación. Al ser la DQO un parámetro que nos permite determinar indirectamente la carga química de un efluente, resulta imprescindible conocer su valor para poder reducir sus constituyentes a niveles que no afecten la salud y el ambiente. En la mayoría de los casos el componente orgánico (DQO orgánica) predomina y es el de mayor interés.

Miles de diferentes compuestos orgánicos naturales o sintéticos han sido usados por la industria química para hacer pesticidas, plásticos, fármacos, pigmentos y otros productos de uso diario. Muchos de estos compuestos químicos utilizados son altamente tóxicos. La exposición a concentraciones bajas puede causar defectos cerebrales, desórdenes genéticos y cáncer. Algunos compuestos pueden persistir en el medio ambiente debido a que resisten la degradación y ser tóxicos para los organismos cuando los ingieren.

Los desechos de la contaminación orgánica pueden provenir de aguas residuales domésticas, desechos de granjas incluyendo las de cultivo intenso de ganado y pollos, la piscicultura, entre otros. También se incluyen los desechos de rastros, cervecerías, destilerías, fabricación de vehículos⁽¹¹⁾. Las dos fuentes más importantes de compuestos químicos orgánicos tóxicos en el agua están constituidas por aquéllos que son eliminados incorrectamente de la industria y por el uso de pesticidas⁽¹²⁾.

Existen más de 180 compuestos orgánicos individuales los cuales pueden ser agrupados en diferentes clases para ser analizados. Por ejemplo, los compuestos orgánicos volátiles (COV), en cuyos compuestos representativos está el benceno, clorobenceno, tolueno, tetracloroetano, entre otros.

Las sustancias químicas orgánicas sintéticas que son productos de las industrias químicas, del petróleo y agrícolas, incluyen:

- Pesticidas y productos agroquímicos: por ejemplo, los hidrocarburos clorados, los organofosfatos y ciertos herbicidas.
- Agentes tensoactivos: se emplean para lavado, como emulsionante, humectante, espumante, etc., debido a que disminuyen la tensión superficial del agua cuando están mezclados con ella. Los surfactantes son perjudiciales al medio acuático debido a que pueden causar espumas y

reducir la difusión del oxígeno atmosférico hacia el agua. También pueden provenir de la descarga de detergentes domésticos, lavanderías industriales y otras operaciones de limpieza.

- Hidrocarburos halogenados: son los productos finales de la reacción de los halógenos con los hidrocarburos⁽¹³⁾.

Los constituyentes químicos inorgánicos de interés comprenden nutrientes, constituyentes no metálicos, metales y gases. Entre los contaminantes inorgánicos están amoníaco libre, nitritos, nitratos, sulfatos, fósforo inorgánico, elementos individuales (calcio, cloruro, hierro, cromo y zinc), óxidos de azufre, compuestos metálicos, entre otros. El nitrógeno y el fósforo son de gran importancia, ya que han sido identificados como nutrientes causantes principales del crecimiento indeseable de plantas acuáticas.

5. Importancia ambiental de reducir los fenoles

El agua dulce de los ríos y de los lagos representa sólo un 0,01 % del total del agua del planeta. El 75 % de las aguas dulces de la Tierra se encuentran retenidas en el hielo glaciar, que contiene suficiente agua como para conseguir llenar la cuenca del Mediterráneo diez veces. El resto se encuentra en los lagos de agua dulce, los arroyos, los acuíferos y en los organismos vivos. Sin embargo, sólo una pequeña fracción del agua dulce está a disposición de las necesidades del ser humano y en su mayor parte se usa en la agricultura⁽¹⁴⁾.

Desgraciadamente, gran parte del agua sufre una elevada contaminación, lo que se traduce en la muerte de millones de personas por enfermedades relacionadas con el agua. A pesar de las presiones ambientales en los países industrializados, los productos químicos tóxicos siguen llegando a los ríos y los arroyos, deliberada o accidentalmente. En todo el mundo se vierten directamente a los diversos cuerpos receptores aguas residuales sin depurar o sólo

parcialmente depuradas, debido a que las plantas tratadoras de efluentes están sobrecargadas en exceso.

Un grupo de sustancias químicas de alta toxicidad y que son ampliamente utilizados en la manufactura de productos tan diversos como pesticidas, ropa, fármacos, plásticos, surfactantes y explosivos, son los fenoles⁽¹⁵⁾. La presencia de esta sustancia en aguas de desecho llevan el riesgo de ocasionar intoxicaciones corrosivas por la ingestión de compuestos tales como el ácido carbólico, el creosol, el guayacol y el naftol; este tipo de intoxicación se caracteriza por quemaduras en las membranas mucosas, debilidad, palidez, edema pulmonar, convulsiones e insuficiencia respiratoria, circulatoria y renal y, en raras ocasiones, estenosis esofágica como complicación de las lesiones tisulares^(15,16).

La exposición al fenol puede darse por algunas vías, las mismas que representan afectaciones a la salud humana. El fenol es un compuesto corrosivo y causa quemaduras en el sitio de contacto^(17,18).

El fenol inhalado es absorbido rápida y significativamente por los pulmones, llevando a una toxicidad sistemática. A causa de su baja volatilidad, el peligro de inhalación a temperatura ambiente es limitado. Puede provocar síntomas no inmediatos como son: quemazón, tos, vértigo, dolor de cabeza, náuseas, jadeo, vómitos y pérdida del conocimiento^(19,17).

Si el fenol es ingerido accidentalmente, causa dolor abdominal, convulsiones, diarrea, dolor de garganta y coloración oscura de la orina. Se han descrito muertes en adultos después de ingerir 1 g⁽¹⁷⁾. Una ingestión continua de fenol en concentraciones entre 10 y 240 mg L⁻¹, por prolongados períodos de tiempo, causa irritación bucal, diarrea, orina oscura; su concentración letal en sangre es de 0,047 a 0,130 mg mL⁻¹⁽²⁰⁾.

El contacto con la piel es la principal vía de exposición tóxica al fenol. El vapor y líquido son absorbidos fácil y rápidamente a través de la piel causando quemaduras cutáneas graves, efecto anestésico local, convulsiones, shock, colapso, coma o muerte. Incluso soluciones diluidas (< 2 %) pueden causar quemaduras graves si el contacto es prolongado. Si el fenol toma contacto con los ojos, puede existir pérdida de visión y quemaduras graves⁽¹⁷⁾.

En todos los sitios de contacto oral, estomacal, dérmico u ocular, el fenol puede causar serias quemaduras con una destrucción irreversible del tejido⁽²¹⁾. En la tabla 1 se resumen los efectos que puede tener el fenol frente a los sistemas del ser humano.

Tabla 1. Efectos del fenol sobre la salud humana

Sistema del ser humano	Efecto del fenol
Sistema nervioso central (SNC)	Este sistema se deprime, causa pérdida de la conciencia, ataques, depresión respiratoria y coma.
Sistema respiratorio	Exposiciones leves pueden causar irritación del tracto respiratorio superior. Exposiciones más serias pueden causar inflamación de la garganta y tráquea, ulceración de la tráquea y edema pulmonar.
Sistema cardiovascular	Causa inicialmente elevación en la presión sanguínea, después progresivamente baja la presión y causa un shock. Arritmia cardíaca y bradicardia.
Sistema gastrointestinal	Por cualquier vía de exposición, el fenol causa comúnmente náusea, vómito y diarrea. Si se ingiere, causa daño a la boca, garganta, esófago y estómago. La ingestión puede conducir a la muerte por un fallo respiratorio.
Sistema renal	Fallo renal agudo y desequilibrio ácido - base.
Sistema ocular	Inflamación del ojo y del párpado. Puede nublarse la superficie del ojo.
Sistema dérmico	Si es aplicado directamente, puede dejar manchas color marrón. Al mantener fenol sobre la superficie de la piel, penetra rápidamente y causa la muerte celular y gangrena. Si es expuesto en más de 100 cm ² de piel, existe un riesgo de muerte inmediata.

Fuente: Consejería de Sanidad de la Región de Murcia (CSRM), "Riesgo químico: accidentes graves del fenol" - Dirección General de Salud Pública del Servicio de Sanidad Ambiental (2007); Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), "Toxicological profile for phenol" - Department of Health and Human Services of the Public Health Service (2008)

El fenol no ha sido clasificado por efectos carcinogénicos; sin embargo, puede ser un promotor de tumores. De la misma manera, no se han reportado efectos en el desarrollo o reproducción a causa del fenol en humanos⁽²²⁾. En estudios con animales, el fenol ha sido reportado como embriotóxico y fetotóxico, pero no teratogénico⁽¹⁸⁾.

Naturalmente, el fenol se forma por la descomposición de materia orgánica. Su incremento ambiental se ve reflejado por la quema de bosques⁽²³⁾. Sin embargo, la mayor cantidad de fenol es liberado al ambiente a causa de la actividad industrial y la comercialización de productos que lo contienen^(23,24,18).

La combustión que se produce por automóviles también libera fenol a la atmósfera. El fenol pasa al agua y suelos desde el aire por deposición húmeda. Una vez en el suelo, se puede mover por lixiviación con ayuda de la lluvia, llegando a las aguas subterráneas. La evaporación de fenol en agua es lenta⁽²³⁾.

El fenol no muestra bioacumulación significativa⁽²⁵⁾. Al ser descargado en cuerpos de agua representa riesgo frente a organismos acuáticos. La Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) determinó un nivel de preocupación de fenol de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ ⁽²³⁾. En concentraciones de 5 a 25 mg L^{-1} puede ser tóxico o letal para los peces⁽²⁶⁾.

En concentraciones bajas, el fenol no permanece en el aire, ni en el suelo o el agua superficial, esto se debe a que reacciona fotoquímicamente en el aire y en el agua superficial y puede ser biodegradado aeróbica y anaeróbicamente, tanto en el agua como en el suelo⁽²³⁾.

6. Límites máximos permisibles internacionales

La industria de producción de bioetanol de segunda generación en el Perú es aún un terreno virgen por explorar en materia tecnológica y ambiental, razón por la cual no existen límites máximos permisibles normados para estos subproductos contaminantes. Sin embargo, en otros países como México, existe información detallada respecto a dichos límites para empresas de diferentes rubros, algunas de las cuales pueden servir como referencia en el análisis del presente proyecto por tener semejanzas en la procedencia del efluente.

En la tabla 2 se presentan los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de la destilería, según la norma oficial mexicana NOM-064-ECOL-1994 del Instituto Nacional de Ecología (Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, SEMARNAT).

Tabla 2. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de la destilería

Parámetros	Límites máximos permisibles	
	Promedio diario	Instantáneo
pH (unidades de pH)	6 - 9	6 - 9
Demanda bioquímica de oxígeno, DBO (mg L ⁻¹)	200	240
Demanda química de oxígeno, DQO (mg L ⁻¹)	260	360
Fenoles, (mg L ⁻¹)	---	---
Grasas y aceites, (mg L ⁻¹)	10	20
Sólidos sedimentables, (mL L ⁻¹)	1,0	2,0
Sólidos suspendidos totales, (mg L ⁻¹)	200	240
Fósforo total, (mg L ⁻¹)	5	6
Nitrógeno total, (mg L ⁻¹)	10	12

Fuente: Adaptado de: "Norma oficial mexicana NOM-064-ECOL-1994" - Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAT) del Instituto Nacional de Ecología

Asimismo, en la tabla 3 se presentan los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de impregnación de productos de aserradero, según la norma oficial mexicana NOM-CCA-019-ECOL-1993 del Instituto Nacional de Ecología (Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, SEMARNAT).

Tabla 3. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de impregnación de productos de aserradero

Parámetros	Límites máximos permisibles	
	Promedio diario	Instantáneo
pH (unidades de pH)	6 - 9	6 - 9
Demanda bioquímica de oxígeno, DBO (mg L ⁻¹)	---	---
Demanda química de oxígeno, DQO (mg L ⁻¹)	180	240
Fenoles, (mg L ⁻¹)	0,1	0,2
Grasas y aceites, (mg L ⁻¹)	40	50
Sólidos sedimentables, (mL L ⁻¹)	1,0	1,2
Sólidos suspendidos totales, (mg L ⁻¹)	120	150
Fósforo total, (mg L ⁻¹)	---	---
Nitrógeno total, (mg L ⁻¹)	---	---

Fuente: Adaptado de: "Norma oficial mexicana NOM-CCA-019-ECOL-1993" - Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAT) del Instituto Nacional de Ecología

7. Temas relacionados y alcance de la investigación

Con el fin de desarrollar un proceso para la producción de bioetanol a partir del aserrín de capirona, es necesario realizar una serie de estudios desde la escala de laboratorio hasta la escala industrial. Los temas relacionados que deben abordarse son:

- Si la composición del material lignocelulósico, es decir, del aserrín de capirona, es suficientemente alta en azúcares reductores fermentables.
- La accesibilidad de los azúcares reductores para la fermentación.
- La maximización de la conversión de celulosa en azúcares reductores y de estos azúcares fermentables en etanol, por

medio de la optimización de los parámetros de la hidrólisis enzimática y la fermentación.

Un reto importante en la producción de bioetanol a partir de aserrín de capirona se encuentra en la disminución de los subproductos ambientalmente nocivos generados en los efluentes de la planta, cuyo foco principal de contaminación se encuentra después de la etapa de pretratamiento del material lignocelulósico (en el hidrolizado hemicelulósico), específicamente causada por aquellos pretratamientos que involucran el uso de químicos. En el proceso propuesto se utiliza un método de pretratamiento innovador de baja contaminación que considera un pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado, tratando primero el aserrín de capirona con una molienda controlada a través de un molino de bolas, seguido por una explosión en vapor saturado, utilizando altas temperaturas que permitan incrementar la accesibilidad de la celulosa para la hidrólisis enzimática. En la figura 1 se muestra un esquema general de la transformación enzimática de residuos lignocelulósicos.

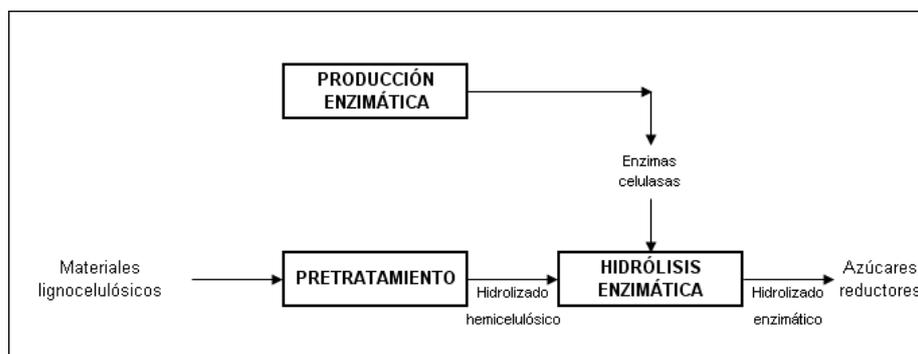


Figura 1. Esquema general de la transformación enzimática de residuos lignocelulósicos. El proceso de hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos involucra un pretratamiento adecuado y una producción paralela de enzimas específicas. Los hidrolizados hemicelulósicos y enzimáticos son las corrientes o flujos resultantes del pretratamiento e hidrólisis enzimática, respectivamente.

Fuente: Elaboración propia

En ese sentido, el alcance de esta investigación se limita a los estudios a una escala banco, focalizando la disminución de los subproductos ambientalmente nocivos generados en los hidrolizados hemicelulósicos por medio de la evaluación y selección de un pretratamiento menos contaminante. Este análisis implica no sólo la gestión ambiental del efluente final del proceso, sino también involucra el propio rendimiento de producción del bioetanol, ya que estos mismos contaminantes inhiben el crecimiento y la acción fermentativa de las levaduras.

En resumen, la industria de producción de bioetanol a partir de aserrín de capirona genera gran cantidad de efluentes líquidos que van a parar a las fuentes naturales de aguas o a los sitios destinados para su disposición final. Dichos efluentes comprometen gravemente los ecosistemas por su alta concentración de materia orgánica medida en DQO y concentración de fenoles. Entonces, se presenta la necesidad que los encargados de los procesos industriales también tengan la responsabilidad de la implementación y desarrollo de los sistemas de tratamiento de sus efluentes líquidos generados, con el objetivo de minimizar el impacto causante por ellos.

II. MARCO TEÓRICO

El mundo encara el agotamiento progresivo de sus recursos energéticos basados mayoritariamente en combustibles no renovables. Al mismo tiempo, el consumo de energía aumenta a ritmos cada vez más crecientes. De otro lado, el consumo global de combustibles genera enormes cantidades de gases contaminantes que son liberados a la atmósfera, causando cambios en el clima del planeta, por lo que se ha convertido en una de las problemáticas que más preocupan a los gobiernos, las ONG's, las comunidades y la opinión pública en general⁽²⁷⁾.

La única forma de encarar esta problemática es mediante recursos energéticos renovables. Para ello, la biotecnología ofrece múltiples alternativas tecnológicas. Una solución renovable es el uso de energía solar en forma de biomasa, la cual está representada en los materiales lignocelulósicos y los cultivos de plantas ricas en energía. Las emisiones de CO₂ generadas por la producción y uso de biocombustibles son compensadas por la absorción de CO₂ durante el crecimiento de las plantas y de otros materiales vegetales, a partir de los cuales dichos combustibles se producen.

Los biocombustibles son los combustibles de origen biológico obtenidos de manera renovable a partir de restos orgánicos y constituyen la primera fuente de energía que conoció la humanidad. Entre las fuentes de los biocombustibles, están la biomasa proveniente de cultivos como caña de azúcar, maíz, sorgo, yuca y otros, usada para producir bioetanol, y los aceites provenientes de palma africana, soya, higuera, *Jatropha curcas* o piñón (manso, blanco, de leche o botija), colza y otras plantas, utilizados para producir biodiesel (biocombustibles de primera generación), así como -ahora último- se está empleando la biomasa lignocelulósica procedente de residuos y subproductos forestales o agrícolas para la producción de bioetanol (biocombustibles de segunda generación).

El biocombustible más importante es el bioetanol o etanol combustible, el cual puede ser utilizado como combustible (bioetanol hidratado) o como oxigenante de la gasolina (bioetanol anhidro). El uso del bioetanol anhidro como oxigenante representa varias ventajas: mayor contenido de O₂ (menor cantidad de aditivo requerido), mayor octanaje, no es tóxico, reduce más las emisiones de CO y no contamina las fuentes de agua⁽²⁸⁾. De otro lado, el bioetanol puede ser utilizado como materia prima en la producción de ETBE⁽²⁹⁾.

El bioetanol producido por fermentación de la biomasa lignocelulósica (bioetanol de segunda generación) a partir de residuos y subproductos agrícolas o forestales, muestra mayores ventajas potenciales en comparación con el bioetanol derivado del azúcar o almidón (bioetanol de primera generación) desde un punto de vista energético y ambiental.

Brasil es el principal productor mundial de bioetanol de primera generación. A través del programa Proalcool⁽³⁰⁾, en Brasil se ha utilizado el bioetanol hidratado como combustible y el bioetanol anhidro como oxigenante (24 % en volumen). En los EE. UU. hay también un programa de adición de bioetanol anhidro a la gasolina que se vio impulsado especialmente por el Clean Air Act Amendments de 1990. En efecto, los gobiernos de varios países ya han puesto en marcha programas de oxigenación de la gasolina con bioetanol anhidro, como es el caso del Perú.

1. Aserrín de capirona en el Perú

La actividad maderera peruana puede contribuir a la mejora de las condiciones económicas y sociales en el país, más aún si se promueve la industrialización del sector, que permitiría ofrecer productos con mayor valor agregado a mejores precios en el mercado.

Un crecimiento del sector forestal está relacionado con la generación de más aserrín, subproducto de la actividad maderera, lo cual

garantizará un abastecimiento seguro de dicho material lignocelulósico para el proceso de producción de bioetanol hidratado y permitirá la selección de la mejor alternativa ambiental dentro de los diferentes pretratamientos en estudio.

Hoy en día, el contexto normativo es favorable y promisorio con la nueva Ley Forestal y de Fauna Silvestre (Ley N° 29763), publicada el 22 de julio del 2011 en el diario El Peruano, la cual asume el reto de colocar al Perú en el mapa forestal mundial como país cuyos bosques y zonas forestales son gestionados bajo un enfoque de sostenibilidad ecológica, económica y social, que genera riqueza y promueve servicios ambientales seguros, coadyuvando así a la mitigación del cambio climático en nuestro planeta, y a la construcción de una nueva institucionalidad.

Entre las especies que tienen valor comercial a escala industrial, así como una mayor demanda, destacan la caoba y el cedro, cuya extracción y comercialización se ha visto limitada los últimos años por su ingreso al apéndice del acuerdo que regula el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), lo que ha llevado al empresario al aprovechamiento de otras especies -en su mayoría duras- para compensar el vacío en rentabilidad generado: cumala, tornillo, catahua, copaiba, ishpingo y moena como maderas de múltiples usos, y la lupuna en la industria triplayera.

La heterogeneidad de los bosques tropicales obliga, pues, al desarrollo de una estrategia integral que permita elevar el valor agregado generado por la industria maderera y llevar el actual aprovechamiento forestal de 2 a 4 metros cúbicos por hectárea a su aprovechamiento potencial de 15 a 18 metros cúbicos por hectárea.

Como parte de esta estrategia se está intensificando el uso del bosque al incorporar 70 especies maderables menos conocidas al

mercado de maderas con excelentes resultados, destacando entre aquellas las siguientes: shihuahuaco, capirona, pumaqui, congona (machinga), aguano masha, andiroba y cachimbo. Algunas de estas maderas son incluso excelentes sustitutos de maderas finas como la caoba y el cedro (ver figura 2).

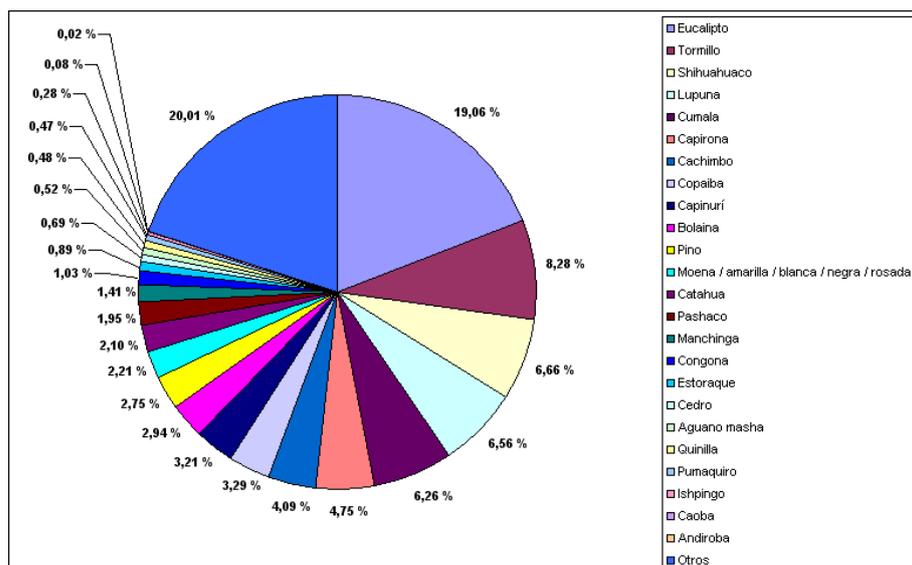


Figura 2. Distribución de la producción de madera rolliza por especie (2011). La producción de madera rolliza de la especie capirona representó el 4,75 % del total en el año 2011, siendo intensificado su aprovechamiento en lugar de especies amenazadas de mayor valor comercial como la caoba (0,08 %) y el cedro (0,69 %); asimismo, dicha producción está relacionada con la generación de aserrín de la misma especie y, por consiguiente, se garantiza la utilización sostenible de este residuo en una planta de bioetanol de segunda generación con producción más limpia.

Fuente: Elaboración propia basada en información del anuario estadístico Perú Forestal en Números 2011 - Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre (DGFFS) del Ministerio de Agricultura (MINAG)

Según la información nacional reportada al año 2011 (ver figura 3), Ucayali es el primer departamento productor de madera rolliza y aserrada, representando el 24,5 % y 25,9 % de la producción nacional, respectivamente, lo cual es producto de la intensificación del uso de su bosque al incorporar una gran cantidad de nuevas especies maderables dentro de las cuales destacan las especies

shihuahuaco y capirona. En este contexto, los productos elaborados en el año 2011 se hicieron con madera de especies que antes no eran utilizadas, reemplazando a las especies de mayor valor comercial (caoba, cedro, catahua, copaiba, ishpingo, moena, etc.) que han sido disminuidas en los bosques de la región y del país, principalmente a causa del aprovechamiento intensivo y desordenado.

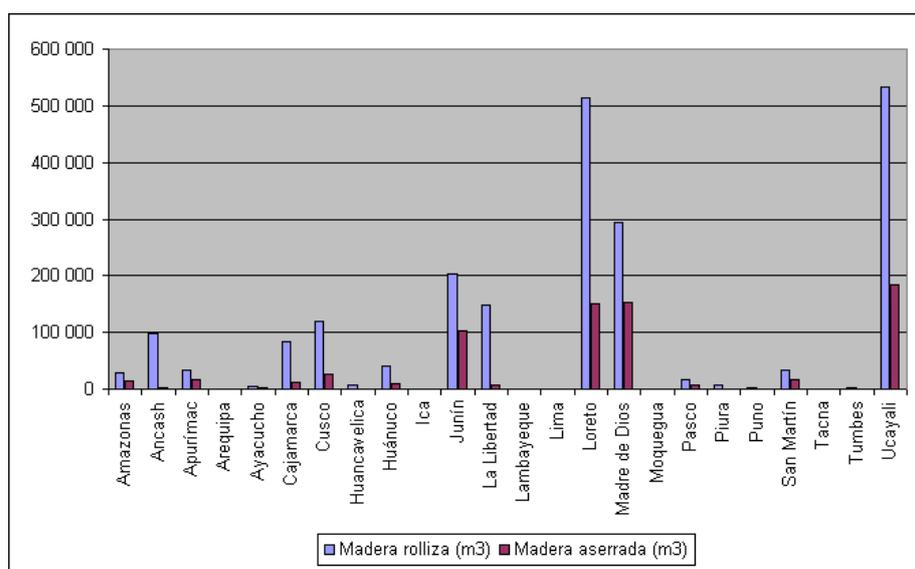


Figura 3. Producción de madera rolliza y aserrada por departamento (2011). Debido a la incorporación de la especie capirona y otras nuevas especies, el departamento de Ucayali lideró la producción de madera rolliza y aserrada en el año 2011, lo cual nos da una pauta para la localización de una planta de bioetanol de segunda generación en el Perú.

Fuente: Perú Forestal en Números 2011 - Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre (DGFFS) del Ministerio de Agricultura (MINAG)

2. Química del aserrín de capirona

La biomasa lignocelulósica está constituida por materias primas que no son fuentes alimenticias (residuos y subproductos forestales o agrícolas), por lo cual la producción de bioetanol a partir de éstas no compete con las hectáreas destinadas a los cultivos alimenticios, problemática tan mencionada en estos días para el caso de los biocombustibles de primera generación.

El aserrín de capirona es biomasa leñosa y está considerado dentro del grupo de los materiales que constituyen la biomasa lignocelulósica. Por esa razón, es un producto natural complejo y no uniforme con respecto a sus propiedades anatómicas y químicas.

En general, la madera consiste en dos tercios de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), aproximadamente, con diferencias significativas en la proporción de celulosa a hemicelulosa. Adicionalmente, dependiendo de su edad y tipo de tejido, la madera podría contener otros polisacáridos como la pectina y el xiloglucano. El contenido del tercer componente principal de la madera, la lignina, varía ampliamente (18 - 33 %) entre especies, con una mayor cantidad de la misma para maderas blandas que para maderas duras. Los extraíbles representan el menor componente dentro de la madera, constituido por diversos compuestos individuales que van desde terpenoides y esteroides, grasas y ceras, hasta compuestos fenólicos que incluyen a los estilbenos, taninos y flavonoides. Los constituyentes inorgánicos de la madera están casi totalmente contenidos en la ceniza, aquél residuo que queda después de quemar la materia orgánica. A pesar que la ceniza es un componente menor de la madera (0,1 - 1,0 % en madera de zonas templadas), estos compuestos inorgánicos juegan un rol esencial en el crecimiento de los árboles⁽³¹⁾.

Los polisacáridos o carbohidratos incluyen a la celulosa y hemicelulosa, y constituyen los principales componentes en la biomasa leñosa. Debido a que estos carbohidratos están formados a partir de monosacáridos, son revertibles a estos últimos por hidrólisis ácida o enzimática. La celulosa es un polímero lineal de unidades de β -D-glucopiranosas, todas éstas unidas mediante enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4). Las cadenas de celulosa lineal tienen una fuerte tendencia a formar enlaces intra- e inter-moleculares de hidrógeno, lo cual provoca la adición de cadenas paralelas en microfibrillas elementales. En contraste a la celulosa, las hemicelulosas son polisacáridos

heterogéneos de bajo grado de polimerización (número de unidades de glucopiranosas en la cadena de hemicelulosa), típicamente de 50 a 300 unidades, y de características, esencialmente, amorfas. Las hemicelulosas se encuentran frecuentemente ramificadas, razón por la cual son relativamente solubles en agua. Las hemicelulosas son fácilmente hidrolizadas en presencia de ácidos a sus constituyentes monoméricos, los cuales consisten principalmente de D-glucosa, D-manosa, D-xilosa, L-arabinosa y D-galactosa, y pequeñas cantidades de otros polisacáridos y derivados, incluyendo el ácido 4-O-metil-D-glucurónico, L-ramnosa y el ácido D-galacturónico. Dentro de las principales cadenas de hemicelulosas de las maderas blandas están los galactoglucomananos (alrededor de 20 %) y arabinoglucuronoxilanos (5 - 10 %), mientras que en las maderas duras encontramos a los glucuronoxilanos o simplemente xilanos (15 - 30 %) y glucomananos (2 - 5 %)⁽³¹⁾. El conocer los detalles de la composición química de las hemicelulosas en las maderas blandas ((galacto)glucomananos y arabinoglucuronoxilanos) y duras (glucomananos y glucuronoxilanos) es importante porque los monosacáridos y grupos funcionales constituidos, así como su forma de enlazarse a la cadena principal y ramificaciones, influyen significativamente en los resultados de la autohidrólisis, incluyendo la proporción, composición y rendimiento de los constituyentes de la madera en disolución.

La lignina refuerza los tallos y el tejido vascular, permitiendo el crecimiento adecuado y el transporte del agua y minerales a través del xilema, bajo presión negativa, sin que colapse el tejido. Adicionalmente al soporte mecánico, la lignina contribuye en las funciones protectoras de las plantas mediante, por ejemplo, el incremento de la resistencia a la biodegradación y los estreses ambientales, tales como los cambios en la humedad y en el balance del agua. Derivada primordialmente de los alcoholes p-hidroxicinamílicos (p-HCAs: alcohol p-cumarílico (4-hidroxicinamílico), coniferílico (4-hidroxi, 3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-

dimetoxicinámico); cuando los p-HCAs se incorporan dentro de la lignina, se convierten en unidades de p-hidroxifenil (H), guayacil (G) y siringil (S), respectivamente), la lignina resulta de las reacciones de polimerización por acoplamiento de radicales en la pared celular después de que los polisacáridos se han establecido. La lignina provee una matriz en la cual los polisacáridos están integrados y posiblemente reticulados, denominada Complejo Lignina-Carbohidrato (LCC, por sus siglas en inglés), existiendo al menos 3 tipos de uniones covalentes en este complejo: uniones éter, éster y fenil glucosídico. El resultado es un material compuesto naturalmente que imparte resistencia y rigidez a la pared celular, fuerza tal que permite a las plantas crecer organizadamente⁽³¹⁾. Una representación de la estructura de la molécula de lignina en madera de coníferas se muestra en la figura 4⁽³²⁾. La propia estructura y características de la lignina que permiten las ventajas ya mencionadas en las plantas, representan a su vez un problema para la elaboración de algunos productos a partir de ésta. Por ejemplo, la lignina es el componente que se busca eliminar en la fabricación de pasta química y constituye un mayor obstáculo en el procesamiento de la biomasa leñosa a combustibles y productos químicos.

Los extraíbles representan una menor fracción de los componentes totales de la madera y están compuestos por un amplio arreglo de compuestos individuales, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. En relación a los temas de sostenibilidad y utilización más eficiente de los recursos naturales como la madera, los extraíbles están recibiendo una mayor atención para su recuperación potencial y venta de productos, en bajos volúmenes pero con alto valor. El contenido de extraíbles es generalmente inferior al 10 %, pero puede variar desde trazas hasta el 40 % en peso del total de la madera seca. Varias partes de un mismo árbol pueden tener diferentes contenido y composición de extraíbles. Los extraíbles están normalmente presentes en ciertos sitios morfológicos dentro de la estructura de la madera. Los ácidos de las resinas, por ejemplo, están situados en los

canales de resinas, mientras que las grasas se encuentran en las células del parénquima radial o radiomedular y los extraíbles fenólicos están presentes en el duramen y la corteza⁽³¹⁾. Los extraíbles son necesarios para mantener y llevar a cabo un conjunto diversificado de funciones en los árboles. Las grasas son conocidas como una fuente de energía para las células de la madera, mientras que los terpenoides, los ácidos de las resinas y los compuestos fenólicos protegen al árbol contra los ataques de microorganismos. Los extraíbles no son sólo útiles e importantes para la comprensión de la taxonomía y bioquímica de los árboles, sino también al considerar los aspectos tecnológicos del uso de la madera en la industria. Por ejemplo, los polifenoles -valorados por su alta eficiencia antioxidante- han sido examinados, sugiriéndose procesos diferentes para su aislamiento de la madera.

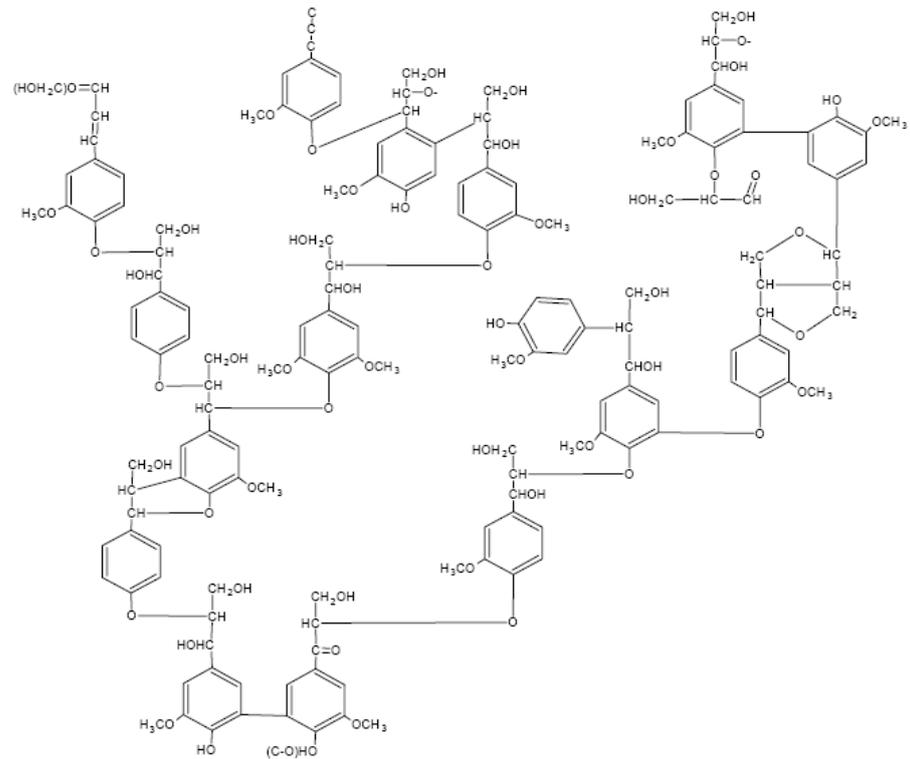


Figura 4. Modelo de la estructura de la lignina de coníferas. Complejo Lignina-Carbohidrato (LCC) de coníferas mostrando uniones covalentes de tipo éter y fenil glucosídico.

Fuente: Adler, E., "Lignin Chemistry Past, Present and Future" (1977)

La cantidad de materia inorgánica (ver tabla 4) es pequeña (generalmente menos de un 1 % del total de la madera), pero indispensable para el crecimiento del árbol. Los principales elementos de la materia mineral de la madera son el calcio, el potasio y el magnesio, seguidos, en menor cantidad, del manganeso, sodio, fósforo y cloro. Los llamados elementos traza, presentes en concentraciones inferiores a 50 ppm, son el aluminio, el hierro, el zinc y el cobre, entre otros.

Tabla 4. Componentes importantes de las hemicelulosas y extraíbles

Type	Distribution, wt %	
	Soft-woods	Hard-woods
Hemicellulose	25 ~ 30	25 ~ 35
Galactoglucomannan (1:1:3)	5 ~ 8	0
(Galacto)glucomannan (0.1:1:4)	10 ~ 15	0
Glucomannan (1:2-1:1)	0	2 ~ 5
Arabinoglucuronoxylan	7 ~ 10	Trace
Glucuronoxylan	Trace	15 ~ 30
Extractives	5 ~ 8	2 ~ 4
Aliphatic and alicyclic	terpenes, terpenoids, esters, fatty acids, alcohols, ...	
Phenolics	phenols, stilbenes, lignans, isoflavones, ...	
Carbohydrates	arabinose, galactose, glucose, xylose, starch, pectic material	
Others	cyclitols, tropolones, amino acids, protein, alkaloids, ...	
Ash	Ca, K, Mg, Mn, Na, P, Fe, Si, etc.	0.2 ~ 0.5 / 0.2 ~ 0.8

Fuente: Liu, S. J., "Woody biomass: Niche position as a source of sustainable renewable chemicals and energy and kinetics of hot-water extraction / hydrolysis" (2010)

Los constituyentes principales de la biomasa leñosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) no pueden ser simultáneamente aislados como polímeros y muchos procesos deben ser empleados para la degradación de al menos uno de estos polímeros. De los 3 componentes principales, las hemicelulosas son las más fáciles de

degradar, mientras que la celulosa presenta las mayores dificultades. En ese sentido, un método ideal sería separar primero las hemicelulosas de la biomasa leñosa y convertir la celulosa como último paso, dando lugar a un mayor desarreglo de la biomasa leñosa. La tabla 4⁽³³⁾ muestra un resumen de los componentes de hemicelulosa y extraíbles, los cuales proporcionan la oportunidad de construir una biorefinería y tener una cartera diversificada de productos a partir de esta biomasa lignocelulósica.

3. Proceso de obtención de etanol combustible a partir de biomasa lignocelulósica

En el mundo se llevan a cabo gran cantidad de estudios para desarrollar la producción a gran escala de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Los materiales que más se han investigado son madera y residuos forestales, papel reciclado y residuos de la industria papelera, bagazo de caña, desechos agrícolas (hojas, ramas, hierba, frutas, paja, etc.), así como residuos sólidos urbanos. Se ha estimado un valor de 6 para la relación salida / entrada de energía en el caso de la producción de etanol a partir de biomasa⁽³⁴⁾, es decir, la relación entre la energía liberada durante la combustión de bioetanol y la energía necesaria para su producción considerando todo el ciclo de vida del producto desde la extracción de las materias primas y los insumos requeridos, pasando por su transporte, hasta el proceso de transformación en el producto final. Lo anterior hace a esta materia prima muy atractiva, en especial en países que no cuentan con la facilidad de producir grandes cantidades de caña de azúcar. El valor de esta relación para el bioetanol producido a partir de almidón de maíz es de 1,1 - 1,2⁽³⁵⁾ y a partir de caña de azúcar es de 8⁽³⁴⁾.

El principal reto en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento e hidrólisis de la materia prima. Como ya se mencionó, el complejo lignocelulósico está compuesto

principalmente de una matriz de carbohidratos (celulosa y lignina) enlazada por cadenas de hemicelulosa. El pretratamiento tiene como objetivo desintegrar esta matriz de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático (hidrólisis enzimática). Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa se hidroliza durante el pretratamiento y la lignina se libera o puede incluso descomponerse. En una etapa posterior, la celulosa liberada es sometida a hidrólisis enzimática con celulasas exógenas, lo cual hace que se obtenga una solución de azúcares reductores fermentables que contiene principalmente glucosa, así como pentosas (xilosa) resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en etanol mediante microorganismos que pueden utilizar uno o varios de los azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado. Este complejo proceso puede ser representado por las reacciones detalladas en la figura 5.

Luego del pretratamiento, la celulosa liberada es degradada hasta glucosa (sacarificación), lo cual puede hacerse con ácidos o enzimas (celulasas). La mayoría de las celulasas comerciales son producidas a partir de *Trichoderma reesei*, del cual se obtiene básicamente una mezcla de celobiohidrolasas y endoglucanasas^{(36),(37)}. Las primeras hidrolizan los enlaces $\beta(1,4)$ de la cadena de celulosa a partir de los extremos no reductores o reductores liberando celobiosa o inclusive glucosa, mientras las endoglucanasas rompen estos mismos enlaces en forma aleatoria dentro de la cadena. Desafortunadamente, las celobiohidrolasas son inhibidas por la celobiosa, por lo que se agrega β -glucosidasa de otra fuente para complementar la acción de las celulasas de este hongo. La β -glucosidasa hidroliza la celobiosa obtenida en dos moléculas de glucosa.

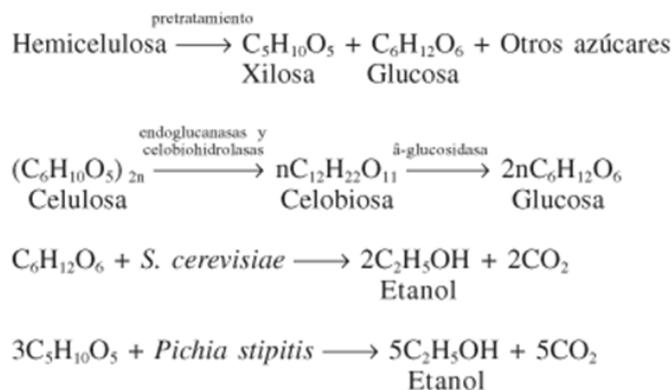


Figura 5. Reacciones involucradas en el proceso de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Durante el pretratamiento se libera xilosa y algo de glucosa, mientras que en la hidrólisis enzimática se obtiene principalmente glucosa, la cual será fermentada usando levaduras comerciales en una etapa posterior. Fuente: Lynd L. R., Weimer P. J., Van Zyl W. H., Pretorius I. S., "Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology" (2002); Zhang Y. H. P., Lynd L. R., "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulose systems" (2004)

Las etapas de hidrólisis y fermentación se pueden realizar en forma secuencial (hidrólisis y fermentación separadas, SHF por sus siglas en inglés) o llevando a cabo en una sola unidad la hidrólisis y la fermentación al mismo tiempo (sacarificación y fermentación simultáneas, SSF por sus siglas en inglés). El microorganismo más utilizado para este proceso es *Saccharomyces cerevisiae* que fermenta las hexosas presentes en el hidrolizado mas no las pentosas. La SSF muestra mayores rendimientos de bioetanol y menores consumos energéticos, pero las temperaturas de operación no son óptimas para la hidrólisis y se requiere de mayores dosis de enzimas.

Existe un estudio previo donde se ha realizado una evaluación de los rendimientos de etanol a partir de diferentes materiales

lignocelulósicos en procesos de SSF y de SHF por lotes a 37 °C con diferentes dosis de enzima y tiempos de proceso de 7 - 8 días⁽³⁸⁾. La tusa de maíz, los tallos y hojas de maíz, la paja de trigo y el pasto llorón, en su orden, alcanzaron altas tasas de hidrólisis y altos rendimientos de bioetanol durante la SSF; los diferentes tipos de madera pretratada estudiados mostraron conversiones similares de celulosa a bioetanol y rendimientos ligeramente inferiores a los desechos de maíz, los cuales presentaron los mayores valores (92 - 94 %).

4. Tecnologías de pretratamiento para la biomasa lignocelulósica

Para el pretratamiento se han propuesto y desarrollado diferentes métodos, los cuales se relacionan en la tabla 5⁽³⁹⁾. La síntesis de procesos puede aportar las herramientas necesarias para descartar las opciones con menos perspectivas en forma preliminar, teniendo en cuenta nuevos procedimientos, esquemas y alternativas que se planteen en la etapa de diseño.

Los métodos de pretratamiento se clasifican en físicos, físico-químicos, químicos y biológicos, siendo posible utilizar combinaciones sinérgicas entre éstos.

Tabla 5. Tecnologías de pretratamiento para la biomasa lignocelulósica

Métodos	Procedimiento/Agentes	Observaciones	Ejemplos de materiales pretratados	Referencia
Pretratamientos físicos				
Pulverizado mecánico	Reducción a astillas, trituración, molienda.	Molinos: vibratorio de bolas (tamaño final: 0,2-2mm), de cuchillas o martillo (tamaño final: 3-6mm).	Residuos de madera y forestales (paja, madera dura), desechos de maíz, bagazo de caña, timothy, alfalfa.	Sun y Cheng, 2002; Rivers y Emert, 1988; Cadoche y López, 1989; Papatheofanous <i>et al.</i> , 1998; Alvo y Belkacemi, 1997.
Pirólisis	T>300°C	Formación de productos volátiles y carbón. Residuos de la pirólisis pueden someterse a hidrólisis ácida suave (1N H ₂ SO ₄ , T=97°C, 2,5h) para producir 80-85% AR (>50% de glucosa). Puede realizarse al vacío: 400°C, p=1mm Hg, 20min (algodón de desecho).	Madera, algodón de desecho.	Sun y Cheng, 2002; Yu y Zhang, 2003.
Pretratamientos físico-químicos				
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160-260°C, p=0,69-4,85 MPa por varios segundos o minutos, luego descompresión hasta presión atmosférica.	Altas concentraciones de sólidos. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, destrucción de parte de la xilosa obtenida, formación de inhibidores, se requiere posterior lavado con agua. Al combinarse con H ₂ SO ₄ , SO ₂ , o CO ₂ mejora la eficiencia de la posterior hidrólisis enzimática, disminuyendo inhibidores. Reducción de tamaño con menor gasto energético comparado con pulverización. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.	Bagazo, madera blanda, paja de arroz, madera de aspen, madera de eucalipto.	Sun y Cheng, 2002; Kaar <i>et al.</i> , 1998; Moniruzzaman, 1996; De Bari <i>et al.</i> , 2002; Heitz <i>et al.</i> , 1987; Söderström <i>et al.</i> , 2003; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Agua líquida caliente (LHW)	Agua caliente presurizada, T=170-230°C, 1-46min.	Concentraciones de sólidos <20%. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, >50% oligómeros. Solubilización parcial de la lignina (20-50%). Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90%. Baja o nula formación de inhibidores.	Bagazo de caña.	Lynd, 1996; Laser <i>et al.</i> , 2002; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Explosión de fibra con amoníaco (AFEX)	Dosis 1-2kg de amoníaco/kg de biomasa seca, 90°C, 30min.	Se requiere recuperación de amoníaco, no produce inhibidores. Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90% (bagazo y hierba de Bermuda). Para biomasa con alto contenido de lignina no es muy eficiente (conversión de celulosa <50%). Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. Hidrólisis del 0-60% de la hemicelulosa en dependencia de la humedad, más del 90% oligómeros. Ocurre cierta solubilización de la lignina (~10-20%).	Materiales herbáceos (paja de trigo y cebada, cascari-lla de arroz, desechos de maíz, switchgrass), residuos sólidos urbanos, papel periódico, alfalfa, astillas de aspen y bagazo.	Sun y Cheng, 2002, Dale <i>et al.</i> , 1996, Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Explosión con CO ₂	Dosis de 4 kg CO ₂ /kg de fibra, p=5,62 MPa.	Conversión a glucosa durante la hidrólisis de celulosa >75% (alfalfa). No forma compuesto inhibitorios.	Alfalfa, mezcla de papel reciclado, bagazo de caña.	Sun y Cheng, 2002.
Pretratamientos químicos				
Ozonólisis	Ozono, reacción a temperatura y presión ambientales.	Degradación principalmente de lignina. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 57% (aserrín). No se forman inhibidores.	Paja de trigo, bagazo, heno verde, cacahuete, pino, paja de algodón y aserrín de álamo.	Sun y Cheng, 2002.
Hidrólisis con ácido diluido	H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ al 1-5%. Procesos de flujo continuo para baja carga de sólidos (5-10% peso sustrato/peso mezcla) a T=160-200°C; procesos por lotes a alta carga de sólidos (10-40%) a T=120-160°C. Presiones cercanas a 1 MPa.	Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, altas conversiones de xilano a xilosa. La alta temperatura es favorable para la hidrólisis de celulosa. Se requiere neutralizar el pH para la posterior hidrólisis enzimática. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.	Desechos de maíz, bagazo de caña, madera de álamo, switchgrass, paja de trigo, astillas de álamo.	Sun y Cheng, 2002; Schell <i>et al.</i> , 2003; Rodríguez-Chong <i>et al.</i> , 2004; Esteghlalian <i>et al.</i> , 1997; Wooley <i>et al.</i> , 1999; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Hidrólisis con ácido concentrado	H ₂ SO ₄ al 10-30%, 170-190°C, relación 1:1,6 sólido-líquido. Ácido peracético 21-60%, sistema tipo silo.	Se requiere la recuperación del ácido. Tiempos de residencia mayores que en la hidrólisis con ácido diluido.	Bagazo de caña, aserrín de madera dura.	Cuzens y Millar, 1997; Teixeira <i>et al.</i> , 1999.
Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h, 60°C	Remoción de lignina 24-55% para madera dura con contenido inicial de lignina del 20%, difícil remoción para maderas blandas con contenidos de lignina>26%. Hidrólisis de >50% de la hemicelulosa. Sustancial hinchamiento de la celulosa. Conversión durante la hidrol. de celulosa: 78,2% (paja de arroz), 67,1% (bagazo). Conversión durante la hidrol. de celulosa: proceso convencional, aprox. 54%; NaOH+H ₂ O ₂ , aprox. 65% (hojas de caña de azúcar).	Madera dura, pajas con bajo contenido de lignina (10-18%), desechos de maíz, bagazo de caña, hojas de caña de azúcar.	Sun y Cheng, 2002; Rivers y Emert, 1988; Hari Krishna <i>et al.</i> , 1998; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Deslignificación oxidativa	Peroxidasa y H ₂ O ₂ al 2%, 20°C, 8h.	Solubilización del 50% de la lignina y de casi la totalidad de la hemicelulosa. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 95% (aserrín).	Bagazo de caña.	Sun y Cheng, 2002.
Proceso organosolv	Solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol, entre otros) o su mezcla con 1% de H ₂ SO ₄ o HCl.	Ruptura de la lignina interior y de las uniones de hemicelulosa. Solubilización casi total de la lignina. Hidrólisis casi total de la hemicelulosa. Altos rendimientos de xilosa. Recuperación de solventes y su remoción del sistema para no inhibir los procesos biológicos subsiguientes.	Madera de álamo.	Sun y Cheng, 2002; Rezzoug y Capart, 1996; Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Pretratamiento biológico				
Pretratamiento con hongos	Hongos de la pudrición blanca, blanda y parda. Producción de celulosas por fermentación en sustrato sólido.	Los hongos producen celulasas, hemicelulasas y enzimas degradadoras de lignina: ligninasas, lignin-peroxidadas, polifenoloxidasas, lacasas y enzimas reductoras de quinonas. Proceso muy lento: <i>Pleurotus ostreatus</i> convierte el 35% de la paja de trigo en azúcares reductores en cinco semanas. Hongos de la pudrición parda degradan celulosa Hongos de la pudrición blanca y blanda degradan celulosa y lignina.	Paja de trigo, desechos de maíz.	Sun y Cheng, 2002; Tengerdy y Szakacs, 2003.

Fuente: Sun Y., Cheng J., "Hydrolysis of lignoc. mat. for ethanol prod.: a review" (2002)

5. Pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado

El pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado involucra justamente la combinación de estos dos métodos de pretratamiento. Para ello, la biomasa lignocelulósica acondicionada es sometida primero a una molienda controlada a través de un molino de bolas, seguido por una explosión en vapor saturado, utilizando altas temperaturas que permitan incrementar la accesibilidad de la celulosa para la hidrólisis enzimática.

Molienda de bolas (MB)

La molienda de bolas se refiere a la utilización de la fricción, colisión, choque, cizallamiento u otras acciones mecánicas para modificar las estructuras cristalinas y las propiedades de los gránulos sólidos. Durante el pretratamiento en un molino de bolas, la reactividad química mejora porque parte de la energía mecánica se convierte en energía interna de la sustancia.

Su principal objetivo está dirigido a reducir el tamaño de la biomasa lignocelulósica para facilitar los tratamientos siguientes. La reducción del tamaño de la biomasa lignocelulósica por debajo de las mallas Tyler N° 20 muestran el mejor rendimiento mecánico⁽⁴⁰⁾. Asimismo, la molienda de bolas aumenta la digestibilidad de la celulosa y la hemicelulosa en la biomasa lignocelulósica.

El uso de la molienda de bolas ha demostrado ser exitosa como estrategia de pretratamiento de bajo costo⁽⁷⁾. Se ha encontrado que los materiales pulverizados con una mayor área de superficie facilitan los posteriores pretratamientos fisicoquímicos y bioquímicos del rastrojo de maíz, paja de cebada, bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, residuos de madera y residuos sólidos municipales, ya que dan lugar a la mejora de la digestibilidad de la celulosa y la hemicelulosa a glucano y xilano, respectivamente, y logran una mayor digestibilidad

enzimática con cargas menores de enzimas. La molienda de bolas también permite una despolimerización sustancial de la lignina a través de la escisión de enlaces aril éter no condensados⁽⁷⁾. Asimismo, la solubilidad y eficiencia de la fermentación de la biomasa lignocelulósica natural mejora ampliamente por medio de un pretratamiento mecánico-fisicoquímico, garantizando la utilización con valor agregado de estos residuos⁽⁴¹⁾.

Actualmente, la molienda de bolas se utiliza en una variedad de aplicaciones que incluyen compuestos de nanomatrices y materiales de aleaciones dispersas, así como dentro de las refinerías metálicas, en el tratamiento de minerales, la disposición de residuos y la síntesis de materiales orgánicos.

Explosión en vapor (EVP)

La explosión en vapor fue desarrollada en el año 1925 por W. H. Mason para la producción de madera prensada⁽⁴²⁾. Desde entonces, el uso del proceso se ha ampliado para incluir aplicaciones como la producción de piensos para rumiantes y la fabricación de pasta de madera.

El uso de la explosión en vapor para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica fue introducido en la década de 1980. La corporación lotech realizó algunos trabajos pioneros en la investigación de los efectos de la explosión en vapor sobre la madera de álamo⁽⁴³⁾ y presentó un amplio informe al Departamento de Energía (DOE, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos describiendo los efectos de varios tiempos de residencia y presiones en los rendimientos de xilosa y glucosa. lotech encontró que a una determinada presión, los rendimientos de xilosa y glucosa presentaban ambos un pico a diferentes tiempos de residencia (el pico de xilosa se presentaba usualmente antes que el pico de glucosa). Del mismo modo, se encontró que los máximos rendimientos de xilosa y glucosa ocurrían

a diferentes presiones. La recomendación final que figura en el informe fue optimizar el rendimiento de holocelulosa (xilosa + glucosa) a una presión comprendida entre 500 y 550 psig por un tiempo de residencia de 40 segundos.

Al informe de Iotech le siguieron otros estudios aplicando la explosión en vapor para el pretratamiento de diversas materias primas de la biomasa lignocelulósica. Por ejemplo, se comparó la eficacia del pretratamiento de explosión en vapor con virutas mixtas de madera dura, cáscaras de arroz, tallos de maíz y bagazo de caña de azúcar⁽⁴⁴⁾. Una explosión en vapor entre 240 y 250 °C por un tiempo de residencia de 1 minuto, aumentó las tasas de hidrólisis enzimática de las virutas de madera dura, cáscara de arroz y bagazo de caña de azúcar a valores aproximados a las del papel de filtro. Las muestras explosionadas en vapor no mostraron un incremento en las tasas de hidrólisis ácida en comparación con las muestras sin explotar. En el estudio también se encontró que las tasas de hidrólisis de las muestras almacenadas durante 8 meses antes de la hidrólisis enzimática no presentaron ninguna diferencia con las muestras explosionadas en vapor poco antes de la hidrólisis enzimática.

Asimismo, en una investigación posterior se utilizaron materias primas como la *Onopordum nervosum* y *Cyanara cardunculus*⁽⁴⁵⁾, obteniéndose una eficiencia de sacarificación (glucosa liberada después de 48 horas de hidrólisis enzimática / máxima glucosa en el sustrato) de más del 90 % para *O. nervosum* explosionada en vapor a 230 °C por un tiempo de residencia entre 1 y 2 minutos, así como para *C. cardunculus* explosionada en vapor a 210 °C por un tiempo de residencia entre 2 y 4 minutos.

Resultados similares que apoyan los efectos contributivos del pretratamiento con explosión en vapor en la sacarificación enzimática se reportaron con madera de eucalipto⁽⁴⁶⁾, madera de pino⁽⁴⁷⁾ y paja de arroz⁽⁴⁸⁾.

Para algunos investigadores, la explosión en vapor es descrita como un proceso termomecanoquímico⁽⁴⁹⁾. El desglose de los componentes estructurales es ayudado por el calor en forma de vapor de agua (termo), las fuerzas de cizallamiento debido a la expansión de la humedad (mecano) y la hidrólisis de enlaces glucosídicos (químicos).

En el reactor, el vapor a alta presión penetra en las estructuras lignocelulósicas por difusión. El vapor se condensa bajo la alta presión, "humedeciendo" de ese modo el material. La humedad en la biomasa hidroliza los grupos acetilo de las fracciones de hemicelulosa, formando ácidos orgánicos tales como el ácido acético y urónico. Los ácidos, a su vez, catalizan la despolimerización de la hemicelulosa, liberando xilano y cantidades limitadas de glucano. Bajo condiciones extremas, las regiones amorfas de la celulosa podrían hidrolizarse a un cierto grado. Condiciones excesivas, es decir, altas temperaturas y presiones, sin embargo, pueden también promover la degradación de la xilosa a furfural y de la glucosa al HMF. El furfural inhibe el crecimiento microbiano, por lo tanto, no es deseable en los sustratos de alimentación para la fermentación alcohólica.

La biomasa "húmeda" es explosionada cuando se libera la presión dentro del reactor. Típicamente, el material es impulsado fuera del reactor a través de una pequeña boquilla por la fuerza inducida. Muchos fenómenos ocurren en este punto. En primer lugar, la humedad condensada dentro de la estructura se evapora instantáneamente debido a la disminución repentina de la presión. La expansión del vapor de agua ejerce una fuerza de cizallamiento sobre la estructura circundante. Si esta fuerza de corte es lo suficientemente alta, el vapor causará la ruptura mecánica de las estructuras lignocelulósicas.

La descripción del proceso pone en relieve la importancia de la optimización de los dos factores claves que gobiernan la explosión en

vapor: el tiempo de residencia (o tiempo de retención) y la temperatura. La cantidad de tiempo que la biomasa lignocelulósica permanece en el reactor ayuda a determinar el grado de hidrólisis de la hemicelulosa por los ácidos orgánicos formados durante su “humedecimiento”.

La hidrólisis de la hemicelulosa ayuda en gran medida a la etapa de fermentación alcohólica aguas abajo del proceso. Sin embargo, los tiempos de residencia largos también aumentarán la producción de subproductos de degradación, los cuales deben ser reducidos, especialmente, en la preparación de sustratos de alimentación para la fermentación alcohólica.

La temperatura regula la presión del vapor dentro del reactor. Las temperaturas más altas se traducen en presiones mayores, aumentando por tanto la diferencia entre la presión del reactor y la presión atmosférica. La diferencia de presión es, a su vez, proporcional a la fuerza de cizallamiento de la humedad (condensada dentro de la estructura) que se evapora instantáneamente.

6. Subproductos del pretratamiento (hidrolizado hemicelulósico)

Durante el pretratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica se forman, junto con los azúcares fermentables, gran cantidad de compuestos que pueden inhibir la fermentación subsiguiente. Las sustancias inhibitorias se originan como resultado de la hidrólisis de los diferentes componentes, de los ácidos orgánicos esterificados de la hemicelulosa y de los derivados fenólicos solubilizados de la lignina. Asimismo, los inhibidores se forman a partir de productos de degradación de los azúcares solubles y de la lignina^{(5),(50),(51)}. Por eso, y dependiendo del tipo de pretratamiento e hidrólisis utilizados, es necesario llevar a cabo la destoxificación de las corrientes que van a ser sometidas a fermentación. En la tabla 6^{(52),(53),(54)} se condensan las principales características de los métodos de destoxificación más

Tabla 6. Métodos de destoxificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol

Método	Procedimiento/Agentes	Fundamento	Ejemplos
<u>Métodos físicos</u>			
Evaporación	Evaporación, separación de fracciones volátiles y no volátiles y dilución de la fracción no volátil.	Los inhibidores volátiles son removidos del hidrolizado.	Hidroliz. de sauce: se debe reducir el contenido de ácido acético y compuestos fenólicos en la fracción no volátil; roto-evaporación; m.o. <i>S. cerevisiae</i> . Hidroliz. de aspen: aumento del rendimiento de alcohol de 0 a 93% del rendim. de la fermentación de referencia; m.o.: <i>Pichia stipitis</i> ; remoción de: ácido acético 54%, furfural 100%, vanillina 29%; roto-evaporación.
Extracción	Solventes orgánicos.	Los inhibidores se transfieren a la fase del solvente y son removidos con el extracto.	Hidroliz. de pinabete: dietil éter (solv.); rendimiento comparable con la fermentación de referencia; m.o. <i>S. cerevisiae</i> ; extracto etéreo contiene ácido acético, fórmico y levulínico, furfural, hidroximetil furfural (HMF); segunda extracción del extracto etéreo con solución de NaHCO ₃ neutralizó el efecto inhibitorio de las fases resultantes. Hidroliz. de aspen: acetato de etilo (solv.); aumento del rendimiento de alcohol de 0 a 93% del rendim. de la fermentación de referencia; m.o.: <i>Pichia stipitis</i> ; remoción: de ácido acético 56%, furfural 100%, vanillina 100%, ácido hidroxibenzoico 100%. Hidroliz. de pino: acetato de etilo (solv.); principales inhibidores en el extracto - compuestos fenólicos de bajo peso molecular; m.o. <i>S. cerevisiae</i> .
<u>Métodos químicos</u>			
Neutralización	Ca(OH) ₂ ó CaO, pH=6, luego filtración con membranas o adsorción.	Precipitación o remoción de compuestos tóxicos.	Hidroliz. ácido de algodón de desecho pretratado por pirólisis: rendimiento de etanol: <i>S. cerevisiae</i> 0,44 g/g, <i>Pichia</i> sp. 0,40 g/g; diferentes materiales adsorbentes (Yu y Zhang, 2003).
Destoxificación alcalina (alcalinización)	Ca(OH) ₂ , pH=9-10,5, luego reajuste de pH hasta 5,5-6 con H ₂ SO ₄ .	Precipitación de compuestos tóxicos, inestabilidad de algunos inhibidores a pH altos.	Hidroliz. ácido de pinabete: rendimiento comparable con la fermentación de referencia, reducción de furfural y HMF del 20%. Hidroliz. de bagazo de caña pretratado por explosión a vapor: remoción de ácido acético, furfural y parte de compuestos fenólicos (Martín <i>et al.</i> , 2002). Hidroliz. ácido de algodón de desecho pretratado por pirólisis: rendimiento de etanol: <i>S. cerevisiae</i> 0,40 g/g, <i>Pichia</i> sp. 0,37 g/g; diferentes materiales adsorbentes después de alcalinizar (Yu y Zhang, 2003).
Destoxificación alcalina combinada	KOH, pH=10, luego reajuste de pH hasta 6,5 con HCl y adición de 1% de sulfito de sodio.	Disminución de cetonas y aldehídos, remoción de compuestos volátiles cuando se calienta el hidrolizado (90°C).	Hidroliz. de bagazo de caña; m.o.: <i>Pichia stipitis</i> . Hidroliz. ácido de pinabete; m.o.: <i>S. cerevisiae</i> . Hidroliz. de sauce; m.o.: <i>Escherichia coli</i> recombinante.
Intercambio iónico	Resinas de base débil Amberlyst A20, regeneradas con amoníaco (Wooley <i>et al.</i> , 1999).	Remoción de inhibidores al quedar adsorbidos electrostáticamente a una resina de intercambio iónico.	Hidroliz. ácido de pinabete; m.o.: <i>S. cerevisiae</i> ; remoción: de compuestos fenólicos >80%, ácidos levulínico, acético y fórmico casi 100%, furfural y HMF 70%; pérdidas considerables de azúcares fermentables. Hidroliz. ácido de álamo: m.o.: <i>Z. mobilis</i> recombinante; remoción: de ácido acético 88%, H ₂ SO ₄ 100%; recuperación de azúcares 100% (Wooley <i>et al.</i> , 1999).
<u>Métodos biológicos</u>			
Destoxificación enzimática	Lacasa y peroxidasa de <i>Trametes versicolor</i> .	Oxidación enzimática; la lacasa remueve selectivamente los compuestos fenólicos de bajo peso molecular y los ácidos fenólicos, posiblemente por polimerización oxidativa.	Hidroliz. de sauce: aumenta la productividad de alcohol de 2 a 3 veces en comparación con hidrolizados no destoxificados; m.o.: <i>S. cerevisiae</i> . Hidroliz. de bagazo de caña pretratado por explosión a vapor: remoción del 80% de los compuestos fenólicos (Martín <i>et al.</i> , 2002).
Destoxificación microbiana	<i>Trichoderma reesei</i> .	Degradación de inhibidores por el hongo; remoción de ác. acético, furfural y deriv. de ácido benzoico.	Hidroliz. de sauce pretratado por explosión a vapor: aumenta la productividad y el rendimiento de alcohol 3 y 4 veces respectivamente en comparación con hidrolizados no destoxificados; m.o.: <i>S. cerevisiae</i> .

Observaciones: Fermentación de referencia se refiere a la realizada en un medio basado en glucosa y sin inhibidores; m. o.: microorganismo utilizado en la fermentación alcohólica.

Fuente: Adaptada de Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification" (2000)

empleados para la obtención de bioetanol con base en la información compilada para hidrolizados de madera.

Los hidrolizados hemicelulósicos productos del pretratamiento, que contienen mayor carga contaminante de subproductos no deseables son aquéllos que involucran el uso de químicos, tales como el pretratamiento químico o el fisicoquímico catalizado.

Los subproductos nocivos del pretratamiento están constituidos por furaldehídos, ácidos débiles y derivados fenólicos, los cuales tienen impactos negativos en la salud humana y el ambiente. Los dos furaldehídos más comunes, el HMF y el furfural, son generados en condiciones severas a partir de las hexosas y pentosas, respectivamente; los ácidos débiles de los residuos lignocelulósicos, tales como el ácido acético, fórmico y levulínico son principalmente formados por la desacetilación de la hemicelulosa o la ruptura del HMF y los compuestos fenólicos se forman generalmente durante la ruptura de la lignina y se pueden encontrar en numerosas variantes, dependiendo del tipo de lignina que esté contenida en la materia prima⁽⁴⁾.

La alta concentración de materia orgánica en los hidrolizados hemicelulósicos y, por consiguiente, en los efluentes líquidos finales se puede cuantificar en términos de la DQO y concentración de fenoles. La DQO permite evaluar la contaminación de furaldehídos y ácidos débiles (susceptibles de ser oxidados por combustión en presencia de oxígeno) y la concentración de fenoles garantiza la evaluación total de los contaminantes derivados fenólicos.

7. Demanda química de oxígeno (DQO) y técnica de biodegradación

La demanda química de oxígeno o DQO se define como la cantidad de un oxidante específico que reacciona con la muestra bajo condiciones controladas. La cantidad de oxidante consumido se

expresa en términos de su equivalencia en oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) y, debido a sus propiedades químicas únicas, el ión dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) -de color naranja- es el oxidante específico utilizado en la mayoría de los métodos analíticos, siendo reducido al ión crómico (Cr^{3+}) -de color verde- en todas las pruebas. Tanto los componentes orgánicos como inorgánicos de una muestra están sujetos a oxidación, pero en la mayoría de los casos el componente orgánico predomina y es el de mayor interés. Si se desea medir por separado la DQO orgánica o inorgánica, se deberán seguir pasos adicionales para distinguir una de la otra. La DQO es una prueba definida, donde el grado de oxidación de la muestra puede ser afectado por el tiempo de digestión, el poder oxidante del reactivo y la concentración de la DQO en la muestra.

La DQO es, frecuentemente, usada como una medida de los contaminantes en aguas residuales y naturales. Otros parámetros analíticos relacionados son la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), el carbón total orgánico (CTO) y la demanda total de oxígeno (DTO). En muchos casos es posible relacionar dos o más de estos valores para una muestra dada. La DBO es una medida del oxígeno consumido por microorganismos bajo condiciones específicas, el CTO es una medida del carbón orgánico en una muestra y la DTO es una medida de la cantidad de oxígeno consumida por todos los elementos en una muestra cuando la oxidación completa (total) es alcanzada.

Biodegradación de los componentes orgánicos

Los procesos biológicos de tratamiento del agua se basan en la utilización, por parte de microorganismos, de la energía contenida en la materia orgánica contaminante medida como DQO o como DBO⁽⁵⁵⁾. En este proceso, también conocido como biodegradación, una parte de los contaminantes es oxidada para la producción de la energía requerida por los microorganismos, mientras que la otra parte es

utilizada para formar nuevas células. Al escasear el sustrato, la población microbiana entra en la fase de respiración endógena, resultando como productos finales CO_2 , H_2O , NH_3 y sustancias no biodegradables.

Los procesos biológicos pueden ser de cuatro tipos: aerobios, anaerobios, anóxicos y facultativos. Los procesos aerobios requieren de oxígeno disuelto, mientras que en los anaerobios hay ausencia de éste. Los procesos anóxicos se llevan a cabo en presencia de oxígeno combinado (NO_3^- , SO_4^{2-} , etc.), mientras que en los procesos facultativos existen poblaciones microbianas mixtas que son indiferentes a la presencia o ausencia de oxígeno. La vía anaerobia produce pocos lodos (células), mientras que la aerobia genera una cantidad aproximadamente cinco veces mayor.

En función de la forma en que se encuentre la biomasa, los procesos biológicos se clasifican en:

- Sistemas con biomasa suspendida: en estos sistemas los microorganismos se encuentran libres dentro del tanque. Son muy aplicados pero el mayor inconveniente es que, frecuentemente, tienen problemas de decantación, por ello los microorganismos se escapan con el efluente. El principal proceso de este tipo es el conocido como de lodos activados.
- Sistemas con biomasa fija: en estos sistemas los microorganismos se encuentran adheridos en un soporte. Tienen menor volumen que los sistemas con biomasa suspendida y producen flóculos con alto grado de sedimentabilidad. Algunos procesos de este tipo son los que utilizan filtros percoladores, biodiscos rotatorios o lechos fluidificados.

8. Fenoles y técnica de biodegradación

Los fenoles, definidos como hidroxilo derivados del benceno y sus núcleos condensados, pueden ocurrir en aguas residuales domésticas e industriales, aguas naturales y fuentes de agua potable. La cloración de dichas aguas puede producir clorofenoles olorosos y de sabor desagradable. Los procesos de remoción de fenoles en el tratamiento de aguas incluyen la supercloración, tratamientos con dióxido de cloro o cloroaminas, ozonización, extracción con solventes, adsorción con carbón activado, oxidación química, incineración y otros métodos fisicoquímicos⁽⁵⁶⁾. Sin embargo, estos métodos sufren serios inconvenientes, tales como el alto costo y la posible formación de productos peligrosos.

Biodegradación aerobia del fenol

La degradación biológica es un método de descontaminación del agua muy utilizado, debido a sus bajos costos y a la posibilidad de mineralizar completamente las moléculas orgánicas a CO₂ y H₂O en condiciones aerobias. Sin embargo, el contenido de fenol en aguas residuales es difícil de tratar, ya que al ser un inhibidor del crecimiento microbiano, su biodegradación es entorpecida por la toxicidad que ejerce a altas concentraciones. El efecto bactericida general del fenol está basado en la capacidad del compuesto para disociarse dentro de las células, con lo que las funciones de la membrana citoplasmática se ven interrumpidas, causando la muerte de las células⁽⁵⁶⁾.

Las rutas de biodegradación del fenol han sido investigadas extensamente. La mayoría de los estudios se han dirigido a la biodegradación aerobia del fenol, la cual se lleva a cabo por la mediación de una amplia variedad de microorganismos. Entre las cepas bacterianas que degradan fenol pueden citarse *Acinetobacter calcoaceticus*⁽⁵⁷⁾, *Burkholderia cepacia* G4⁽⁵⁸⁾, *Klebsiella oxytoca*⁽⁵⁹⁾,

Pseudomonas pickettii⁽⁶⁰⁾, *Pseudomonas putida*⁽⁶¹⁾, *Ralstonia eutropha*⁽⁶²⁾ y *Rhodococcus sp.*⁽⁶³⁾. Asimismo, existen levaduras que degradan fenol, tales como *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra* y *Trichosporon cutaneum*^(64,58), y algas como *Ochromonas danica*⁽⁶⁵⁾.

Por otra parte, se han efectuado numerosos estudios utilizando cultivos microbianos mixtos, principalmente lodos activados, para la biodegradación de fenol^(66,67).

9. Comentarios finales

En resumen, la revisión de la literatura presentada respalda las ventajas del uso del bioetanol o etanol combustible, así como la perspectiva de su producción a partir de la biomasa residual, en un marco de desarrollo sostenible. Los materiales lignocelulósicos representan una fuente de carbono ampliamente disponible, pero su utilización requiere de una tecnología limpia e innovadora.

Investigadores de todo el mundo están estudiando la naturaleza de la biomasa y los medios requeridos para poder explotar económicamente estos recursos renovables, hoy en día, tan accesibles. Los éxitos de la investigación en este campo, en última instancia, deberán conducir a una solución integral de la gestión de los residuos agrícolas y forestales, juntamente con la producción de químicos y otros productos alternativos de los mismos residuos (biorefinerías).

Cabe resaltar que la búsqueda de un pretratamiento menos contaminante, como el descrito en este trabajo, da las pautas necesarias para encaminar y garantizar una producción más limpia de bioetanol de segunda generación.

III. OBJETIVOS

General

Proponer un pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado del aserrín de capirona (durante la etapa inicial del proceso de producción de bioetanol) como alternativa para reducir la demanda química de oxígeno (DQO) y concentración de fenoles a valores inferiores a $10 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ y $0,001 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, generados en el hidrolizado hemicelulósico.

Específicos

1. Realizar un pretratamiento químico referencial del aserrín de capirona, tomando los valores de la DQO ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) y concentración de fenoles (mg L^{-1}) obtenidos en los hidrolizados hemicelulósicos como línea base para poder comparar y establecer, adicionalmente, el porcentaje de reducción de la contaminación lograda con el pretratamiento propuesto, ya que dichos parámetros ambientales no se reportan cuantitativamente en la literatura revisada.
2. Realizar un pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional del aserrín de capirona, tomando los valores de la DQO ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) y concentración de fenoles (mg L^{-1}) obtenidos en los hidrolizados hemicelulósicos como línea base alternativa para poder comparar y establecer, adicionalmente, el porcentaje de reducción de la contaminación lograda con el pretratamiento propuesto.
3. Evaluar el efecto que tiene el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto en la obtención de azúcares reductores fermentables contenidos en el hidrolizado enzimático, comparando para ello los rendimientos de sacarificación (porcentaje de conversión de azúcares) logrados mediante dicho pretratamiento respecto a los pretratamientos aplicados convencionalmente (referencial / opcional), caracterizados por el empleo de químicos.
4. Evaluar el efecto que tiene el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto en la obtención de etanol contenido en el

mosto fermentado, comparando para ello los rendimientos de fermentación (porcentaje de transformación de azúcares) logrados mediante dicho pretratamiento respecto a los pretratamientos aplicados convencionalmente (referencial / opcional), caracterizados por el empleo de químicos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y equipos automatizados

1.1. Aserrín de capirona

Como material lignocelulósico se utilizó el aserrín de capirona, desecho contaminante generado durante el aserrado de la madera en la selva peruana, el cual fue recolectado adecuadamente de un aserradero de la ciudad de Pucallpa, capital del departamento de Ucayali, y transportado a la ciudad de Lima, en cantidades suficientes para el desarrollo del presente proyecto (ver figura 6).



Figura 6. Transporte a Lima del aserrín de capirona. A la llegada del material lignocelulósico a la UNI, los sacos fueron pesados, rotulados y almacenados para las pruebas programadas.

Fuente: Registros fotográficos propios

1.2. Hipoclorito de sodio

Se utilizaron mezclas de galoneras (3,785 L cada una) de hipoclorito de sodio (NaOCl) como reactante de pretratamiento

químico, con una concentración comercial de cloro libre entre 6 y 7 %, una densidad alrededor de $1,1000 \text{ kg L}^{-1}$ y un pH básico de 12, aproximadamente (ver figura 7).



Figura 7. Hipoclorito de sodio (NaOCl), grado comercial. Cuánto más concentrada está la solución en cloro libre, su coloración es más intensa.

Fuente: Registros fotográficos propios

Es importante recalcar que el volumen usado de reactante de pretratamiento inicial (V_{rp_i}) para cada prueba “i” depende de la concentración inicial del mismo (C_{rp_i}), la cual es constante para una misma galonera empleada. En ese sentido, para determinar la C_{rp_i} de cada galonera, se utilizó un método volumétrico que requiere el uso de una solución titulante patrón de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), la cual se estandarizó el mismo día en que se realizaron las experiencias (ver figura 8).



Figura 8. Determinación de la concentración inicial de NaOCl (Crp_i). Para cada galonera utilizada se determinó la concentración inicial de cloro libre de la siguiente manera: se tomaron 20 mL de solución y se diluyeron con agua destilada a 1 L; después se tomaron 25 mL de la mezcla y se le adicionó 1 g de cristales de yoduro de potasio, acidificando luego con 4 mL de ácido acético glacial; finalmente, la mezcla resultante se tituló con una solución titulante patrón de Na₂S₂O₃ 0,1 N hasta que el color amarillo desapareciera (para afinar el "punto de viraje" se agregó 1 mL de solución de almidón soluble y se continuó la titulación hasta que el color azul oscuro desapareciera completamente).

Fuente: Registros fotográficos propios

1.3. Reactor multipropósito a nivel banco

Las experiencias de pretratamiento químico referencial (RBPE01) y fisicoquímico catalizado opcional (RBPE02), así como las 3 pruebas de hidrólisis enzimática (RBHE01, RBHE02 y RBHE03) y fermentación alcohólica (RBFE01, RBFE02 y RBFE03), realizadas en el laboratorio N° 23 de la FIQT de la UNI, se desarrollaron en un reactor multipropósito a nivel banco con las siguientes características (ver figura 9):

- Capacidad total de 20 L, con un volumen de suspensión (Vs) utilizado de 15 L (pretratamiento e hidrólisis enzimática) y de 12 - 13 L (fermentación alcohólica).
- Material de acero inoxidable 316, grado sanitario.
- Sistema de agitación de velocidad variable.
- Sistema simultáneo de enfriamiento y calentamiento.
- Resistencia de calentamiento externa.
- Instrumentación de control: instalación de un sensor de temperatura (termocupla J) y un sensor de potencial de acidez (electrodo de pH).
- Sistema computarizado de control y adquisición de datos (temperatura y pH): uso de un controlador lógico programable (PLC, por sus siglas en inglés) asociado a un computador, utilizando un lenguaje ladder apropiado mediante el programa VersaPro (Standard Edition) Release 2.04 y registrando los datos en tiempo real mediante el programa CIMPLICITY Workbench Version 4.01.

En el apéndice 1 se muestra en detalle el esquema del reactor multipropósito a nivel banco empleado.



Figura 9. Reactor multipropósito a nivel banco. En este equipo automatizado se realizaron diversas pruebas de pretratamiento químico, hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica, sensando y controlando las principales variables de operación (temperatura y pH) durante cada una de las experiencias.

Fuente: Registros fotográficos propios

1.4. Complejo enzimático celulasa (Cellic[®] CTec2 y Cellic[®] HTec2)

El complejo enzimático celulasa está compuesto por la mezcla sinérgica de las enzimas Cellic[®] CTec2 y Cellic[®] HTec2, ambas proporcionadas por la empresa Novozymes Latin America L. T. D. A., las cuales han demostrado ser eficaces en una amplia variedad de materiales lignocelulósicos pretratados para la conversión de sus hidratos de carbono o carbohidratos en azúcares simples antes de la fermentación. La tabla 7 muestra una breve descripción de las enzimas Cellic[®] CTec2 y Cellic[®] HTec2 y sus características.

Tabla 7. Descripción de las enzimas Cellic[®] CTec2 y Cellic[®] HTec2 y sus características

Producto	Cellic [®] CTec2	Cellic [®] HTec2
Especificaciones técnicas / Descripción	<ul style="list-style-type: none"> - Complejo celulasa para la degradación de la celulosa a azúcares fermentables. - Es una mezcla de: <ul style="list-style-type: none"> * Celulasas agresivas. * Alto nivel de β-glucosidasas. * Hemicelulasa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Endoxylanasa con alta especificidad por la hemicelulosa soluble. - Celulasa adicional.
Características	<ul style="list-style-type: none"> - Alto rendimiento de conversión. - Efectivo a altas concentraciones de sólidos. - Tolerante a inhibidores. - Compatible con múltiples materias primas y pretratamientos. - Alta concentración y estabilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> - Puede mejorar la hidrólisis de la celulosa cuando se combina con Cellic[®] CTec2. - Ayuda en caso de leve pretratamiento ácido o alcalino. - Convierte hemicelulosa a azúcares fermentables.
Beneficios	<ul style="list-style-type: none"> - Hasta un 50 % de menor dosis de enzima. - Bajos costos de operación y capital a partir de la optimización del proceso al permitir, por ejemplo, una más alta carga de sólidos totales y título del etanol. - Permite un más bajo costo de etanol. - Flexibilidad del proceso aumentada. 	<ul style="list-style-type: none"> - 20 % menor costo de uso de la enzima. - Permite altos rendimientos de etanol. - Provee una flexibilidad aumentada para la tecnología de pretratamiento.

Fuente: Adaptado de: "Hoja de aplicación de la empresa Novozymes"

La enzima Cellic[®] CTec2 tiene un rango de temperatura óptimo entre 45 y 50 °C, y un rango de pH óptimo entre 5,0 y 5,5, como se muestra en las figuras 10 y 11, respectivamente. Los perfiles de actividad fueron producidos por el fabricante utilizando rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido y un 5 % de carga de sólidos totales en el reactor de hidrólisis enzimática. La temperatura se mantuvo constante en 50 °C para el perfil de pH, y el pH se mantuvo en 5,0 para el perfil de temperatura a lo largo de la hidrólisis (72 horas).

La enzima Cellic[®] HTec2 tiene un rango de temperatura óptimo entre 65 y 70 °C, y un pH óptimo de 5,0. Sin embargo, se suele sugerir una temperatura de operación entre 45 y 50 °C para la misma, ya que usualmente es usada en combinación sinérgica con la enzima Cellic[®] CTec2. Las figuras 12 y 13 ilustran la actividad de la enzima Cellic[®] HTec2 a diferentes valores de temperatura y pH utilizando arbinoxilano de azo-trigo como sustrato.

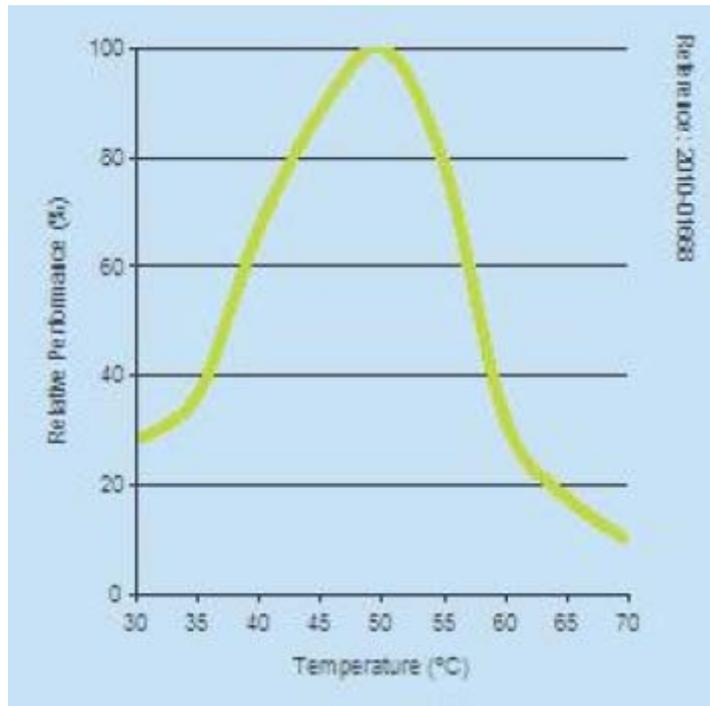


Figura 10. Efecto de la temperatura en Cellic® CTec2. Entre 45 y 50 °C, hay un rendimiento relativo promedio del 95 %. Fuente: Hoja de aplicación de la empresa Novozymes

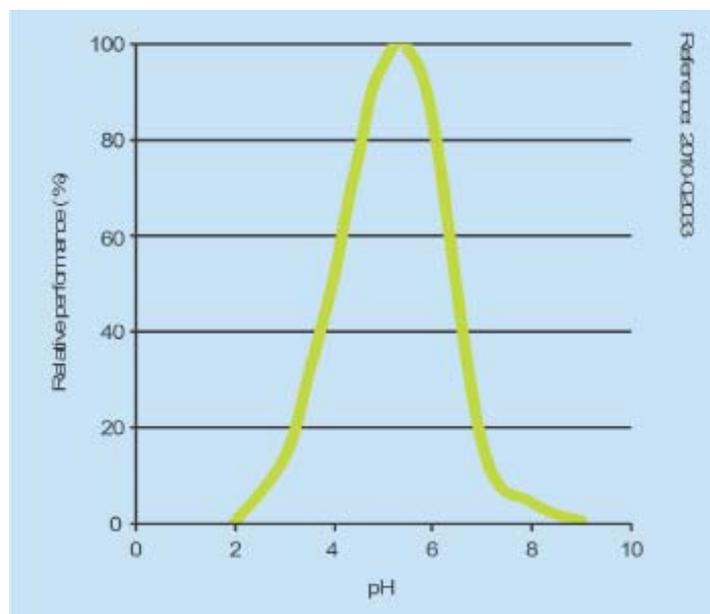


Figura 11. Efecto del pH en Cellic® CTec 2. A un pH entre 5,0 y 5,5, hay un rendimiento relativo promedio del 100 %. Fuente: Hoja de aplicación de la empresa Novozymes

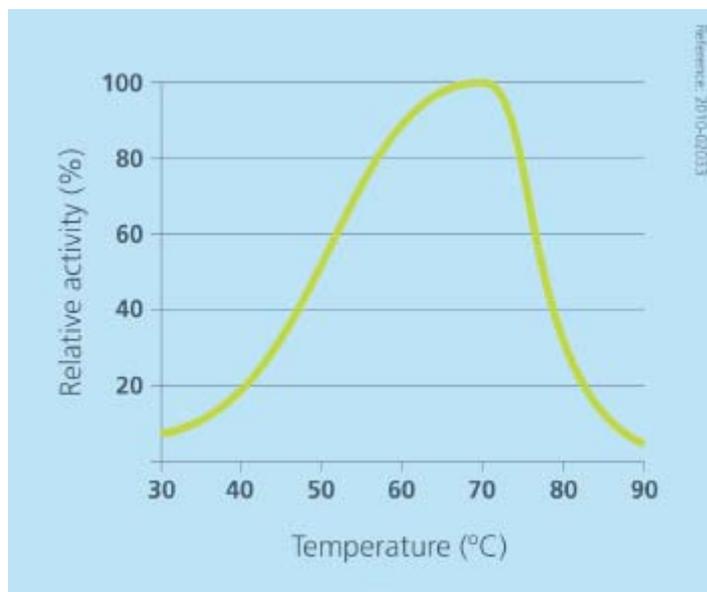


Figura 12. Efecto de la temperatura en Cellic® HTec2. Entre 45 y 50 °C, hay una actividad relativa promedio del 40 %. Fuente: Hoja de aplicación de la empresa Novozymes

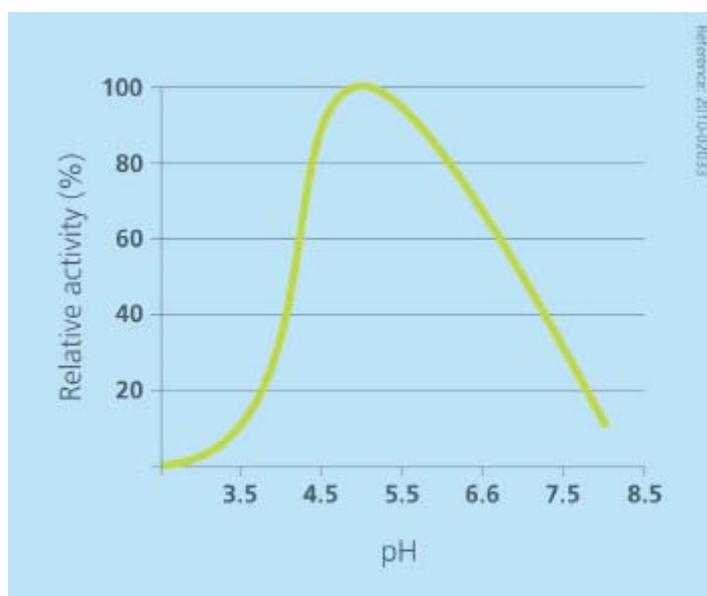


Figura 13. Efecto del pH en Cellic® HTec2. A un pH óptimo de 5,0, hay una actividad relativa promedio del 100 %. Fuente: Hoja de aplicación de la empresa Novozymes

1.5. Levadura alcoholera (*Saccharomyces cerevisiae*)

Para realizar la fermentación de cada hidrolizado enzimático obtenido durante el desarrollo de los experimentos (compuestos principalmente por glucosa), se utilizó un caldo rico en base a una cepa de levadura alcoholera de alto rendimiento de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la FCB de la UNMSM.

Como medio de producción se utilizó el caldo yeast extract-peptone-glucose (YEPG), cuya composición se detalla a continuación:

- Glucosa (dextrosa anhidra)	:	20,0 g L ⁻¹
- Peptona	:	10,0 g L ⁻¹
- Extracto de levadura	:	5,0 g L ⁻¹
- K ₂ HPO ₄	:	0,3 g L ⁻¹
- KH ₂ PO ₄	:	0,3 g L ⁻¹
- pH final:	:	6,5

El apéndice 2 resume el protocolo de producción para un volumen de 2 litros de inóculo de levadura producto del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cultivo por lotes y con glucosa como fuente de carbono.

2. Procedimientos metodológicos

2.1. Acondicionamiento del aserrín de capirona

Las muestras de aserrín de capirona se tamizaron con un tamaño de partícula menor a la abertura de la malla Tyler N° 16 (991 µm), lo cual corresponde a dejar pasar el 80 % de la alimentación (ver figura 14) denotado como d₈₀. Posteriormente, dichas muestras se homogenizaron en un lote único para evitar

diferencias de composición entre las distintas experiencias a realizarse y se almacenaron -a temperatura ambiente- en condiciones secas antes de su uso, constituyendo el aserrín acondicionado con una densidad aparente (ρ_{bulk}) alrededor de 200 kg m^{-3} y con un contenido de humedad del 14 %, aproximadamente.



Figura 14. Acondicionamiento del aserrín de capirona. Se usó una tamizadora Ro-Tap con 6 mallas Tyler (Nº 8, 10, 16, 30, 50 y 100) y plato ciego.

Fuente: Registros fotográficos propios

2.2. Caracterización del aserrín de capirona acondicionado

La caracterización del aserrín de capirona acondicionado (ver tabla 8) se llevó a cabo empleando los Métodos AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Se determinó por duplicado su contenido porcentual de humedad (AOAC 930.04) y cenizas (AOAC 942.05), así como de extraíbles (aceites y grasas (AOAC 981.11) y proteínas (AOAC 978.04)) y fibras (AOAC 930.10). El contenido porcentual de carbohidratos totales (hemicelulosa y celulosa) se obtuvo por cálculo (100 % - % humedad - % cenizas - % extraíbles - % fibras).

Tabla 8. Caracterización del aserrín de capirona acondicionado

Composición	Por ciento
Proteínas	1,02
Cenizas	1,14
Humedad	13,58
Fibras	6,37
Aceites y grasas	0,29
Carbohidratos	77,60

Fuente: Unidad de Servicios de Análisis Químicos (USAQ) - Facultad de Química e Ingeniería Química (FQIQ) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM)

El protocolo de análisis proximal para el aserrín de capirona acondicionado se describe en el apéndice 3.

2.3. Molienda del aserrín de capirona acondicionado

La molienda del aserrín de capirona acondicionado, realizada durante el pretratamiento mecánico (opcional y propuesto), se efectuó en un molino de bolas con un factor de ocupación del

38 % (44 bolas de 1,5" y 16 bolas de 2,5") y un tiempo de residencia de 5 minutos a temperatura ambiente (ver figura 15), obteniéndose el aserrín acondicionado pulverizado con una densidad aparente (ρ_{bulk}) alrededor de 270 kg m^{-3} y con un contenido de humedad del 7 %, aproximadamente.



Figura 15. Molienda del aserrín de capirona acondicionado. Se realizaron varios ciclos de molienda para asegurar cantidades suficientes de material acondicionado pulverizado para las pruebas experimentales.

Fuente: Registros fotográficos propios

2.4. Pretratamiento químico referencial (línea base)

Como ya se mencionó líneas arriba, en la bibliografía consultada no se especifica cuantitativamente la concentración de los subproductos ambientalmente nocivos generados en los hidrolizados hemicelulósicos por el empleo de pretratamientos químicos o fisicoquímicos catalizados y, menos aún, para el caso particular del aserrín de capirona, razón por la cual se realizó, en primer lugar, un pretratamiento químico de esta materia prima, tomando los valores de la DQO ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) y concentración de fenoles (mg L^{-1}) obtenidos en estos hidrolizados hemicelulósicos como línea base referencial para poder comparar y establecer, adicionalmente, el porcentaje de reducción de la contaminación lograda con el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto en este proyecto.

Se aplicó el método de pretratamiento con hipoclorito de sodio (químico), el cual no es mencionado concretamente en la literatura revisada pero posee una gran efectividad oxidativa y es económico. Este pretratamiento consistió en agregar hipoclorito de sodio al lote de muestra de aserrín de capirona acondicionado a una concentración de $0,4937 \text{ mol L}^{-1}$, por el lapso de 1 hora, dejando que este químico actúe sobre el material lignocelulósico, degradando la lignina, hemicelulosa y celulosa.

Durante el desarrollo del pretratamiento químico referencial RBPE01 empleado (línea base), se tomaron en cuenta las siguientes variables:

- Demanda química de oxígeno (DQO) antes, durante y después de la generación del hidrolizado hemicelulósico, $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$.
- Concentración de fenoles antes, durante y después de la generación del hidrolizado hemicelulósico, mg L^{-1} .

2.5. Pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional

Se aplicó un pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado al lote muestral de aserrín de capirona acondicionado, el cual implicó la combinación de dos de los siguientes métodos de pretratamiento existentes en el estado del arte actual (un pretratamiento mecánico combinado con un pretratamiento fisicoquímico catalizado): la molienda de martillos, rutinaria, de rodillos, vibratoria y de bolas (pretratamientos mecánicos); y, los tratamientos químicos que involucran el uso de agentes oxidantes, álcalis, ácidos y sales⁽²⁾.

El pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 consistió en el empleo de un molino de bolas seguido de un tratamiento químico con hipoclorito de sodio, lográndose

de esta manera la degradación de la lignina, hemicelulosa y celulosa contenidas en el material lignocelulósico. El lote de muestra acondicionado pasó por el molino de bolas a 72 rpm y permaneció en éste por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, al material lignocelulósico pulverizado se le adicionó hipoclorito de sodio a una concentración de $0,5158 \text{ mol L}^{-1}$, por el lapso de 1 hora.

Durante el desarrollo del pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02, se tomaron en cuenta las siguientes variables:

- Demanda química de oxígeno (DQO) antes, durante y después de la generación del hidrolizado hemicelulósico, $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$.
- Concentración de fenoles antes, durante y después de la generación del hidrolizado hemicelulósico, mg L^{-1} .

2.6. Pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto

Se aplicó un pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado al lote muestral de aserrín de capirona acondicionado, el cual implicó la combinación de dos de los siguientes métodos de pretratamiento existentes en el estado del arte actual (un pretratamiento mecánico combinado con un pretratamiento fisicoquímico no catalizado): la molienda de martillos, rutinaria, de rodillos, vibratoria y de bolas (pretratamientos mecánicos); y, los tratamientos termoquímicos como la explosión en vapor, agua líquida caliente (LHW, por sus siglas en inglés), explosión en fibra de amoníaco (AFEX, por sus siglas en inglés) y explosión en CO_2 (pretratamientos fisicoquímicos no catalizados)⁽²⁾.

El pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 consistió en el empleo de un molino de

bolas seguido de una explosión en vapor, lográndose de esta manera la degradación de la hemicelulosa y transformación de la lignina -contenidas en el material lignocelulósico- por las altas temperaturas, así como la accesibilidad de la celulosa para la hidrólisis enzimática. El lote de muestra acondicionado pasó por el molino de bolas a 60 rpm y permaneció en éste por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, el material lignocelulósico pulverizado fue descompuesto con vapor saturado a 152 °C (5 bar) por 2 minutos, obteniéndose el aserrín acondicionado pulverizado-explorado con una densidad aparente (ρ_{bulk}) alrededor de 422 kg m⁻³ y con un contenido de humedad del 66 %, aproximadamente.

La experiencia de pretratamiento fisicoquímico no catalizado propuesto (RBPE03), realizada en el laboratorio N° 23 de la FIQT de la UNI, se desarrolló en un equipo de explosión en vapor a nivel banco con las siguientes características (ver figura 16):

- Reactor a presión aislado con capacidad total de 44 L, con un volumen de aserrín seco (V_a) utilizado de 0,250 kg, con sistema de válvulas de ingreso (válvula de suministro de vapor saturado y válvula de purga), sistema de válvulas de salida (válvula de descarga y válvula de drenaje de condensado), sistema de protección de vacío (válvula check para vapor) e instrumentación de control (instalación de un sensor de presión o manómetro). Material de acero inoxidable 316, grado sanitario.
- Ciclón atmosférico (separador del sólido explotado y el vapor saturado) con capacidad total de 18 L. Material de acero inoxidable 316, grado sanitario.
- Caldera APIN de 80 BHP, modelo cilíndrico pirotubular con equipos auxiliares.
- Tubería de conexión entre el reactor a presión aislado y el ciclón atmosférico.

Durante el desarrollo del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03, se tomaron en cuenta las siguientes variables:

- Demanda química de oxígeno (DQO) en el hidrolizado hemicelulósico, $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$.
- Concentración de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico, mg L^{-1} .



Figura 16. Equipo de explosión en vapor a nivel banco. En primer lugar, el vapor saturado de la caldera penetra en las estructuras lignocelulósicas por difusión, condensándose bajo la alta presión en el reactor, "humedeciendo" de ese modo el material. Luego, la biomasa "húmeda" es explosionada cuando se libera la presión dentro del reactor, siendo impulsada fuera de éste a través de una pequeña boquilla (válvula de descarga) por la fuerza inducida. En este punto, la humedad condensada dentro de la estructura se evapora instantáneamente debido a la disminución repentina de la presión, la expansión del vapor de agua ejerce una fuerza de cizallamiento sobre la estructura circundante y, si esta fuerza de corte es lo suficientemente alta, el vapor causará la ruptura mecánica de las estructuras lignocelulósicas.

Fuente: Registros fotográficos propios

En el apéndice 4 se muestra en detalle el esquema del equipo de explosión en vapor empleado.

2.7. Acondicionamiento de los hidrolizados hemicelulósicos

Luego de cada pretratamiento empleado (RBPE01, RBPE02 o RBPE03) del material lignocelulósico, se procedió al acondicionamiento de los hidrolizados hemicelulósicos por medio de una decantación simple del líquido concentrado y un lavado con agua osmotizada y posterior filtración (a través de una malla de 53 μm de abertura) del sólido pretratado, logrando reducir, preliminarmente, la concentración de los subproductos ambientalmente nocivos generados en las corrientes de dichos pretratamientos, particularmente, por el empleo de pretratamientos químicos o fisicoquímicos catalizados; todo ello con la finalidad de evitar que estos contaminantes interfieran o se mezclen con el complejo enzimático celulasa y la levadura alcoholera (*Saccharomyces cerevisiae*), ambos inoculados -en forma secuencial- aguas abajo del proceso.

Posteriormente, con cada aserrín pretratado (sólido recuperado, lavado y filtrado) según el pretratamiento empleado (RBPE01, RBPE02 o RBPE03), se procedió a formar suspensiones de 15 L agitables, las cuales representaron la carga inicial del reactor de hidrólisis enzimática y constituyeron el hidrolizado hemicelulósico acondicionado.

Finalizado cada acondicionamiento del material lignocelulósico sometido al pretratamiento empleado (RBPE01, RBPE02 o RBPE03), se tomaron en cuenta las siguientes variables:

- Demanda química de oxígeno (DQO) en el hidrolizado hemicelulósico acondicionado, $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$.
- Concentración de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico acondicionado, mg L^{-1} .

2.8. Ciclo de esterilización de los hidrolizados hemicelulósicos acondicionados

En esta etapa del proceso cada hidrolizado hemicelulósico acondicionado se sometió a un ciclo de esterilización, el cual comprendió el calentamiento de los mismos a una temperatura de 100 °C, la cual se mantuvo por un lapso de 15 minutos, para luego proceder a su enfriamiento natural hasta alcanzar la temperatura de hidrólisis enzimática.

Si bien el pretratamiento químico con hipoclorito de sodio disminuye la carga inicial de microorganismos del sustrato, el ciclo de esterilización realizado después de cada proceso de deslignificación del material lignocelulósico y acondicionamiento de los hidrolizados hemicelulósicos, permite estandarizar la concentración de todos los microorganismos contaminantes oportunistas al inicio de la hidrólisis enzimática, la cual debe ser mínima para garantizar una mayor producción de azúcares reductores fermentables (glucosa).

2.9. Hidrólisis enzimática

Luego de cada ciclo de esterilización de los hidrolizados hemicelulósicos acondicionados provenientes del material lignocelulósico sometido al pretratamiento empleado (RBPE01, RBPE02 o RBPE03), se procedió a su hidrólisis enzimática a presión atmosférica, manteniendo constante la temperatura en 48 °C y el pH en 5,0 unidades a lo largo de toda la hidrólisis (3 días).

Las 3 experiencias de hidrólisis enzimática (RBHE01, RBHE02 y RBHE03), se desarrollaron en el reactor multipropósito. Para esta etapa se utilizó un volumen de complejo enzimático

celulasa correspondiente al 0,27 % (v / v) del volumen de suspensión (Vs).

Durante el desarrollo de cada hidrólisis enzimática según el pretratamiento empleado (RBPE01, RBPE02 o RBPE03), se tomaron en cuenta las siguientes variables:

- Demanda química de oxígeno (DQO) en el hidrolizado enzimático, $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$.
- Concentración de fenoles en el hidrolizado enzimático, mg L^{-1} .
- Concentración de glucosa obtenida antes, durante y después de la generación del hidrolizado enzimático, g L^{-1} .

El apéndice 5 ejemplifica, tal y como se observa en el computador, la pantalla de monitoreo de temperatura y pH durante el desarrollo de la hidrólisis enzimática.

2.10. Ciclo de esterilización de los hidrolizados enzimáticos

En esta etapa del proceso cada hidrolizado enzimático se sometió a un nuevo ciclo de esterilización, el cual comprendió el calentamiento de los mismos a una temperatura de 100 °C, la cual se mantuvo por un lapso de 15 minutos, para luego proceder a su enfriamiento natural hasta alcanzar la temperatura de fermentación alcohólica.

Si bien existe un ciclo de esterilización previo para cada hidrolizado hemicelulósico acondicionado que disminuye y estandariza la carga inicial de todos los microorganismos contaminantes oportunistas al inicio de la hidrólisis enzimática, el nuevo ciclo de esterilización de los hidrolizados enzimáticos permite reducir la probable multiplicación y nueva generación de poblaciones microbianas, estandarizando así su concentración al inicio de la fermentación alcohólica para evitar que todas

éstas compitan por glucosa con la levadura específica, aumentando los rendimientos de fermentación.

2.11. Fermentación alcohólica

Luego de cada hidrólisis enzimática de los hidrolizados hemicelulósicos acondicionados y esterilizados provenientes del material lignocelulósico sometido al pretratamiento empleado (RBPE01, RBPE02 o RBPE03), se procedió a su fermentación alcohólica a presión atmosférica, manteniendo constante la temperatura en 28 °C y el pH en 5,6 unidades a lo largo de toda la fermentación (2,5 días).

Las 3 experiencias de fermentación alcohólica (RBFE01, RBFE02 y RBFE03), se desarrollaron en el reactor multipropósito. Para esta etapa se utilizó un volumen de caldo rico en base a una cepa de levadura alcohólica de alto rendimiento de la especie *Saccharomyces cerevisiae* correspondiente al 10 - 15 % (v / v) del volumen de suspensión (Vs).

Durante el desarrollo de cada fermentación alcohólica (según cada pretratamiento empleado - hidrólisis enzimática), se tomaron en cuenta las siguientes variables:

- Demanda química de oxígeno (DQO) en el mosto fermentado, mg O₂ L⁻¹.
- Concentración de fenoles en el mosto fermentado, mg L⁻¹.
- Concentración de glucosa antes, durante y después de la generación del mosto fermentado, g L⁻¹.

La pantalla de monitoreo de temperatura y pH durante el desarrollo de la fermentación alcohólica se ejemplifica, tal y como se observa en el computador, en el apéndice 6.

2.12. Destilación por lote

Luego de cada hidrólisis enzimática y subsecuente fermentación alcohólica de los hidrolizados hemicelulósicos acondicionados y esterilizados provenientes del material lignocelulósico sometido al pretratamiento empleado (RBPE01, RBPE02 o RBPE03), se procedió a su destilación por lote a presión atmosférica (previa filtración del mosto fermentado a través de una malla de 53 μm de abertura), manteniendo cortes volumétricos de muestra de 0,5 L a lo largo de toda la destilación (3 horas).

Las 3 experiencias de destilación por lote (RBDE01, RBDE02 y RBDE03), realizadas en el laboratorio N° 23-A de la FIQT de la UNI, se desarrollaron en un destilador de una sola etapa a nivel banco con las siguientes características (ver figura 17):

- Capacidad total de 30 L, con un volumen de mosto fermentado (V_m) utilizado de 7 - 9 L.
- Material de acero inoxidable 316, grado sanitario.
- Sistema de enfriamiento (serpentines de condensación).
- Resistencia de calentamiento externa.
- Instrumentación de control: instalación de un sensor digital de temperatura.

Durante el desarrollo de cada destilación por lote (según cada pretratamiento empleado - hidrólisis enzimática - fermentación alcohólica), se tomaron en cuenta las siguientes variables:

- Demanda química de oxígeno (DQO) en la vinaza, $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$.
- Concentración de fenoles en la vinaza, mg L^{-1} .
- Concentración de etanol obtenido en el mosto fermentado, g L^{-1} .



Figura 17. Destilador por lote a nivel banco. En este equipo destilador de una sola etapa se realizaron diversas pruebas de destilación de los mostos fermentados, tomando datos (densidad, grado alcohólico y temperatura) de los cortes volumétricos de muestra del etanol destilado puntual y acumulado durante cada una de las experiencias.

Fuente: Registros fotográficos propios

2.13. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

Para la determinación de la DQO en las muestras tomadas durante el proceso (hidrolizados hemicelulósicos, hidrolizados enzimáticos, mostos fermentados y vinazas) se utilizó el método estándar americano del reflujo cerrado según SMEWW-APHA-AWWA-WEF-5220-D-2012⁽⁶⁸⁾, el cual si bien es cierto puede ser menos exacto y representativo, tiene la ventaja de reducir los problemas de residuos peligrosos de mercurio, cromo hexavalente, ácido sulfúrico, plata y ácidos que generan otros métodos en mayor cantidad.

El método del reflujo cerrado es más económico en el uso de reactivos de sales metálicas y genera pequeñas cantidades de residuos peligrosos, pero requiere la homogenización de las muestras conteniendo sólidos suspendidos con la finalidad de

obtener resultados reproducibles. Comercialmente, las ampollas y tubos de cultivo con reactivos previamente medidos se encuentran disponibles. Las medidas de los volúmenes de muestra, así como los volúmenes y concentraciones de los reactivos son críticos. Consecuentemente, es necesario obtener del fabricante las especificaciones y los límites de error para los reactivos premezclados antes de su uso. Este método se utiliza, típicamente, para determinar valores de la DQO por encima de $50 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$.

El método del reflujo cerrado se fundamenta en el hecho de que la mayoría de tipos de materia orgánica son oxidados por una mezcla hirviendo de ácido crómico y sulfúrico. Una muestra se somete a reflujo en una solución fuertemente ácida con un exceso conocido de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Después de la digestión, el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ restante (no reducido) se titula con sulfato de amonio ferroso para determinar la cantidad de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ consumida y la materia oxidable se calcula en términos de oxígeno equivalente. Los ratios de pesos, volúmenes y poderes oxidantes de los reactivos se deben mantener constantes cuando se usan volúmenes de muestra diferentes a los 50 mL. El tiempo estándar de reflujo de 2 horas puede ser reducido si se demuestra que un período más corto produce los mismos resultados. Algunas muestras con una DQO muy baja o con un contenido de sólidos altamente heterogéneo, puede ser necesario analizarlas por duplicado para obtener los datos más confiables. Los resultados se pueden mejorar aún más haciendo reaccionar una cantidad máxima de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, bajo la condición de que siempre permanezca algún $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ residual.

Cuando una muestra se somete a digestión, el ión dicromato oxida el material de la DQO contenido en la misma, resultando en un cambio del cromo de su estado hexavalente (VI) a su estado trivalente (III). Ambas especies del cromo se colorean y

absorben en la región visible del espectro. El ión dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) absorbe fuertemente en la región de 400 nm, donde la absorción del ión crómico (Cr^{3+}) es mucho menor. El ión crómico absorbe fuertemente en la región de 600 nm, donde el ión dicromato tiene absorción casi nula. En una solución de ácido sulfúrico 9 M, los coeficientes molares de extinción aproximados para estas especies de cromo son los siguientes: para el ión Cr^{3+} de $50 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 604 nm y $25 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 426 nm, y para el ión $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ de $380 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 444 nm; el ión Cr^{3+} tiene un mínimo en la región de 400 nm. Por lo tanto, compensando ambas especies, una máxima absorción de trabajo se encuentra a 420 nm. Para valores de la DQO entre 100 y 900 $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, se determina un aumento en la absorción del ión Cr^{3+} en la región de 600 nm (valores más altos se pueden obtener al diluir la muestra). Los valores de la DQO de 90 $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ o menores se pueden determinar siguiendo la reducción en la absorción del ión $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ a 420 nm (la generación correspondiente del ión Cr^{3+} da un pequeño aumento en la absorción a 420 nm, pero esto se compensa en el procedimiento de calibración).

Las muestras tomadas para determinar la DQO se colectaron en frascos de plástico y se preservaron por acidificación a valores de pH menores o iguales a 2, utilizando para ello H_2SO_4 concentrado. Cada muestra conteniendo sólidos suspendidos se agitó (homogenizó) antes de su análisis correspondiente. Cabe mencionar que si la DQO está relacionada con la DBO, CTO, etc., se debe asegurar que todas las muestras reciban un pretratamiento idéntico; asimismo, para las muestras que contienen valores altos de la DQO, se deben realizar diluciones preliminares con la finalidad de reducir el error inherente en la medición de volúmenes de muestra pequeños.

En el apéndice 7 se detalla el protocolo de determinación de la demanda química de oxígeno en las muestras tomadas durante el proceso.

2.14. Determinación de la concentración de fenoles

Para la determinación de la concentración de fenoles en las muestras tomadas durante el proceso (hidrolizados hemicelulósicos, hidrolizados enzimáticos, mostos fermentados y vinazas) se utilizó el método estándar americano de extracción con cloroformo según SMEWW-APHA-AWWA-WEF-5530-C-2012⁽⁶⁹⁾, el cual está basado en el método colorimétrico que emplea a la 4-aminoantipirina como reactivo, cuya ventaja radica en ofrecer un procedimiento analítico de extrema sensibilidad y adaptable para su uso en muestras de agua conteniendo menos de 1 mg L⁻¹ de concentración de fenoles. En este método se concentra el color en la solución no acuosa.

El método de extracción con cloroformo se fundamenta en el hecho de que los vapores destilables de fenoles reaccionan con la solución 4-aminoantipirina a valores de pH entre 7,8 y 8,0 en presencia de ferrocianuro de potasio para formar un tinte del color de la antipirina, el cual, luego, se extrae de la solución acuosa con cloroformo (CHCl₃) para, posteriormente, medir su absorbancia a 460 nm. Este método cubre un rango de concentración de fenoles desde 1 µg L⁻¹ hasta más de 250 µg L⁻¹ con una sensibilidad de 1 µg L⁻¹.

Los fenoles, en sus concentraciones usualmente encontradas en aguas residuales, están sujetos a la oxidación biológica y química. Por esta razón, las muestras tomadas se preservaron con H₂SO₄ (2 mL L⁻¹) y almacenaron a 4 °C o menos antes de su análisis, a menos que se analizaran dentro de las primeras 4 horas después de su colección. Cabe resaltar que las muestras

preservadas y almacenadas se pueden analizar hasta dentro de 28 días después de su colección.

El apéndice 8 resume el protocolo de determinación de la concentración de fenoles en las muestras tomadas durante el proceso.

2.15. Determinación de la concentración de azúcares reductores (glucosa)

La concentración de azúcares reductores (glucosa) durante la hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica, se evaluó mediante el procedimiento de Miller con el uso del reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con glucosa como estándar⁽⁷⁰⁾.

Las muestras tomadas durante el transcurso de la hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica se almacenaron de inmediato a temperatura de congelación, siendo descongeladas solamente al momento de llevar a cabo la determinación de la concentración de azúcares reductores (glucosa).

El protocolo de determinación de la concentración de azúcares reductores (glucosa) en las muestras tomadas durante el proceso se describe en el apéndice 9.

V. RESULTADOS

1. Pretratamiento químico referencial (línea base) y posterior hidrólisis enzimática - fermentación - destilación por lote

Durante el pretratamiento químico referencial RBPE01 (línea base) se buscó formar una suspensión agitable de 15 L con una consistencia alrededor del 10 % y una concentración de $0,4937 \text{ mol L}^{-1}$ de reactante, para lo cual se agregaron al reactor multipropósito 8,38 L de hipoclorito de sodio al 6,58 % y 7 L de un premezclado total, este último constituido por 1,5 kg de aserrín de capirona acondicionado con 5 L de agua osmotizada.

Luego del lavado y filtrado del sólido del hidrolizado hemicelulósico se obtuvo un volumen de 4,5 L de aserrín pretratado-lavado-filtrado, los cuales se mezclaron con 10,5 L de agua osmotizada con el fin de formar la suspensión agitable de 15 L para ser cargada al reactor multipropósito y dar inicio a la hidrólisis enzimática RBHE01. El volumen de la fase sólida representaba el 43 % del volumen de la fase líquida total, es decir, 6,45 L.

Después de la hidrólisis enzimática se registró un volumen de 2,15 L de la fase sólida y de 10,5 L de la fase líquida total. La reducción del volumen se explica mayormente por la transformación de la celulosa en glucosa y las pérdidas propias por los muestreos realizados para el análisis de la misma concentración de glucosa y el control del pH. El hidrolizado enzimático, en su totalidad, fue sometido a fermentación alcohólica RBFE01 por medio de la inoculación de 1,5 L de caldo rico en cepa de gran potencial alcoholero de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (esto corresponde al 12,5 % del volumen de suspensión total en el reactor multipropósito).

Finalmente, se obtiene un mosto fermentado con un volumen de 1,35 L de la fase sólida y de 9,55 L de la fase líquida total. Luego de

la filtración a través de una malla de 53 μm de abertura se logran obtener 8 L de mosto fermentado libre de sólido, el cual es sometido a una destilación por lote RBDE01 llegándose a recuperar un volumen máximo de etanol de 0,087 L que representa un grado alcohólico del 1,1 % en el mosto fermentado. La vinaza, subproducto del proceso, sale con una densidad de 1,00 kg L^{-1} y un pH de 5,1 a una temperatura de 87 °C.

En la tabla 9 se resume el seguimiento de la demanda química de oxígeno y la concentración de fenoles durante las diferentes etapas del proceso de producción de bioetanol hidratado considerando la aplicación del pretratamiento químico referencial RBPE01.

El agua osmotizada utilizada en esta primera experiencia reportó valores menores a 5 $\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$ para el caso de la DQO y menores a 0,033 mg L^{-1} para el caso de la concentración de fenoles, ambos correspondientes a la sensibilidad mínima detectable en concentración confiablemente que se puede medir al emplear las normas analíticas ambientales.

Adicionalmente, el seguimiento de la concentración de glucosa durante la hidrólisis enzimática RBHE01 y fermentación alcohólica RBFE01 se puede apreciar en las figuras 18 y 19, respectivamente.

Tabla 9. Seguimiento de la DQO y la concentración de fenoles durante la producción de bioetanol hidratado considerando el pretratamiento químico referencial RBPE01

	Día	Código de Muestra	Demanda Química de Oxígeno (DQO) (mg O ₂ L ⁻¹)	Concent. de Fenoles (Fenoles) (mg L ⁻¹)
Químico NaOCl (8,38 L)	---	RBHE01-DF00'	< 5,0	< 0,033
→ Vs = 15 L (C _{rp} = 3,7 %)	0,00	RBHE01-DF00	13 735,0	0,965
	0,01	RBHE01-DF01	17 669,0	1,300
	0,02	RBHE01-DF02	18 320,0	1,100
	0,03	RBHE01-DF03	20 292,0	1,980
	0,04	RBHE01-DF04	21 020,0	2,200
	0,15	RBHE01-DF05	567,0	0,205
Enz. CTec2-HTec2 (40 mL)				← Decantación del Líquido
→ Vs = 15 L (C _c = 0,3 %)	3,34	RBHE01-DF06	26 096,0	0,680
				← Lavado-Filtrado del Sólido
Energía (12,2 kWh)	6,06	RBHE01-DF07	5 362,0	1,050
				← Ceba Levadura (1,5 L)
→ V _m = 8 L (d _v = 1,0 kg L ⁻¹)	6,39	RBHE01-DF08	74 503,0	1,270
				← Vs = 12 L (C _c = 12,5 %)

Fuente: Elaboración propia

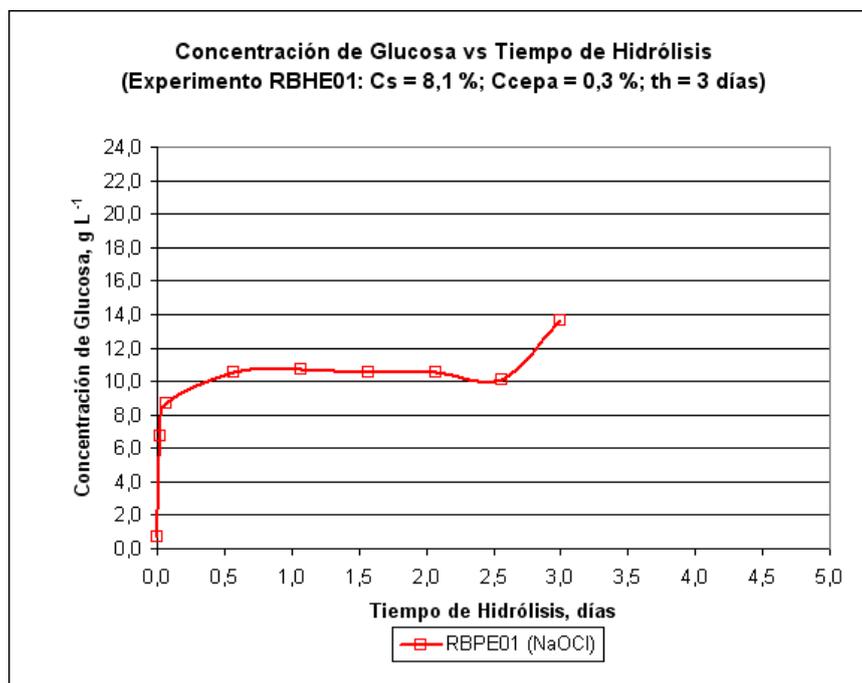


Figura 18. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la hidrólisis enzimática RBHE01. El valor máximo de concentración de glucosa (13,610 g L⁻¹) se alcanza al tercer día de reacción.

Fuente: Elaboración propia

Para los efectos de cálculo del rendimiento de sacarificación en el hidrolizado enzimático proveniente de la hidrólisis enzimática RBHE01, se utilizó el valor inicial correspondiente a la concentración de glucosa potencialmente hidrolizable contenida en el sólido pretratado y filtrado (40,333 g L⁻¹) y el valor final correspondiente a la concentración de glucosa alcanzada al término del tercer día de reacción (13,610 g L⁻¹), tiempo a partir del cual dicho hidrolizado se sometió, inmediatamente, a su fermentación alcohólica RBFE01.

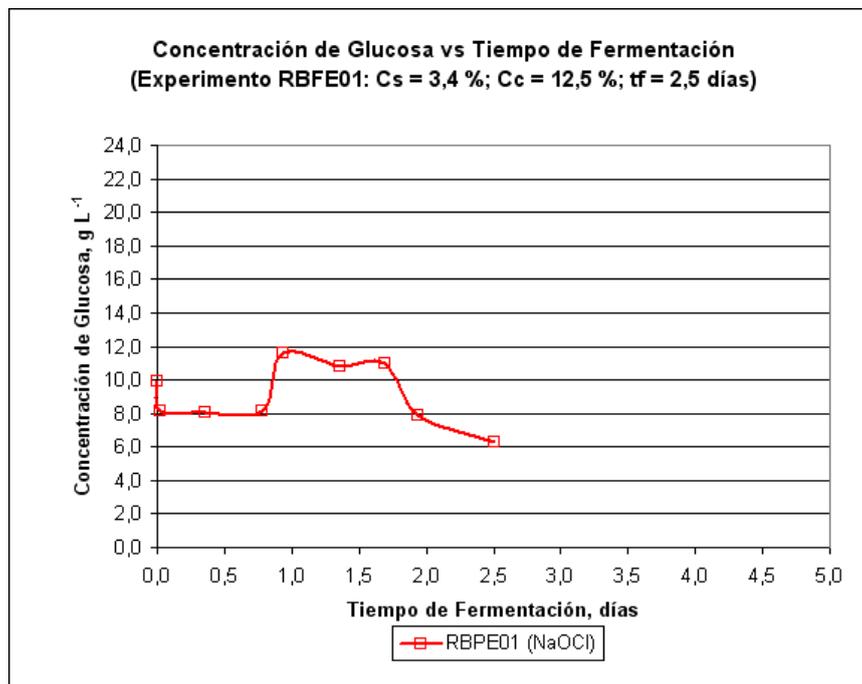


Figura 19. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la fermentación alcohólica RBFE01. El valor mínimo de concentración de glucosa ($6,246 \text{ g L}^{-1}$) se alcanza al segundo día y medio de reacción.

Fuente: Elaboración propia

Para los efectos de cálculo del rendimiento de fermentación en el mosto fermentado proveniente de la fermentación alcohólica RBFE01, se utilizó el valor inicial correspondiente al mayor valor de la concentración de glucosa obtenida durante el proceso ($11,614 \text{ g L}^{-1}$) y el valor final correspondiente a la concentración de glucosa alcanzada al término del segundo día y medio de reacción ($6,246 \text{ g L}^{-1}$), tiempo a partir del cual dicho mosto (previamente filtrado) se sometió, inmediatamente, a su destilación por lote RBDE01.

2. Pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado y posterior hidrólisis enzimática - fermentación - destilación por lote

Durante el pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 se obtuvieron, en primer lugar, 2,700 kg de aserrín de capirona acondicionado pulverizado a través de un molino de bolas a

72 rpm durante 5 minutos, para luego formar con parte de la materia seca resultante una suspensión agitable de 15 L con una consistencia alrededor del 10 % y una concentración de $0,5158 \text{ mol L}^{-1}$ de reactante, para lo cual se agregaron al reactor multipropósito 9,19 L de hipoclorito de sodio al 6,27 % y 6,5 L de un premezclado total, este último constituido por 1,5 kg de aserrín de capirona acondicionado pulverizado con 5,23 L de agua osmotizada.

Luego del lavado y filtrado del sólido del hidrolizado hemicelulósico se obtuvo un volumen de 4,5 L de aserrín pretratado-lavado-filtrado, los cuales se mezclaron con 10,5 L de agua osmotizada con el fin de formar la suspensión agitable de 15 L para ser cargada al reactor multipropósito y dar inicio a la hidrólisis enzimática RBHE02. El volumen de la fase sólida representaba el 43 % del volumen de la fase líquida total, es decir, 6,45 L.

Después de la hidrólisis enzimática se registró un volumen de 1,85 L de la fase sólida y de 12,6 L de la fase líquida total. La reducción del volumen se explica mayormente por la transformación de la celulosa en glucosa y las pérdidas propias por los muestreos realizados para el análisis de la misma concentración de glucosa y el control del pH. El hidrolizado enzimático, en su totalidad, fue sometido a fermentación alcohólica RBF02 por medio de la inoculación de 2 L de caldo rico en cepa de gran potencial alcoholero de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (esto corresponde al 14,8 % del volumen de suspensión total en el reactor multipropósito).

Finalmente, se obtiene un mosto fermentado con un volumen de 1,7 L de la fase sólida y de 10,85 L de la fase líquida total. Luego de la filtración a través de una malla de $53 \mu\text{m}$ de abertura se logran obtener 9 L de mosto fermentado libre de sólido, el cual es sometido a una destilación por lote RBDE02 llegándose a recuperar un volumen máximo de etanol de 0,133 L que representa un grado alcohólico del 1,5 % en el mosto fermentado. La vinaza, subproducto

del proceso, sale con una densidad de $1,00 \text{ kg L}^{-1}$ y un pH de 4 a una temperatura de $82 \text{ }^\circ\text{C}$.

En la tabla 10 se resume el seguimiento de la demanda química de oxígeno y la concentración de fenoles durante las diferentes etapas del proceso de producción de bioetanol hidratado considerando la aplicación del pretratamiento mecánico-físicoquímico catalizado opcional RBPE02.

El agua osmotizada utilizada en esta segunda experiencia reportó valores menores a $5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ para el caso de la DQO y menores a $0,033 \text{ mg L}^{-1}$ para el caso de la concentración de fenoles, ambos correspondientes a la sensibilidad mínima detectable en concentración confiablemente que se puede medir al emplear las normas analíticas ambientales.

Adicionalmente, el seguimiento de la concentración de glucosa durante la hidrólisis enzimática RBHE02 y fermentación alcohólica RBFE02 se puede apreciar en las figuras 20 y 21, respectivamente.

Tabla 10. Seguimiento de la DQO y la concentración de fenoles durante la producción de bioetanol hidratado considerando el pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02

	Día	Código de Muestra	Demanda Química de Oxígeno (DQO) (mg O ₂ L ⁻¹)	Concent. de Fenoles (Fenoles) (mg L ⁻¹)
Químico NaOCl (9,19 L)	---	RBHE02-DF00'	< 5,0	< 0,033
Vs = 15 L (C _{rp} = 3,8 %)	0,00	RBHE02-DF00	15 238,0	0,523
	0,01	RBHE02-DF01	15 614,0	0,484
	0,02	RBHE02-DF02	26 747,0	2,390
	0,03	RBHE02-DF03	25 262,0	3,420
	0,04	RBHE02-DF04	30 088,0	3,500
Enz. CTec2-HTec2 (40 mL)	0,17	RBHE02-DF05	1 355,0	0,196
Vs = 15 L (C _c = 0,3 %)	3,36	RBHE02-DF06	26 676,0	1,110
Energía (7,4 kWh)	6,07	RBHE02-DF07	28 709,0	0,999
V _m = 9 L (d _v = 1,0 kg L ⁻¹)	6,43	RBHE02-DF08	67 933,0	2,090

Fuente: Elaboración propia

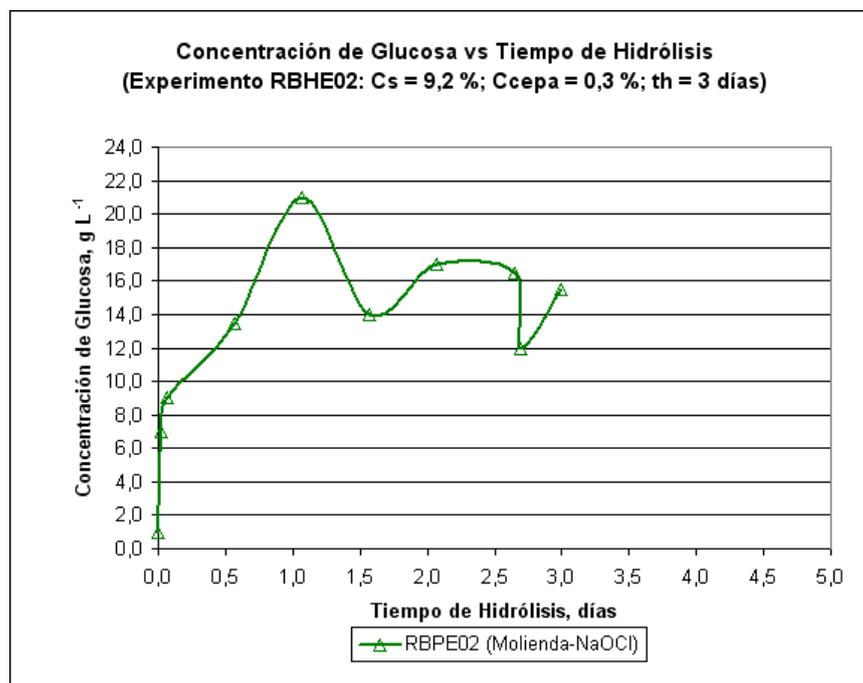


Figura 20. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la hidrólisis enzimática RBHE02. El valor máximo de concentración de glucosa (21,000 g L⁻¹) se alcanza a los 1,1 días de reacción.

Fuente: Elaboración propia

Para los efectos de cálculo del rendimiento de sacarificación en el hidrolizado enzimático proveniente de la hidrólisis enzimática RBHE02, se utilizó el valor inicial correspondiente a la concentración de glucosa potencialmente hidrolizable contenida en el sólido pretratado y filtrado (44,623 g L⁻¹) y el valor final correspondiente a la concentración de glucosa alcanzada al término del tercer día de reacción (15,500 g L⁻¹), tiempo a partir del cual dicho hidrolizado se sometió, inmediatamente, a su fermentación alcohólica RBFE02.

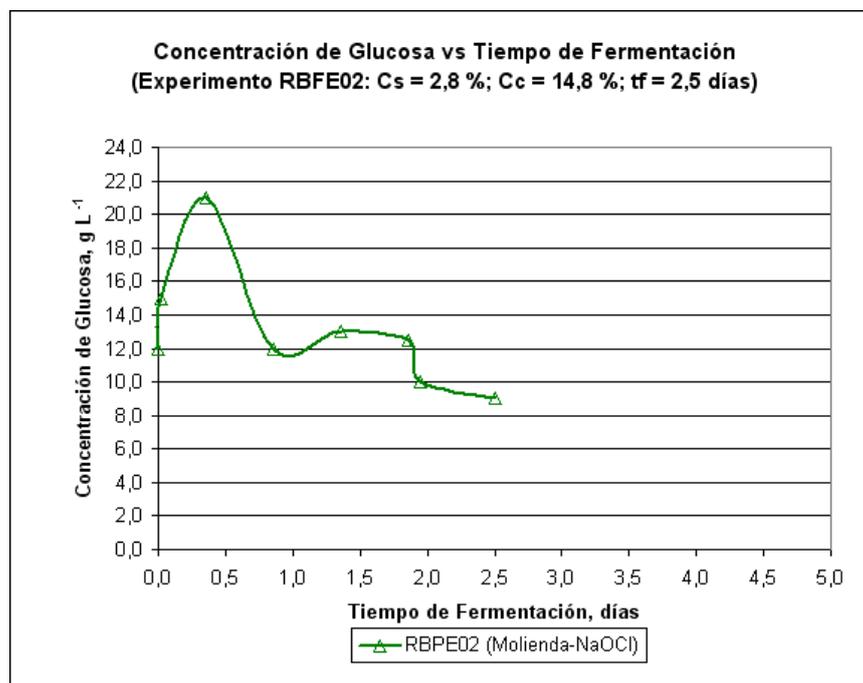


Figura 21. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la fermentación alcohólica RBFE02. El valor mínimo de concentración de glucosa ($9,000 \text{ g L}^{-1}$) se alcanza al segundo día y medio de reacción.

Fuente: Elaboración propia

Para los efectos de cálculo del rendimiento de fermentación en el mosto fermentado proveniente de la fermentación alcohólica RBFE02, se utilizó el valor inicial correspondiente al mayor valor de la concentración de glucosa obtenida durante el proceso ($21,000 \text{ g L}^{-1}$) y el valor final correspondiente a la concentración de glucosa alcanzada al término del segundo día y medio de reacción ($9,000 \text{ g L}^{-1}$), tiempo a partir del cual dicho mosto (previamente filtrado) se sometió, inmediatamente, a su destilación por lote RBDE02.

3. Pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado y posterior hidrólisis enzimática - fermentación - destilación por lote

Durante el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 se obtuvieron, en primer lugar, 2,735 kg de aserrín de capirona acondicionado pulverizado a través de un molino

de bolas a 60 rpm durante 5 minutos, para luego pasar toda la materia seca resultante a través de un equipo de explosión en vapor (10 lotes de 0,250 kg cada uno y un lote final de 0,235 kg) y ser descompuesta con vapor saturado a 152 °C (5 bar) por 2 minutos, obteniéndose 7 kg de aserrín acondicionado pulverizado-explosionado con un contenido de humedad del 66,2 % y un coeficiente de relación fraccional adimensional de 0,3380 kg de aserrín seco / kg de aserrín húmedo.

Luego del lavado y filtrado del sólido del hidrolizado hemicelulósico se obtuvo un volumen de 4,65 L de aserrín pretratado-lavado-filtrado, los cuales se mezclaron con 10,43 L de agua osmotizada con el fin de formar la suspensión agitable de 15 L para ser cargada al reactor multipropósito y dar inicio a la hidrólisis enzimática RBHE03. El volumen de la fase sólida representaba el 41,7 % del volumen de la fase líquida total, es decir, 6,25 L.

Después de la hidrólisis enzimática se registró un volumen de 3 L de la fase sólida y de 12,4 L de la fase líquida total. La reducción del volumen se explica mayormente por la transformación de la celulosa en glucosa y las pérdidas propias por los muestreos realizados para el análisis de la misma concentración de glucosa y el control del pH. El hidrolizado enzimático, en su totalidad, fue sometido a fermentación alcohólica RBFE03 por medio de la inoculación de 1,5 L de caldo rico en cepa de gran potencial alcoholero de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (esto corresponde al 11,5 % del volumen de suspensión total en el reactor multipropósito).

Finalmente, se obtiene un mosto fermentado con un volumen de 1,8 L de la fase sólida y de 9,5 L de la fase líquida total. Luego de la filtración a través de una malla de 53 µm de abertura se logran obtener 7,5 L de mosto fermentado libre de sólido, el cual es sometido a una destilación por lote RBDE03 llegando a recuperar un volumen máximo de etanol de 0,071 L que representa un grado

alcohólico del 0,9 % en el mosto fermentado. La vinaza, subproducto del proceso, sale con una densidad de $0,96 \text{ kg L}^{-1}$ y un pH de 6,1 a una temperatura de $79 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

En la tabla 11 se resume el seguimiento de la demanda química de oxígeno y la concentración de fenoles durante las diferentes etapas del proceso de producción de bioetanol hidratado considerando la aplicación del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03.

El agua osmotizada utilizada en esta tercera experiencia reportó valores menores a $5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ para el caso de la DQO y menores a $0,033 \text{ mg L}^{-1}$ para el caso de la concentración de fenoles, ambos correspondientes a la sensibilidad mínima detectable en concentración confiablemente que se puede medir al emplear las normas analíticas ambientales.

Adicionalmente, el seguimiento de la concentración de glucosa durante la hidrólisis enzimática RBHE03 y fermentación alcohólica RBFE03 se puede apreciar en las figuras 22 y 23, respectivamente.

Tabla 11. Seguimiento de la DQO y la concentración de fenoles durante la producción de bioetanol hidratado considerando el pretratamiento mecánico-físico-químico no catalizado propuesto RBPE03

	Día	Código de Muestra	Demanda Química de Oxígeno (DQO) (mg O₂ L⁻¹)	Concent. de Fenoles (Fenoles) (mg L⁻¹)	
Explosión en Vapor (5,25 L)	---	RBHE03-DF00'	< 5,0	< 0,033	
(P _{evp} = 70,5 psi)	0,04	RBHE03-DF00	3 108,0	0,976	Decantación del Líquido
Enz. CTec2-HTec2 (40 mL)	0,22	RBHE03-DF01	290,0	0,083	Lavado-Filtrado del Sólido
V _s = 15 L (C _c = 0,3 %)	3,40	RBHE03-DF02	4 256,0	0,376	Cepa Levadura (1,5 L)
Energía (8,0 kWh)	6,08	RBHE03-DF03	7 220,0	0,627	V _s = 13 L (C _c = 11,5 %)
V _m = 7,5 L (d _v = 1,0 kg L ⁻¹)	6,42	RBHE03-DF04	22 217,0	1,840	

Fuente: Elaboración propia

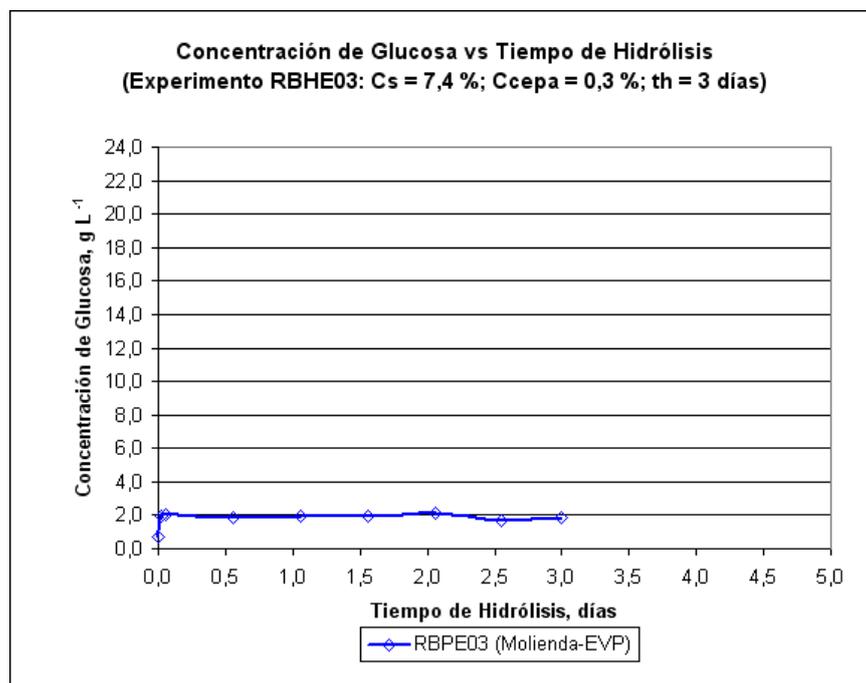


Figura 22. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la hidrólisis enzimática RBHE03. El valor máximo de concentración de glucosa ($2,125 g L^{-1}$) se alcanza a los 2,1 días de reacción.

Fuente: Elaboración propia

Para los efectos de cálculo del rendimiento de sacarificación en el hidrolizado enzimático proveniente de la hidrólisis enzimática RBHE03, se utilizó el valor inicial correspondiente a la concentración de glucosa potencialmente hidrolizable contenida en el sólido pretratado y filtrado ($36,291 g L^{-1}$) y el valor final correspondiente a la concentración de glucosa alcanzada al término del tercer día de reacción ($1,852 g L^{-1}$), tiempo a partir del cual dicho hidrolizado se sometió, inmediatamente, a su fermentación alcohólica RBFE03.

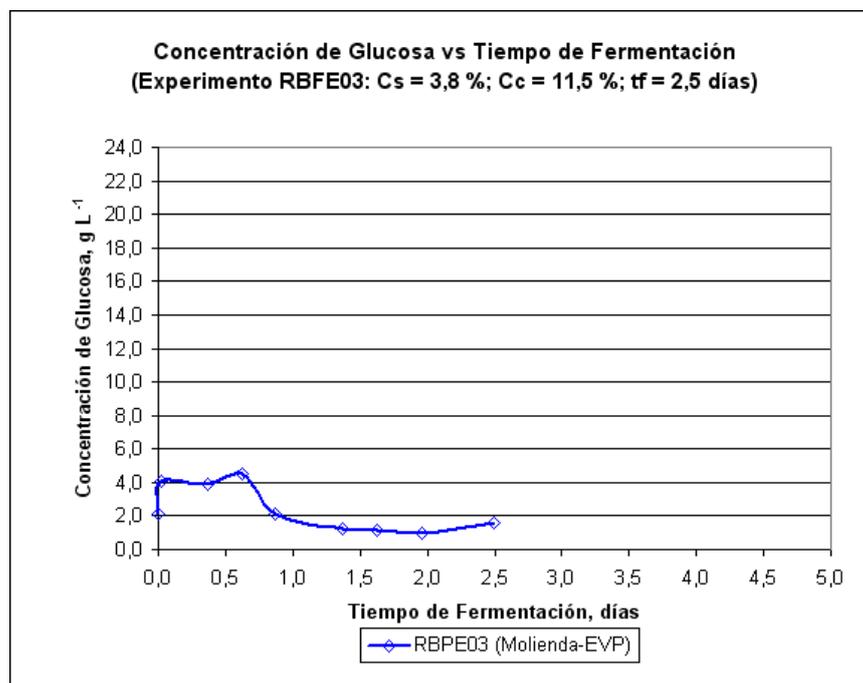


Figura 23. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la fermentación alcohólica RBFE03. El valor mínimo de concentración de glucosa ($0,932 \text{ g L}^{-1}$) se alcanza al segundo día de reacción.

Fuente: Elaboración propia

Para los efectos de cálculo del rendimiento de fermentación en el mosto fermentado proveniente de la fermentación alcohólica RBFE03, se utilizó el valor inicial correspondiente al mayor valor de la concentración de glucosa obtenida durante el proceso ($4,538 \text{ g L}^{-1}$) y el valor final correspondiente a la concentración de glucosa alcanzada al término del segundo día y medio de reacción ($1,572 \text{ g L}^{-1}$), tiempo a partir del cual dicho mosto (previamente filtrado) se sometió, inmediatamente, a su destilación por lote RBDE03.

4. Contenido de DQO y fenoles en las corrientes particulares de cada etapa del proceso

Como ya se mencionó anteriormente, durante la aplicación de cada pretratamiento en estudio (RBPE01, RBPE02 y RBPE03) y su posterior acondicionamiento (neutralización), hidrólisis enzimática,

fermentación alcohólica y destilación por lote, se tomaron los valores de la DQO y concentración de fenoles en las corrientes particulares de cada etapa del proceso:

- Pretratamiento: generación de hidrolizados hemicelulósicos.
- Acondicionamiento (neutralización): generación de hidrolizados hemicelulósicos acondicionados.
- Hidrólisis enzimática: generación de hidrolizados enzimáticos.
- Fermentación alcohólica: generación de mostos fermentados.
- Destilación por lote: generación de vinazas.

En las figuras 24 y 25 se puede apreciar el comportamiento y la tendencia de la DQO y concentración de fenoles, respectivamente, en las corrientes particulares de cada etapa del proceso según el pretratamiento aplicado.

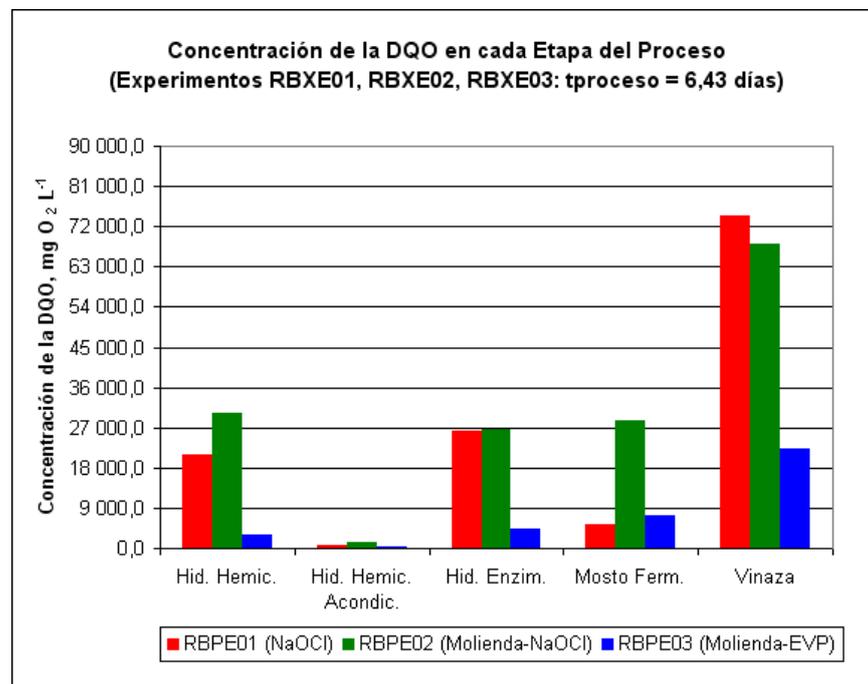


Figura 24. Comportamiento y tendencia de la DQO en las corrientes particulares de cada etapa del proceso según el pretratamiento aplicado.

Fuente: Elaboración propia

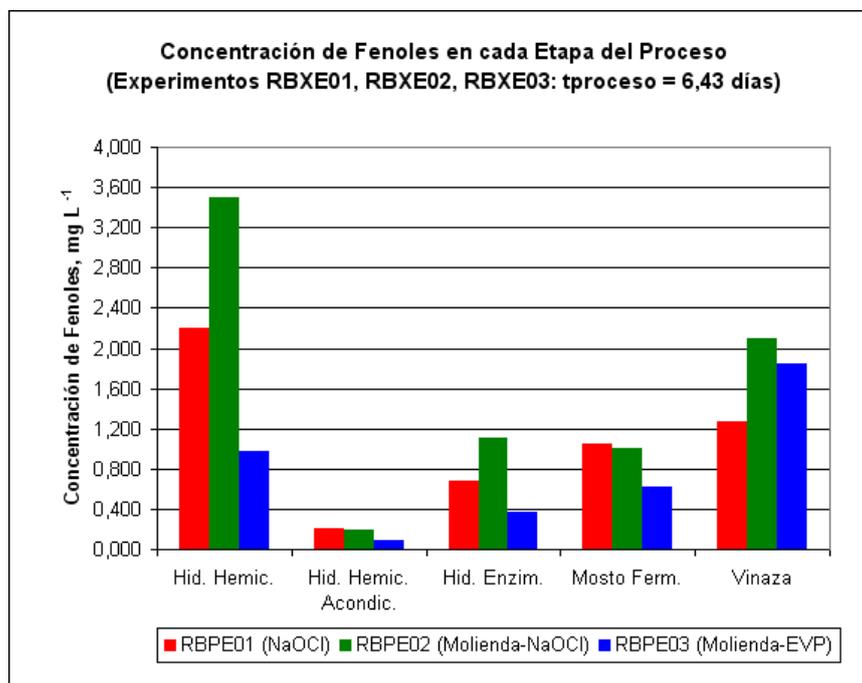


Figura 25. Comportamiento y tendencia de la concentración de fenoles en las corrientes particulares de cada etapa del proceso según el pretratamiento aplicado.

Fuente: Elaboración propia

5. Contenido de glucosa durante la generación de hidrolizados enzimáticos y mostos fermentados

Cada pretratamiento particular aplicado (RBPE01, RBPE02 y RBPE03) conlleva a diferentes cantidades de glucosa durante la hidrólisis enzimática, lo cual genera en parte distintas curvas de su consumo por cepas de gran potencial alcoholero de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante su transformación a etanol en la fermentación alcohólica.

Las figuras 26 y 27 muestran en resumen el seguimiento de la concentración de glucosa durante la generación de hidrolizados enzimáticos y mostos fermentados, respectivamente, según el pretratamiento aplicado.

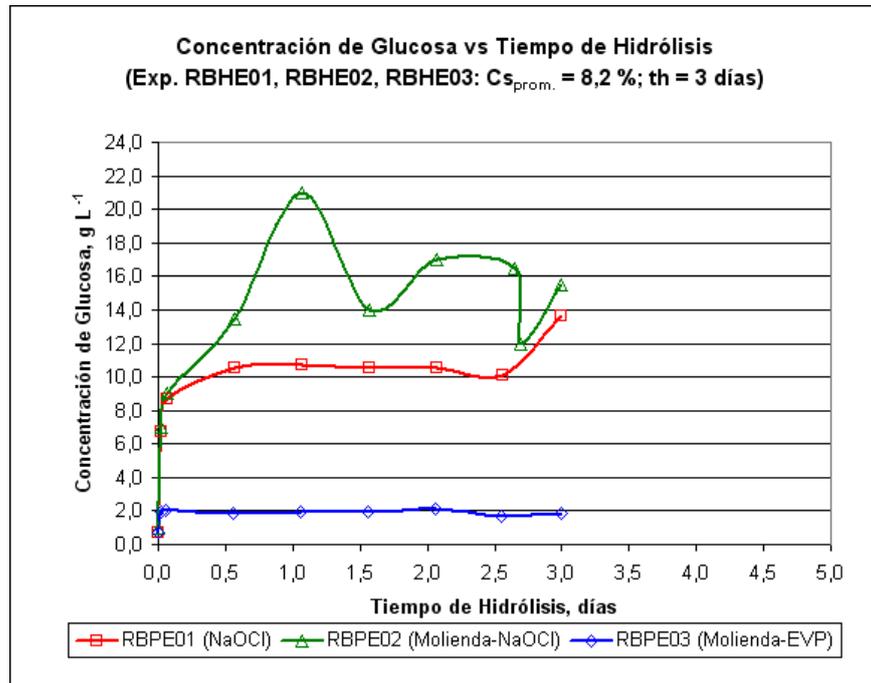


Figura 26. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la generación de hidrolizados enzimáticos según el pretratamiento aplicado.

Fuente: Elaboración propia

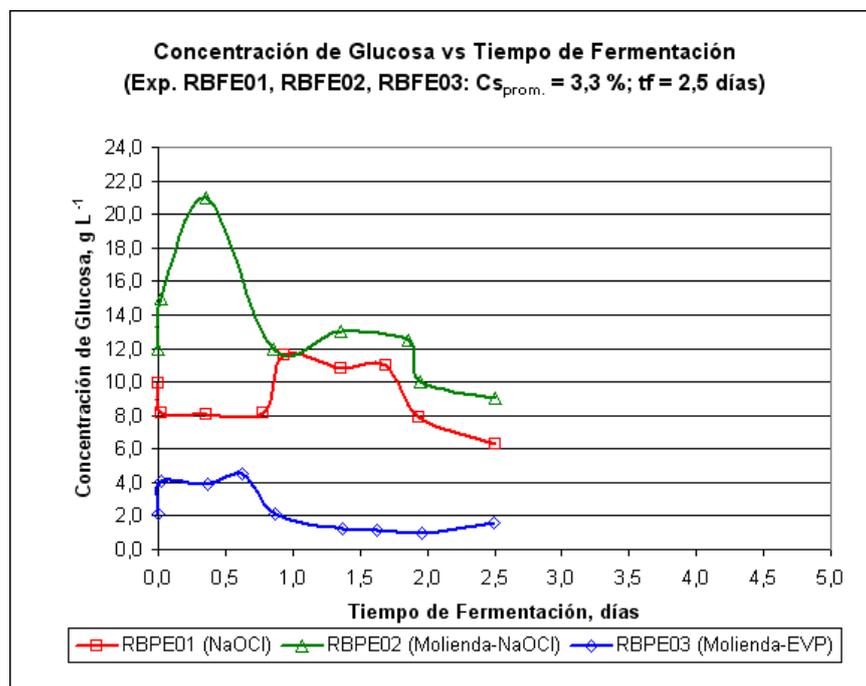


Figura 27. Seguimiento de la concentración de glucosa durante la generación de mostos fermentados según el pretratamiento aplicado.

Fuente: Elaboración propia

6. Contenido de etanol y grado alcohólico en mostos fermentados

El contenido de etanol y grado alcohólico en mostos fermentados está directamente relacionado con la eficiencia de conversión de celulosa a glucosa durante la hidrólisis enzimática y de glucosa a etanol durante la fermentación alcohólica. Estos indicadores, a su vez, dependen, exclusivamente, de cada pretratamiento particular aplicado (RBPE01, RBPE02 y RBPE03).

Los valores del máximo volumen recuperado de etanol y del grado alcohólico en mostos fermentados, provenientes de cada uno de los pretratamientos aplicados, se sintetizan en las figuras 28 y 29.

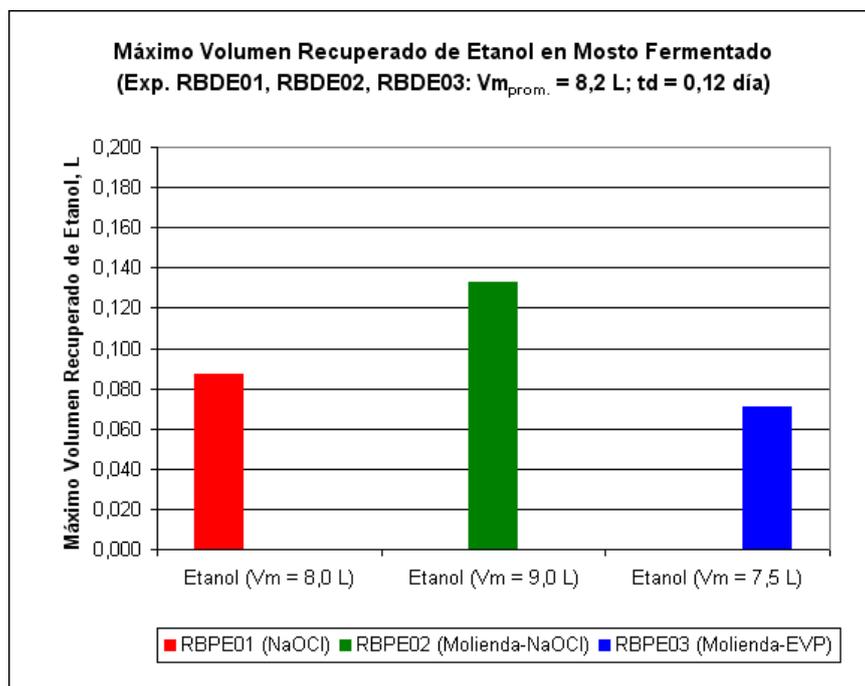


Figura 28. Máximo volumen recuperado de etanol en mostos fermentados según el pretratamiento aplicado.

Fuente: Elaboración propia

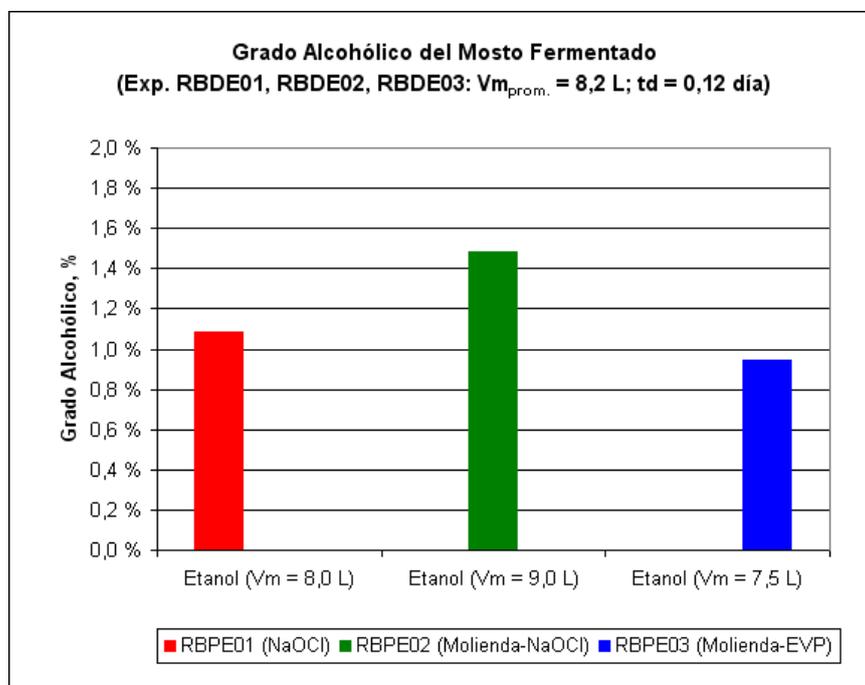


Figura 29. Grado alcohólico en mostos fermentados según el pretratamiento aplicado.

Fuente: Elaboración propia

VI. DISCUSIÓN

1. Análisis de DQO y concentración de fenoles en hidrolizados hemicelulósicos y enzimáticos (comparación de pretratamientos)

La aplicación del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 al aserrín de capirona acondicionado durante la etapa inicial del proceso de producción de bioetanol reporta los valores más bajos de la DQO y concentración de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico ($3\ 108\ \text{mg O}_2\ \text{L}^{-1}$ y $0,976\ \text{mg L}^{-1}$, respectivamente) y enzimático ($4\ 256\ \text{mg O}_2\ \text{L}^{-1}$ y $0,376\ \text{mg L}^{-1}$, respectivamente) respecto a los otros dos pretratamientos que involucran la utilización del NaOCl, el cual es uno de los tantos químicos convencionalmente aplicados en esta etapa preliminar del proceso.

Tomando en cuenta el pretratamiento químico referencial RBPE01 (línea base), el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 logra reducir la DQO en un 85 % en el hidrolizado hemicelulósico y en un 84 % en el hidrolizado enzimático, así como también disminuye la concentración de fenoles en un 56 % en el hidrolizado hemicelulósico y en un 45 % en el hidrolizado enzimático.

Tomando en cuenta el pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02, el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 logra reducir la DQO en un 90 % en el hidrolizado hemicelulósico y en un 84 % en el hidrolizado enzimático, así como también disminuye la concentración de fenoles en un 72 % en el hidrolizado hemicelulósico y en un 66 % en el hidrolizado enzimático.

Tanto el pretratamiento químico referencial RBPE01 como el pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 reportan los valores más altos de la DQO ($25\ 554\ \text{mg O}_2\ \text{L}^{-1}$, en

promedio) y concentración de fenoles ($2,85 \text{ mg L}^{-1}$, en promedio) en el hidrolizado hemicelulósico.

Para todos los casos de pretratamiento aplicados, el acondicionamiento de los hidrolizados hemicelulósicos por medio de una decantación simple del líquido concentrado y un lavado con agua osmotizada y posterior filtración (a través de una malla de $53 \mu\text{m}$ de abertura) del sólido pretratado, resultó ser una etapa crucial del proceso al lograrse la reducción promedio del 94 % de la DQO y del 92 % de la concentración de fenoles de los hidrolizados hemicelulósicos, garantizando así una disminución de los contaminantes que podrían interferir o mezclarse con el complejo enzimático celulasa durante la hidrólisis enzimática.

Asimismo, para todos los casos de pretratamiento aplicados, al finalizar la hidrólisis enzimática se evidencia un aumento entre 13 y 46 veces de la DQO y entre 2 y 5 veces de la concentración de fenoles de los hidrolizados hemicelulósicos acondicionados, lo cual pone de manifiesto la existencia mayoritaria aún de contaminantes que podrían interferir o mezclarse con la levadura alcoholera (*Saccharomyces cerevisiae*) durante la fermentación alcohólica.

En líneas generales, al finalizar la fermentación alcohólica se observa una tendencia promedio de aumento en la DQO y concentración de fenoles, lo cual constata la permanencia de dichos contaminantes y su posible contribución negativa en el análisis del rendimiento de fermentación que se detalla más adelante.

Finalmente, las vinazas obtenidas en todos los casos de pretratamiento aplicados reportan valores de la DQO que oscilan entre 22 000 y 75 000 $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ y valores de la concentración de fenoles que fluctúan entre 1,1 y $2,1 \text{ mg L}^{-1}$, corrientes finales que deberán ser canalizadas en un área de tratamiento de efluentes de la planta con la finalidad de lograr la disminución de estos dos

parámetros ambientales a valores inferiores a los estándares nacionales de calidad ambiental para agua respectivos, según el Decreto Supremo (D. S.) N° 002-2008-MINAM que señala un valor de $10 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ para el caso de la DQO correspondiente a la categoría 1, subcategoría A1, y un valor de $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ para el caso de la concentración de fenoles correspondiente a la categoría 3.

2. Análisis del rendimiento de sacarificación en hidrolizados enzimáticos (comparación de pretratamientos)

La aplicación del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 al aserrín de capirona acondicionado durante la etapa inicial del proceso de producción de bioetanol reporta el valor más bajo de rendimiento de sacarificación en el hidrolizado enzimático (5,1 %) con respecto al pretratamiento químico referencial RBPE01 (33,7 %) y al pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 (34,7 %).

El rendimiento de sacarificación en el hidrolizado enzimático proveniente del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 con respecto al rendimiento correspondiente a partir del pretratamiento químico referencial RBPE01 es 6,6 veces menor, esto se debe a la alta efectividad oxidativa del hipoclorito de sodio que permite un mayor ataque al material lignocelulósico, degradando la lignina, hemicelulosa y celulosa, así como a la limitada temperatura de operación (presión) alcanzada en el equipo de explosión en vapor por las características propias de la caldera APIN de 80 BHP. Esta misma explicación justifica que el rendimiento de sacarificación en el hidrolizado enzimático del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 sea 6,8 veces menor al rendimiento correspondiente a partir del pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02.

Asimismo, el rendimiento de sacarificación en el hidrolizado enzimático proveniente del pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 con respecto al rendimiento correspondiente a partir del pretratamiento químico referencial RBPE01, en los cuales se utiliza una concentración cercana de hipoclorito de sodio para ambos casos con un promedio de $0,5047 \text{ mol L}^{-1}$, es 1 % mayor. Esto se explica, principalmente, por la despolimerización sustancial de la lignina (escisión de enlaces aril éter no condensados) y la reducción del tamaño de las partículas del aserrín de capirona acondicionado (aumento de su superficie de contacto) que se logra por la acción mecánica de la molienda de bolas, lo cual facilita el posterior pretratamiento fisicoquímico catalizado y da lugar a una mejor digestibilidad enzimática del glucano a glucosa.

3. Análisis del rendimiento de fermentación en mostos fermentados (comparación de pretratamientos)

La aplicación del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 al aserrín de capirona acondicionado durante la etapa inicial del proceso de producción de bioetanol reporta también el valor más bajo de rendimiento de fermentación en el mosto fermentado (7,1 %) con respecto al pretratamiento químico referencial RBPE01 (10,6 %) y al pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 (24,2 %).

El rendimiento de fermentación en el mosto fermentado proveniente del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 con respecto al rendimiento correspondiente a partir del pretratamiento químico referencial RBPE01 es tan sólo 1,5 veces menor (se debería esperar una diferencia más amplia debido al mayor rendimiento de sacarificación entre ambos pretratamientos), lo cual se explica por los valores mucho menores de la DQO y concentración de fenoles en los hidrolizados enzimáticos del

pretratamiento propuesto que están directamente relacionados con una baja inhibición del crecimiento y la acción fermentativa de las levaduras para dicho pretratamiento. Este mismo fundamento justifica que el rendimiento de fermentación en el mosto fermentado del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 sea 3,4 veces menor al rendimiento correspondiente a partir del pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02.

Asimismo, el rendimiento de fermentación en el mosto fermentado proveniente del pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 con respecto al rendimiento correspondiente a partir del pretratamiento químico referencial RBPE01, en los cuales los valores de la DQO y concentración de fenoles en los hidrolizados enzimáticos son altos y muy cercanos para ambos casos (dando lugar a una misma alta inhibición del desempeño de las levaduras) con un promedio de 26 386 mg O₂ L⁻¹ y 0,9 mg L⁻¹, respectivamente, es 2,3 veces mayor. Dicho resultado se explica, principalmente, por la mejora adicional de la solubilidad y eficiencia fermentativa que se logra por la aplicación mecánica de la molienda de bolas sobre el aserrín de capirona acondicionado, a pesar de la alta presencia de subproductos no deseados en el hidrolizado hemicelulósico y enzimático que caracteriza al pretratamiento opcional.

4. Análisis del contenido de etanol y grado alcohólico en mostos fermentados (comparación de pretratamientos)

La aplicación del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 al aserrín de capirona acondicionado durante la etapa inicial del proceso de producción de bioetanol reporta, igualmente, el valor más bajo de contenido de etanol y grado alcohólico en el mosto fermentado (0,071 L y 0,9 %, respectivamente) respecto al pretratamiento químico referencial RBPE01 (0,087 L y

1,1 %, respectivamente) y al pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 (0,133 L y 1,5 %, respectivamente).

El contenido de etanol y grado alcohólico en el mosto fermentado proveniente del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 con respecto a sus valores correspondientes a partir del pretratamiento químico referencial RBPE01 es 1,2 y 1,1 veces menor, respectivamente, lo cual se explica por el menor rendimiento de fermentación en el mosto fermentado alcanzado por dicho pretratamiento propuesto. Esta misma lógica permite entender que el contenido de etanol y grado alcohólico en el mosto fermentado proveniente del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 sea 1,9 y 1,6 veces menor, respectivamente, a sus valores correspondientes a partir del pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02.

Asimismo, el contenido de etanol y grado alcohólico en el mosto fermentado proveniente del pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 con respecto a sus valores correspondientes a partir del pretratamiento químico referencial RBPE01 es 1,5 y 1,4 veces mayor, respectivamente, lo cual se verifica también por el mayor rendimiento de fermentación en el mosto fermentado alcanzado por dicho pretratamiento opcional.

El contenido de etanol experimental en el mosto fermentado proveniente del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 representa el 20 % de su valor teórico, a comparación de los valores respectivos alcanzados a partir del pretratamiento químico referencial RBPE01 (22 %) y el pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 (30,4 %).

Finalmente, cabe señalar que el grado alcohólico experimental en el mosto fermentado proveniente del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 representa el 34,7 %

de su valor teórico, a comparación de los valores respectivos alcanzados a partir del pretratamiento químico referencial RBPE01 (33 %) y el pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 (45,9 %).

VII. CONCLUSIONES

1. El pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 resultó ser una excelente alternativa para reducir los valores de la DQO y concentración de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico en un 85 y 56 %, respectivamente, respecto al pretratamiento químico referencial RBPE01, resultando un rendimiento de sacarificación (porcentaje de obtención de azúcares) 6,6 veces menor y un consecuente rendimiento de fermentación (porcentaje de transformación de azúcares) tan sólo 1,5 veces menor debido a la disminución de los contaminantes que inhiben el crecimiento y la acción fermentativa de las levaduras.
2. El pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 logró también reducir los valores de la DQO y concentración de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico en un 90 y 72 %, respectivamente, respecto al pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02, resultando un rendimiento de sacarificación (porcentaje de obtención de azúcares) 6,8 veces menor y un consecuente rendimiento de fermentación (porcentaje de transformación de azúcares) 3,4 veces menor, lo cual significa una mayor diferencia de rendimiento de fermentación en el mosto fermentado que la calculada para el caso del pretratamiento químico referencial RBPE01, incremento resultante debido a la aplicación mecánica de la molienda de bolas en el pretratamiento opcional (mejora de la solubilidad y eficiencia fermentativa) a pesar de la presencia de subproductos no deseados en su hidrolizado hemicelulósico correspondiente.
3. Si bien es cierto que el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 del aserrín de capirona acondicionado redujo los valores de la DQO y concentración de fenoles en el hidrolizado hemicelulósico más que las técnicas de pretratamiento convencional aplicadas RBPE01 y RBPE02 (caracterizadas por la

utilización de químicos), estos parámetros ambientales no lograron ser inferiores a los estándares nacionales de calidad ambiental para agua respectivos, según el Decreto Supremo (D. S.) N° 002-2008-MINAM que señala un valor de 10 mg O₂ L⁻¹ para el caso de la DQO correspondiente a la categoría 1, subcategoría A1, y un valor de 0,001 mg L⁻¹ para el caso de la concentración de fenoles correspondiente a la categoría 3.

4. La operación de pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 consistió en el empleo de un molino de bolas seguido de una explosión en vapor, lográndose de esta manera la degradación de la hemicelulosa y transformación de la lignina (contenidas en la biomasa) por las altas temperaturas, así como la accesibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática. Específicamente, el lote de aserrín de capirona acondicionado fue pulverizado a temperatura ambiente por 5 minutos en el molino de bolas, para luego ser descompuesto con vapor saturado a 152 °C (5 bar) por 2 minutos en el equipo de explosión en vapor.
5. El acondicionamiento de los hidrolizados hemicelulósicos por medio de una decantación simple del líquido concentrado y un lavado con agua osmotizada y posterior filtración (a través de una malla de 53 µm de abertura) del sólido pretratado para todos los casos de pretratamiento aplicados (RBPE01, RBPE02 y RBPE03), resultó ser una etapa crucial del proceso al lograrse la reducción promedio del 94 % de la DQO y del 92 % de la concentración de fenoles de los hidrolizados hemicelulósicos, garantizando así una disminución de los contaminantes que interfieren o se mezclan con el complejo enzimático celulasa y, en líneas generales, un relativamente buen rendimiento de sacarificación durante la hidrólisis enzimática.
6. Para todos los casos de pretratamiento aplicados (RBPE01, RBPE02 y RBPE03), al finalizar la hidrólisis enzimática y la fermentación alcohólica se observa una tendencia promedio de aumento en la

DQO y concentración de fenoles, todo lo cual pone de manifiesto la existencia y permanencia mayoritaria aún de dichos contaminantes que afectan directamente el desempeño de la levadura alcoholera (*Saccharomyces cerevisiae*) durante la fermentación alcohólica (inhibición del crecimiento y la acción fermentativa de la levadura alcoholera), no llegándose a superar, en el mejor de los casos, el 25 % del rendimiento de fermentación ni el 1,5 % del grado alcohólico en el mosto fermentado (46,4 % de su valor teórico), consecuentemente. Sin embargo, se resalta el efecto positivo de la aplicación de la molienda de bolas (pretratamiento mecánico) y de la disminución de los subproductos no deseados en el hidrolizado hemicelulósico por la utilización de la explosión en vapor (pretratamiento fisicoquímico no catalizado) como técnicas de pretratamiento claves para mejorar dichos indicadores productivos y el desempeño ambiental favorable de todo el proceso. En ese contexto, el grado alcohólico en el mosto fermentado obtenido como consecuencia de la aplicación del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03 resultó ser únicamente 1,1 veces menor al valor correspondiente resultante del pretratamiento químico referencial RBPE01 y 1,6 veces menor al del pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02.

7. El análisis y evaluación de los dos parámetros ambientales elegidos, menciónese tanto la DQO como la concentración de fenoles, fueron indicadores ambientales apropiados para la comparación de los subproductos no deseados generados en los hidrolizados hemicelulósicos (derivados de furanos, ácidos débiles y compuestos fenólicos) a partir de la aplicación de los diferentes pretratamientos en estudio (RBPE01, RBPE02 y RBPE03).
8. El pretratamiento químico referencial RBPE01 del aserrín de capirona acondicionado permitió contar con una línea base de los valores de la DQO ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) y concentración de fenoles (mg L^{-1}) en los hidrolizados hemicelulósicos, con la finalidad de poder comparar y

establecer el porcentaje de reducción de la contaminación lograda por medio de la aplicación del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03, teniendo en cuenta que dichos parámetros ambientales no se reportan cuantitativamente en la literatura revisada.

9. Se logró definir y estandarizar un proceso general para la obtención de bioetanol hidratado a partir del aserrín de capirona, implicando una visión global de las operaciones de pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación alcohólica y destilación, basadas en el estado del arte existente a nivel mundial y con tecnología nacional adecuada, acorde a la realidad peruana actual.

10. Un análisis económico y financiero preliminar que considera una producción de bioetanol hidratado (asumiendo un 90 % de rendimiento de sacarificación y fermentación) de 206 mil barriles por año y cogeneración de energía eléctrica con el aserrín remanente, aplicando el pretratamiento químico referencial RBPE01 o el pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02, refleja que, a pesar de ser el hipoclorito de sodio industrial un reactivo químico de muy buena efectividad oxidativa y bajo costo (56,8 US\$ bbl⁻¹ NaOCl), no llegaría a ser un proyecto rentable económica ni financieramente en 10 años de vida útil por las grandes cantidades industriales que se requerirían (5,4 millones de barriles de NaOCl por año, en promedio) bajo las mismas condiciones de estudio en las cuales el ataque químico resultante promedio al aserrín de capirona acondicionado (pulverizado o no) es del 3,8 % (Crp). Para que el proyecto pueda ser rentable económica y financieramente, se deberían llegar a demostrar rendimientos de sacarificación / fermentación y grados alcohólicos experimentales mayores a los obtenidos en este trabajo pero, esta vez, mediante la aplicación de un ataque químico resultante promedio a la materia prima del 0,2 % (19 veces menor) y de un ataque enzimático del sólido pretratado caracterizado por un aumento en la concentración del complejo

enzimático celulasa hasta de 3 ó 4 veces respecto al valor usado en esta tesis. En el mayor escenario, el costo unitario de producción de bioetanol hidratado considerando el pretratamiento químico referencial RBPE01 (contempla un aumento de 4 veces en la concentración del complejo enzimático celulasa) sería de 69,5 US\$ bbl⁻¹ Bioetanol con una inversión total de 18,4 millones de dólares; asimismo, el costo unitario de producción de bioetanol hidratado considerando el pretratamiento mecánico-fisicoquímico catalizado opcional RBPE02 (contempla un aumento de 3 veces en la concentración del complejo enzimático celulasa) sería de 67,3 US\$ bbl⁻¹ Bioetanol con una inversión total de 20,2 millones de dólares.

11. Contrariamente, un análisis económico y financiero preliminar que considera una producción de bioetanol hidratado (asumiendo un 90 % de rendimiento de sacarificación y fermentación) de 206 mil barriles por año y cogeneración de energía eléctrica con el aserrín remanente, aplicando el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03, refleja que sí llegaría a ser un proyecto rentable económica y financieramente en 10 años de vida útil pero bajo condiciones principales mejoradas en las cuales el ataque fisicoquímico no catalizado al aserrín de capirona acondicionado pulverizado se lleve a cabo usando vapor saturado a 195 °C (14 bar) por 2 minutos en un equipo de explosión en vapor apropiado y el ataque enzimático del sólido pretratado se caracterice por un aumento en la concentración del complejo enzimático celulasa hasta de 3 veces respecto al valor usado en esta tesis. En el mayor escenario, el costo unitario de producción de bioetanol hidratado sería de 83,1 US\$ bbl⁻¹ Bioetanol con una inversión total de 23,8 millones de dólares.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Las vinazas obtenidas en todos los casos de pretratamiento aplicados (RBPE01, RBPE02 y RBPE03) reportan valores de DQO que oscilan entre 22 000 y 75 000 mg O₂ L⁻¹ y valores de concentración de fenoles que fluctúan entre 1,1 y 2,1 mg L⁻¹, corrientes finales que deberán ser canalizadas en el área de tratamiento de efluentes dentro de una planta industrial con la finalidad de lograr la disminución de estos dos parámetros ambientales a valores inferiores a los estándares nacionales de calidad ambiental para agua respectivos, según el Decreto Supremo (D. S.) N° 002-2008-MINAM.
2. Considerar la fermentación de la xilosa que se encuentra concentrada en la parte líquida de los hidrolizados hemicelulósicos (contienen también algo más de glucosa) después de cada pretratamiento aplicado (RBPE01, RBPE02 y RBPE03), por medio de la levadura específica *Pichia stipitis*, con la finalidad de aumentar el contenido de etanol y grado alcohólico en los mostos fermentados.
3. Durante el pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03, el aserrín de capirona acondicionado pulverizado fue descompuesto con vapor saturado a 152 °C (5 bar) por 2 minutos en el equipo de explosión en vapor, temperatura de operación (presión) condicionada por las características propias de la caldera APIN de 80 BHP utilizada. Sin embargo, para lograr un mayor contenido de etanol y grado alcohólico en los mostos fermentados mediante dicha producción más limpia, se sugiere y justifica realizar un estudio posterior detallado con calderas de mayor potencia que considere no sólo la optimización de los dos factores claves que gobiernan la explosión en vapor (el tiempo de residencia y la temperatura), sino también la evaluación del consecuente aumento en la DQO y concentración de fenoles en los hidrolizados hemicelulósicos, de tal manera que éstos parámetros ambientales no se acerquen (por mucho) a sus valores respectivos provenientes de

los pretratamientos aplicados convencionalmente (referencial / opcional), caracterizados por el empleo de químicos, garantizándose así que no se inhiba altamente el desempeño de las levaduras durante la fermentación alcohólica y se obtenga, por lo tanto, un mayor rendimiento de fermentación mediante la aplicación mejorada del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado propuesto RBPE03.

4. Para el análisis del tiempo de residencia (o tiempo de retención) durante la operación de explosión en vapor, se debe considerar su influencia en el grado de hidrólisis de la hemicelulosa por los ácidos orgánicos formados durante el “humedecimiento” de la materia prima y cómo éste fenómeno puede ser determinante en la generación de subproductos de degradación, los cuales deben ser reducidos ya que perjudican el rendimiento de fermentación aguas abajo del proceso.
5. Para la evaluación de la temperatura durante la operación de explosión en vapor, se debe tener en cuenta que ésta regula la presión del vapor dentro del reactor, la cual además de poder influir en el grado de hidrólisis de la hemicelulosa también es directamente proporcional a la fuerza de cizallamiento de la humedad (condensada dentro de la estructura) que se evapora instantáneamente debido a la disminución repentina de la presión (diferencial de presión), pudiendo ser este fenómeno determinante en un cierto grado de hidrólisis de las regiones amorfas de la celulosa (condiciones extremas) y en la promoción de la degradación de la xilosa a furfural y de la glucosa al HMF (condiciones excesivas), subproductos que también deben ser reducidos ya que inhiben el crecimiento microbiano, afectando proporcionalmente el rendimiento de fermentación.
6. Realizar un estudio de pre-factibilidad para instalar una planta industrial de producción de bioetanol (hidratado o anhidro) a partir del aserrín de capirona con pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado (producción más limpia), considerando el secado y uso del

aserrín remanente (aserrín acondicionado pretratado que se pierde durante el lavado y filtrado del sólido del hidrolizado hemicelulósico, y aserrín final que no se transforma) en calderas industriales apropiadas, la instalación de turbinas para la cogeneración de energía eléctrica y el pretratamiento de la vinaza, subproducto de los procesos de destilación y rectificación, con la finalidad de reutilizar el agua en el proceso o disponerla adecuadamente.

7. Evaluar la aplicación del pretratamiento mecánico-fisicoquímico no catalizado al aserrín proveniente de las otras nuevas especies maderables (shihuahuaco, pumaquiro, congona (machinga), aguano masha, andiroba y cachimbo), así como también a otros materiales lignocelulósicos diferentes del aserrín (cáscara de uva, cáscara de café, cáscara de arroz, bagazo, etc.), con la finalidad de realizar numerosos estudios de pre-factibilidad para instalar diversas plantas industriales de producción de bioetanol (hidratado o anhidro) a partir de todas estas materias primas considerando dicha producción más limpia, según la evaluación de sus disponibilidades en las diferentes regiones del Perú.

IX. GLOSARIO DE TÉRMINOS

1. Vocabulario técnico

Aserrín: Es el desperdicio del proceso de aserrado de la madera, como el que se produce en un aserradero. Informalmente, se le conoce también como "colochó" por la forma ondulada que tiene.

Azeótropo: Mezcla líquida de dos o más componentes que posee un único punto de ebullición constante y fijo, la cual al pasar a la fase vapor o gas se comporta como un compuesto puro, adquiriendo propiedades tal como si fuese un solo componente.

Beta-glucano: Es un polisacárido de monómeros de D-glucosa, ligados con enlaces glucosídicos. Debido a que este carbohidrato (polisacárido) está formado a partir de monosacáridos, son reversibles a estos últimos por hidrólisis ácida o enzimática.

Beta-glucosidasa (celobiasa): Exocelulasa con especificidad por distintos sustratos beta-D-glucósidos. Cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reductores en los beta-D-glucósidos con liberación de glucosa.

Biodegradación: Degradación o descomposición molecular de una sustancia orgánica mediante la acción compleja de los organismos vivos (específicamente por bacterias).

Bioetanol: Es un tipo de biocombustible o biocombustible, el cual se produce de la fermentación de cultivos agrícolas que contienen azúcares, almidones o celulosa que por sus características físico-químicas resulta adecuado para su mezcla con la gasolina en proporciones variables dentro del marco legal, conocida como gasohol.

Biomasa: Cantidad de materia orgánica que hay por unidad de volumen o unidad de superficie en un ecosistema.

Celobiohidrolasa (β -1,4-glucano-celobiohidrolasa): Enzima que degrada la celulosa a celobiosa.

Celobiosa: Es un azúcar doble (disacárido) formado por dos glucosas unidas por los grupos hidroxilo del carbono 1 en posición beta de una glucosa y del carbono 4 de la otra glucosa. Por ello, este compuesto también se llama β -D-glucopiranosil (1-4) β -D-glucopiranososa. Al producirse dicha unión, se desprende una molécula de agua y ambas glucosas quedan unidas mediante un oxígeno monocarbonílico que actúa como puente. La celobiosa aparece en la hidrólisis de la celulosa. Su fórmula es $C_{12}H_{22}O_{11}$. Se caracteriza por ser reductor.

Células: Unidad fundamental (anatómica y fisiológica) en la organización de los seres vivos. Morfológicamente se define como un volumen de citoplasma rodeado de una membrana citoplasmática, que contiene en su interior un núcleo y diversos orgánulos estructuralmente definidos. Las células pueden presentarse aisladas (seres unicelulares) o asociadas a otras (seres pluricelulares).

Celulasa: Es una enzima compleja especializada en descomponer celulosa, transformándola en múltiples monómeros de glucosa. Es producida con leves diferencias químicas por los integrantes del reino de los hongos y el de las bacterias, los cuales son los mayores descomponedores del planeta.

Celulosa: Es un biopolímero compuesto exclusivamente de moléculas de β -glucosa (desde cientos hasta varios miles de unidades), es pues un homopolisacárido. La celulosa es la biomolécula orgánica más abundante, ya que forma la mayor parte de la biomasa terrestre.

Cepa: Conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Endoglucanasa (endo 1,4- β -glucanasa): Es la enzima más abundante en el hongo *Trichoderma reesei*, comprendido entre el 5 y 10 % de la suma total de las celulasas producidas por este microorganismo. Rompe los enlaces transversales entre las cadenas de la celulosa.

Enzimas: Son grandes moléculas proteínicas que catalizan todas las reacciones interrelacionadas en una célula viva. Para cada reacción química hay una enzima distinta que cataliza la reacción en la célula.

Esterilización: Destrucción gradual de la vida bacteriana mediante un incremento en la temperatura por sobre 85 °C.

Etanol: Compuesto químico conocido como alcohol etílico, es un alcohol que se presenta como un líquido incoloro, volátil e inflamable con un punto de ebullición de 78 °C. Mezclable con agua en cualquier proporción; a la concentración de 96,5 % en volumen se forma una mezcla azeotrópica. El etanol que se produce a partir de la biomasa, se denomina bioetanol.

Glucosa: Es un monosacárido con fórmula empírica $C_6H_{12}O_6$, la misma que la fructosa pero con diferente posición relativa de los grupos [-OH] y [O=]. Es una hexosa (contiene 6 átomos de carbono) y es el principal azúcar reductor que se considera para los análisis de hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica en la presente tesis.

Hidrólisis: Es una reacción química entre el agua y otra sustancia.

Incubación: Almacenamiento de cultivos en condiciones adecuadas.

Inoculación: Acción o efecto de agregar un inóculo en un recipiente adecuado para llevar a cabo transformaciones biotecnológicas.

Inóculo: Suspensión de microorganismos vivos que se han adaptado para reproducirse en un medio específico.

Levaduras: Son hongos y se distinguen de los mohos por ser unicelulares; vistos al microscopio, aparecen como pequeñas células redondeadas u ovoides. La rapidez con que se multiplican se asemeja a las bacterias, pero en realidad, se trata de hongos microscópicos de los que hay muchísimos géneros que poseen muchas de las propiedades de las células de organismos superiores (eucariontes). La mayoría de las levaduras utilizadas por el hombre pertenecen al género *Saccharomyces*, literalmente “hongo del azúcar”. Para los biotecnólogos, las levaduras son seres vivos que combinan propiedades de las bacterias (velocidad de multiplicación, simplificación de sus exigencias nutritivas) y propiedades de los organismos superiores.

Vinaza: Subproducto líquido de las columnas de destilación y rectificación del proceso de bioetanol hidratado.

2. Locuciones técnicas

Azúcares reductores: Son aquellos azúcares que poseen su grupo funcional carbonilo intacto, lo cual les confiere el carácter de agentes reductores cuando reaccionan con otras moléculas. Todos los monosacáridos son azúcares reductores, ya que al menos tienen un [-OH] hemiacetálico libre.

Bioetanol anhidro: Es un tipo de biocarburante o biocombustible, el cual se produce de la fermentación de cultivos agrícolas que contienen azúcares, almidones o celulosa que por sus características físico-químicas resulta adecuado para su mezcla con la gasolina en

proporciones variables dentro del marco legal, conocida como gasohol.

Bioetanol hidratado: Es un tipo de biocarburante o biocombustible, adecuado para sustituir a la gasolina de manera total o utilizarlo como insumo en la producción de biodiésel, ETBE (etil ter-butyl éter), alcohol antiséptico y bioetanol anhidro.

Fermentación alcohólica: Proceso a través del cual se produce la conversión de los azúcares reductores en etanol por medio de la inoculación controlada de levaduras (hongos unicelulares de la especie *Saccharomyces cerevisiae*).

Hidrólisis enzimática: Proceso a través del cual se produce la conversión de la celulosa en azúcares reductores por medio de la inoculación controlada de enzimas específicas (hongos producidos, mayormente, a partir de la especie *Trichoderma reesei*, de los cuales se obtiene básicamente una mezcla de celobiohidrolasas y endoglucanasas).

Hidrolizado hemicelulósico: Es la corriente o flujo que se obtiene después del pretratamiento del material lignocelulósico acondicionado.

Hidrolizado enzimático: Es la corriente o flujo que se obtiene después de la hidrólisis enzimática del hidrolizado hemicelulósico.

Material lignocelulósico: Cualquier tipo de material resultante de los procesos económicos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento, cuya calidad sea de tal naturaleza que no permita usarlo nuevamente en el proceso que lo generó.

Material lignocelulósico acondicionado: Material lignocelulósico preparado para el pretratamiento posterior, a través de la estandarización (homogenización) de su granulometría.

Mosto fermentado: Es la corriente o flujo que se obtiene después de la fermentación alcohólica del hidrolizado enzimático.

Pruebas experimentales: Ensayos de investigación realizados en el laboratorio.

Rendimiento de fermentación: Porcentaje de transformación (conversión) de azúcares reductores en etanol (entendido también como el porcentaje de obtención de etanol) durante la fermentación alcohólica.

Rendimiento de sacarificación: Porcentaje de obtención de azúcares reductores (entendido también como el porcentaje de transformación (conversión) de celulosa en azúcares reductores) durante la hidrólisis enzimática.

X. LITERATURA CITADA

1. Godliving Y. S. Mtui, "Trends in industrial and environmental biotechnology research in Tanzania". *African Journal of Biotechnology* 6 (25): 2860 - 2867, 28 December, 2007.
2. Godliving Y. S. Mtui, "Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products". *African Journal of Biotechnology* 8 (8): 1398 - 1415, 20 April, 2009.
3. A. N. Moneke, B. N. Okolo, A. I. Nweke, L. I. Ezeogu and F. S. Ire, "Selection and characterisation of high ethanol tolerant *Saccharomyces* yeasts from orchard soil". *African Journal of Biotechnology* 7 (24): 4567 - 4575, 17 December, 2008.
4. Kim Olofsson, Magnus Bertilsson and Gunnar Lidén, "A short review on SSF - An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks". *Journal of Biotechnology for Biofuels* 1 (7), 2008.
5. Lynd L. R., "Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy". *Annu. Rev. Energy Environ.* 21: 403 - 465, 1996.
6. Claassen P. A. M., van Lier J. B., López Contreras A. M., van Niel E. W. J., Sijtsma L., Stams A. J. M., de Vries S. S. and Weusthuis R. A., "Utilization of biomass for the supply of energy carriers". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 741 - 755, 1999.
7. Hiroyuki Inoue, Shinichi Yano, Takashi Endo, Tsuyoshi Sakaki and Shigeki Sawayama, "Combining hot-compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus". *Journal of Biotechnology for Biofuels* 1 (2), 2008.

8. Ayako Endo, Toshihide Nakamura, Akira Ando, Ken Tokuyasu and Jun Shima, "Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Biotechnology for Biofuels* 1 (3), 2008.
9. Jan B Kristensen, Lisbeth G Thygesen, Claus Felby, Henning Jørgensen and Thomas Elder, "Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production". *Journal of Biotechnology for Biofuels* 1 (5), 2008.
10. Peavy H. et al., "Environmental engineering". *McGraw-Hill, United States of America, 1985.*
11. Kirkwood R. C. and A. J. Longley, "Clean technology and the environment". *Blakie Academic and Professional Glasgow. United States of America, 1995.*
12. Cunningham W. P. and Saigo B. W., "Environmental science: a global concern (6th. edition)". *McGraw-Hill. New York, 2001.*
13. Kiely G., "Ingeniería ambiental: fundamentos, entornos, tecnología y sistemas de gestión". *Mc. Graw-Hill, España, 1999.*
14. Maurits J. W., "Threats to the world's water". *Scientific American* 261: 80 - 94, 1989.
15. Bertram G. K., "Farmacología básica clínica (3ra. edición)". *Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V.: 921, México, D. F., 1987.*
16. Mosby, "Mosby's medical and nursing dictionary". *The C. V. Mosby Company 1437, Ed. Laurence Urdang, USA, 1995.*

17. Consejería de Sanidad de la Región de Murcia (CSRM), "Riesgo químico: accidentes graves del fenol". *Dirección General de Salud Pública, Servicio de Sanidad Ambiental, Europa, 2007.*
18. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), "Toxicological profile for phenol". *Department of Health and Human Services (Public Health Service), USA, 2008.*
19. Institute for Health and Consumer Protection (IHCP), "European union risk assessment report, phenol CAS N° 108-95-2, EINECS N° 203-632-7". *European Communities, Italia, 2006.*
20. Kumaran P. and Paruchuri L., "Kinetics of phenol biotransformation". *Wat. Res. 31 (1): 11 - 22, 1997.*
21. BASF Chemical Emergency Medical Guidelines, "Phenol (C₆H₅OH), code E014-007". *2009.*
22. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (ATSDR), "Phenol, CAS N° 108-95-2, UN 1671 (solid), 2312 (molten), 2821 (solution)". *USA, 2008.*
23. World Health Organization. (WHO), "International programme on chemical safety, Environmental Health Criteria 161, Phenol". <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm>, Geneva, 1994.
24. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (ATSDR). "Public health statement, phenol, CAS N° 108-95-2". *Department of Health and Human Services (Public Health Service), USA, 2008.*
25. International Programme on Chemical Safety (IPCS), "Health and safety guide N° 88: phenol, health and safety guide". *World Health Organization. Geneva, 1994.*

26. Annachhatre A. P. and Gheewala S. H., "Biodegradation of chlorinated phenolic compounds". *Biotechnology Advances* 14 (1): 35 - 56, 1996.
27. Federación Nacional de Biocombustibles (FNB), "ABC de los alcoholes carburantes".
www.minminas.gov.co/minminas/pagesweb.nsf/0/6ac90c0c61c39de005257005004e2edc?, 2004.
28. Thomas V. and Kwong A., "Ethanol as a lead replacement: phasing out leaded gasoline in Africa". *Energ. Policy* 29: 1133 - 1143, 2001.
29. Ancillotti F. and Fattore V., "Oxygenate fuels: Market expansion and catalytic aspect of synthesis". *Fuel Process Technol.* 57: 163 - 194, 1998.
30. Rosillo-Calle F. and Hall D. O., "Brazilian alcohol: Food versus fuel?". *Biomass* 12: 97 - 128, 1987.
31. Sjöström, E., "Wood Chemistry. Fundamentals and Applications". *Academic Press: San Diego, CA, USA, 1993.*
32. Adler, E., "Lignin Chemistry Past, Present and Future". *Wood Science and Technology* 11 (3): 169 - 218, 1977.
33. Liu, S. J., "Woody biomass: Niche position as a source of sustainable renewable chemicals and energy and kinetics of hot-water extraction / hydrolysis". *J. Biotech. Adv.* 28: 563 - 582, 2010.
34. Berg C., "World fuel ethanol; Analysis and outlook". www.agra-europe.co.uk/FOLstudies/FOL-Spec04.html, 2001.

35. Prakash R., Henham A. and Bhat I. K., "Net energy and gross pollution from bioethanol production in India". *Fuel* 77: 1629 - 1633, 1998.
36. Lynd L. R., Weimer P. J., Van Zyl W. H. and Pretorius I. S., "Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology". *Microbiol. Mol. Biol. R.* 66: 506 - 577, 2002.
37. Zhang Y. H. P. and Lynd L. R., "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulose systems". *Biotechnol. Bioeng.* 8: 797 - 882, 2004.
38. Wyman C. E., Spindler D. D. and Grohmann K., "Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol". *Biomass Bioenerg.* 3: 301 - 307, 1992.
39. Sun Y. and Cheng J., "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review". *Bioresource Technol.* 83: 1 - 11, 2002.
40. De Sousa M. V., Monteiro S. N. and d'Almeida J. R. M., "Evaluation of pretreatment, size and molding pressure on flexural mechanical behavior of chopped bagasse-polyester composites". *Polymer Testing* 23 (3): 253 - 258, 2004.
41. Qi B. C., Aldrich C., Lorenzen L. and Wolfaardt G. W., "Acidogenic fermentation of lignocellulosic substrate with activated sludge". *Chemical Engineering Communications* 192 (9): 1221 - 1242, 2005.
42. Mason W. H., "U. S. Patent N° 1,578,609". 1926.
43. Foody P., "Optimization of steam explosion pretreatment". *Final Report to the Department of Energy (DOE), Contract AC02-79ET23050*, 1980.

44. Shultz T. P., Templeton M. C., Biermann C. J. and Mc. Ginnis G. D., "Steam explosion of mixed hardwood chips, rice hulls, corn stalks and sugar cane bagasse". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 1166 - 1172, 1984.
45. Martinez J., Negro M. J., Saez F., Manero J., Saez R. and Martin C., "Effect of acid steam explosion on enzymatic hydrolysis of *O. nervosum* and *C. cardunculus*". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24 / 25: 127 - 134, 1990.
46. Nunes A. P. and Pourquie J., "Steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis of eucalyptus wood". *Bioresource Technology* 57: 107 - 110, 1996.
47. Martín R. S., Perez C. and Briones R., "Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (*Pinus radiata*) using steam explosion". *Bioresource Technology* 53: 217 - 223, 1995.
48. Moniruzzaman M., "Saccharification and alcohol fermentation of steam-exploded rice straw". *Bioresource Technology* 55: 111 - 117, 1996.
49. Chornet E. and Overend R. P., "Phenomenological kinetics and reaction engineering aspects of steam / aqueous treatments". *Proceedings of the International Workshop on Steam Explosion Techniques, Fundamentals and Industrial Applications* 21 - 58, 1988.
50. Palmqvist E. and Hahn-Hägerdal B., "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification". *Bioresource Technol.* 74: 17 - 24, 2000.
51. Palmqvist E. and Hahn-Hägerdal B., "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition". *Bioresource Technol.* 74: 25 - 33, 2000.

52. Yu Z. and Zhang H., "Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp. YZ-1* and *Zymomonas mobilis*". *Biomass Bioenerg.* 24: 257 - 262, 2003.
53. Martín C., Galbe M., Wahlbom C. F., Hahn-Hägerdal B. and Jönsson L. J., "Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*". *Enzyme Microb. Technol.* 31: 274 - 282, 2002.
54. Wooley R., Ruth M., Sheehan J., Ibsen K., Majdeski H. and Gálvez A., "Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis; Current and futuristic scenarios". *National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, EEUU, 123 pp., 1999.*
55. Jiménez B. E., "Procesos biológicos". La contaminación ambiental en México; causas, efectos y tecnología apropiada: 256 - 282. *Editorial Limusa, México, 2002.*
56. Tay S. T. L., Moy B. Y. P., Jiang H. L. and Tay J. H., "Rapid cultivation of stable aerobic phenol-degrading granules using acetate-fed granules as microbial seed". *J. Biotechnol.* 115: 387 - 395, 2005.
57. Paller G., Hommel R. K. and Kleber H-P., "Phenol degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250". *J. Basic Microbiol.* 35: 325 - 335, 1995.
58. Shalaby M., "Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by *Burkholderia cepacia* G4". *Tesis doctoral, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Alemania, 2003.*
59. Heesche-Wagner K., Schwarz T. and Kaufmann M., "Phenol degradation by an enterobacterium: a *Klebsiella* strain carries a TOL-

like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase". *Can. J. Microbiol.* 45 (2): 162 - 171, 1999.

60. Fava F., Armenante P. M., Kafkewitz D. and Marchetti L., "Influence of organic and inorganic growth supplements on the aerobic biodegradation of chlorobenzoic acid". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 171 - 177, 1995.
61. Hill G. A. and Robinson C. W., "Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by *Pseudomonas putida*". *Biotechnol. Bioeng.* 17: 1599 - 1615, 1975.
62. Léonard D., Ben Youssef C., Destruhaut C., Lindley N. D. and Queinnec I., "Phenol degradation by *Ralstonia eutropha*: colorimetric determination of 2-hydroxymuconate semialdehyde accumulation to control feed strategy in fed-batch fermentations". *Biotechnol. Bioeng.* 65 (4): 407 - 415, 1999.
63. Straube G., "Phenol hydroxylase from *Rhodococcus sp.* P1". *J. Basic Microbiol.* 27: 229 - 232, 1987.
64. Komarkova E., Paca J., Klapkova E., Stiborova M., Soccol C. R. and Sobotka M., "Physiological changes of *Candida tropicalis* population degrading phenol in fed batch reactor". *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46 (4): 537 - 543, 2003.
65. Semple K. T. and Cain R. B., "Biodegradation of phenols by the algae *Ochromonas danica*". *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (4): 1265 - 1273, 1996.
66. Mörsen A. and Rehm H-J, "Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 206 - 212, 1990.

67. Nuhoglu A. and Yalcin B., "Modelling of phenol removal in a batch reactor". *Process Biochem.* 40: 1233 - 1239, 2005.
68. SMEWW-APHA-AWWA-WEF-5220-D-2012, "Standard methods for the examination of water and wastewater (22nd. edition) - Chemical oxygen demand (COD)". *American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), Estados Unidos, 2012.*
69. SMEWW-APHA-AWWA-WEF-5530-C-2012, "Standard methods for the examination of water and wastewater (22nd. edition) - Phenols including cleanup procedure". *American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), Estados Unidos, 2012.*
70. Miller G. L., "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Anal. Chem.* 31 (3): 426 - 428, 1959.

XI. LITERATURA REVISADA

Internet

1. Proyecto FAO/GCP/PER/035/NET, Apoyo a la Estrategia Nacional para el Desarrollo Forestal (ENDF). "Estrategia Nacional Forestal". Perú, 2002.
http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/oed/docs/1_GCPPER035NET_2002_ER.pdf. Visitada el 18 de mayo del 2013.
2. Página web del U. S. Department of Energy:
<http://www.doe.gov/>. Visitada el 24 de junio del 2013.
3. Página web del BP Group:
<http://www.bp.com/>. Visitada el 24 de junio del 2013.
<http://www.bp.com/statisticalreview>. Visitada el 24 de junio del 2013.

Normativa legal peruana

4. Política Nacional del Ambiente.
5. Ley N° 27307: Ley de Promoción del Desarrollo Integral de la Amazonía Peruana.
6. Ley N° 28054: Ley de Promoción del Mercado de Biocombustibles.
7. Ley N° 28611: Ley General del Ambiente.
8. Ley N° 29338: Ley de Recursos Hídricos.
9. Ley N° 29763: Nueva Ley Forestal y de Fauna Silvestre.
10. D. S. N° 031-2004-MINAG: Decreto Supremo que oficializa el documento "Estrategia Nacional Forestal, Perú 2002 - 2021".
11. D. S. N° 013-2005-EM: Reglamento de la Ley de Promoción del Mercado de Biocombustibles.
12. D. S. N° 002-2008-MINAM: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua.
13. D. S. N° 012-2009-MINAM: Decreto Supremo que aprueba la Política Nacional del Ambiente.
14. D. L. N° 1081: Decreto Legislativo que crea el Sistema Nacional de Recursos Hídricos.

15. R. M. 121-2009-MINAM: Aprueban Plan de Estándares de Calidad Ambiental y Límites Máximo Permisibles para el Año Fiscal 2009.

Normativa legal internacional

16. NOM-CCA-019-ECOL-1993: Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de la destilería. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAT).
17. NOM-064-ECOL-1994: Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de impregnación de productos de aserradero. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAT).
18. NOM-CCA-001-ECOL-1996: Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAT).

XII. APÉNDICES

APÉNDICE 1: ESQUEMA DEL REACTOR MULTIPROPÓSITO A NIVEL BANCO.

APÉNDICE 2: PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE LEVADURA PRODUCTO DEL CRECIMIENTO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN CULTIVO POR LOTES Y CON GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

APÉNDICE 3: PROTOCOLO DE ANÁLISIS PROXIMAL PARA EL ASERRÍN DE CAPIRONA ACONDICIONADO.

APÉNDICE 4: ESQUEMA DEL EQUIPO DE EXPLOSIÓN EN VAPOR.

APÉNDICE 5: PANTALLA DE MONITOREO DE TEMPERATURA Y PH DURANTE EL DESARROLLO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.

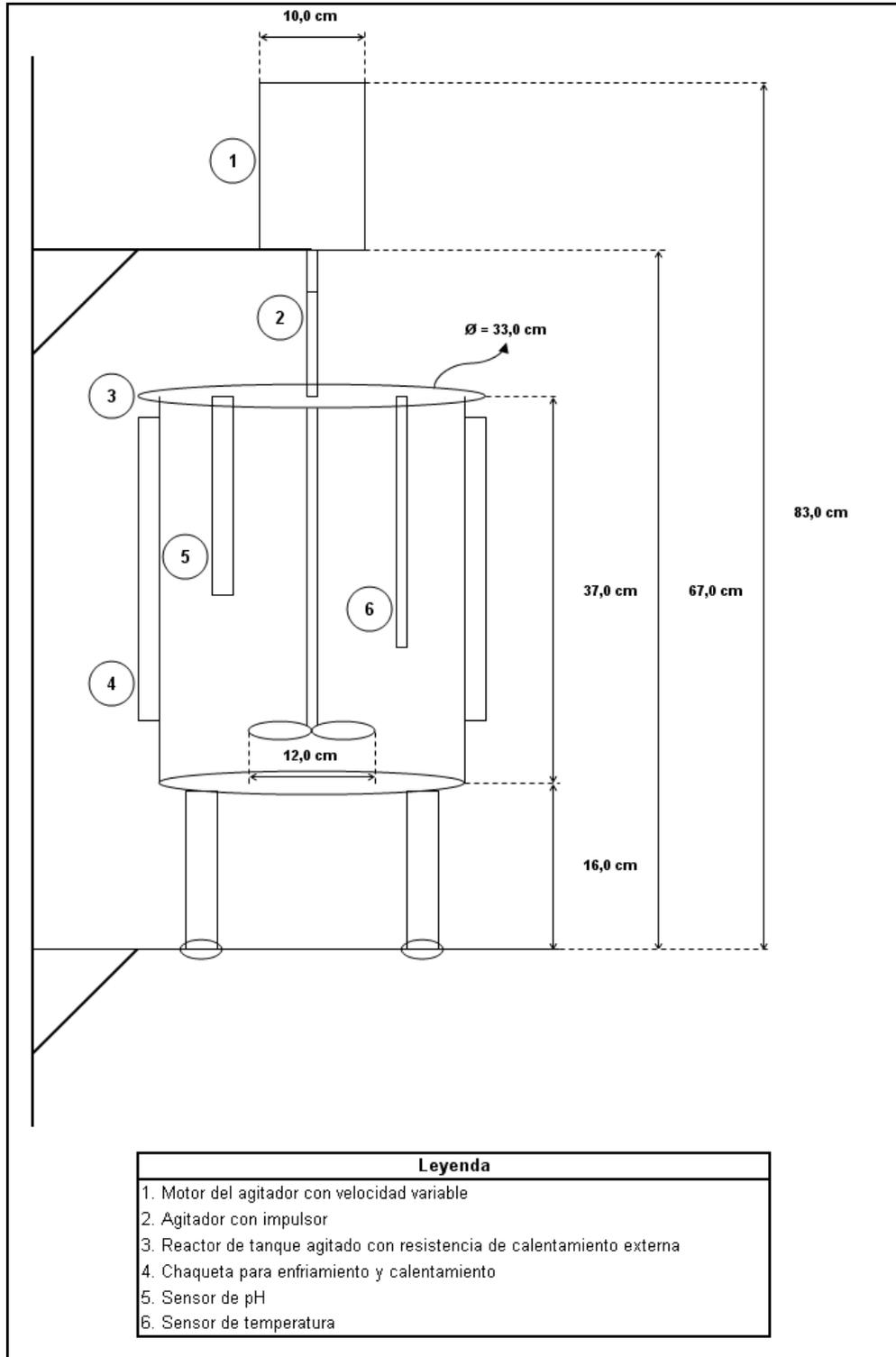
APÉNDICE 6: PANTALLA DE MONITOREO DE TEMPERATURA Y PH DURANTE EL DESARROLLO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

APÉNDICE 7: PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO.

APÉNDICE 8: PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES.

APÉNDICE 9: PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (GLUCOSA).

APÉNDICE 1: ESQUEMA DEL REACTOR MULTIPROPÓSITO A NIVEL BANCO



APÉNDICE 2: PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN DE INÓCULO DE LEVADURA PRODUCTO DEL CRECIMIENTO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN CULTIVO POR LOTES Y CON GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO

Preparación del inóculo

De un tubo con medio inclinado conteniendo un cultivo de 48 horas de incubación a 28 °C (cepa de *Saccharomyces cerevisiae*), hacer una suspensión de células con 10 mL de agua destilada estéril y agregar a un matraz con 100 mL de caldo YEPG. Incubar a 28 °C por 12 horas.

A dos matraces erlenmeyer de 1 000 mL de capacidad, adicionar 500 mL de caldo YEPG a cada uno, esterilizar a 121 °C por 15 minutos y, una vez fríos, agregar 50 mL del primer matraz con la cepa de levadura a cada uno. Incubar los matraces en agitación a temperatura de 28 °C por 12 horas.

Preparación del fermentador

Agregar 1 000 mL de caldo YEPG al fermentador y esterilizar o, si fuese el caso, esterilizar primero el caldo y agregar en condiciones estériles. A esta cantidad de caldo agregar los 1 000 mL totales de inóculo. Asegurarse de una buena aireación y una correcta forma de homogenizado. Incubar a 28 °C, con aireación inyectada, durante 2 días.

APÉNDICE 3: PROTOCOLO DE ANÁLISIS PROXIMAL PARA EL ASERRÍN DE CAPIRONA ACONDICIONADO

Determinación de humedad

Pesar de 2 a 3 g de muestra (m_i) en un pesafiltro con tapa limpio y seco (previamente pesado, después de tenerlo a peso constante durante 3 horas a 130 °C, aproximadamente). Secar la muestra en la estufa durante 2 horas a 100 - 110 °C. Retirar la muestra de la estufa, tapar, dejar enfriar en el desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente (m_f). Repetir el procedimiento hasta peso constante.

Calcular el porcentaje de humedad, reportándolo como pérdida por secado a 100 - 110 °C, según:

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \%$$

Determinación de cenizas totales (calcinación)

Colocar a peso constante un crisol durante 2 horas, aproximadamente, en la mufla a 600 °C (no colocar el crisol caliente en la mesa de la mufla). Pesar de 3 a 5 g de muestra (m_i) en el crisol (la muestra no debe sobrepasar la mitad del crisol), previamente pesado. Calcinar la muestra, en primer lugar, con un mechero en la campana hasta que no se desprendan humos y, posteriormente, meterla a la mufla durante 2 horas, cuidando que la temperatura no pase de 550 °C. Repetir la operación anterior, si es necesario, hasta conseguir unas cenizas blancas o ligeramente grises, homogéneas. Enfriar en desecador y pesar (m_f).

Calcular el porcentaje de cenizas, según:

$$\% \text{ Cenizas} = \left(\frac{m_f}{m_i} \right) \times 100 \%$$

Determinación de aceites y grasas (método de soxhlet)

Colocar a peso constante un matraz de bola de fondo plano con perlas o piedras de ebullición en la estufa a 100 °C, aproximadamente, durante 2 horas. Pesar de 4 a 5 g de muestra (m_i) sobre un papel, enrollarlo y colocarlo en un cartucho de celulosa, tapar con un algodón (no apretar el algodón contra la muestra) y colocar el cartucho en el extractor. Conectar el matraz al extractor, en el cual se debe encontrar el cartucho con la muestra, y, posteriormente, conectar éste al refrigerante. (no poner grasa en las juntas). Agregar 2 cargas del disolvente (generalmente, éter etílico) por el refrigerante y calentar el matraz con parrilla a ebullición suave. Para verificar que se ha extraído toda la grasa, dejar caer una gota de la descarga sobre papel de filtro, notando que al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa. Una vez extraída toda la grasa, quitar el cartucho con la muestra desengrasada, seguir calentando hasta la casi total eliminación del disolvente, recuperándolo antes de que se descargue. Quitar el matraz y secar el extracto en la estufa a 100 °C por 30 minutos, enfriar y pesar (m_f).

Calcular el porcentaje de aceites y grasas, según:

$$\% \text{ Aceites y Grasas} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \%$$

Determinación de proteínas (método de Kjeldahl)

Se utiliza el método de digestión con cobre como catalizador y usando balones de destilación simple Kjeldahl.

Digestión: Pesar de 0,1 a 0,2 g de muestra (m_i) e introducir en un tubo de Kjeldahl, luego agregar 0,15 g de sulfato de cobre pentahidratado, 10 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. Digestar hasta obtener un líquido azul - verdoso transparente, enfriar. *Destilación simple:* La muestra tratada se disuelve con 100 mL de

agua desionizada y, para destilar, se le agrega 130 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 50 %. El destilado se recibe en 100 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 N, para luego titular con NaOH 0,1 N, utilizando rojo de metilo (rojo - amarillo) como indicador. Anotar el volumen gastado de soda (Vg_m). Proceder de igual forma con ausencia de la muestra, esto se considera el blanco correspondiente. Anotar el volumen gastado de soda (Vg_b).

Calcular el porcentaje de proteínas (nitrógeno orgánico), según:

$$\% \text{ Proteínas} = \left(\frac{(Vg_b - Vg_m) \times 1,4 \times N_{NaOH}}{m_i} \right) \times 100 \%$$

Determinación de fibras

Pesar 1,5 g de muestra (m_i) luego de habersele extraído las grasas y aceites, y colocarla en un vaso de 500 mL, luego agregar 200 mL de H_2SO_4 0,2 N y calentar la mezcla por 30 minutos. Filtrar al vacío, luego se limpia el residuo con NaOH 0,2 N hasta que todo se deposite en un vaso limpio y seco, posteriormente, añadir 200 mL de NaOH 0,2 N, hervir por 50 minutos y filtrar en un embudo de Gooch. El filtrado se seca en la estufa a 100 °C por 3 horas y se pesa (m_1), después calcinar a 500 °C por 30 minutos y pesar (m_2).

Calcular el porcentaje de fibras, según:

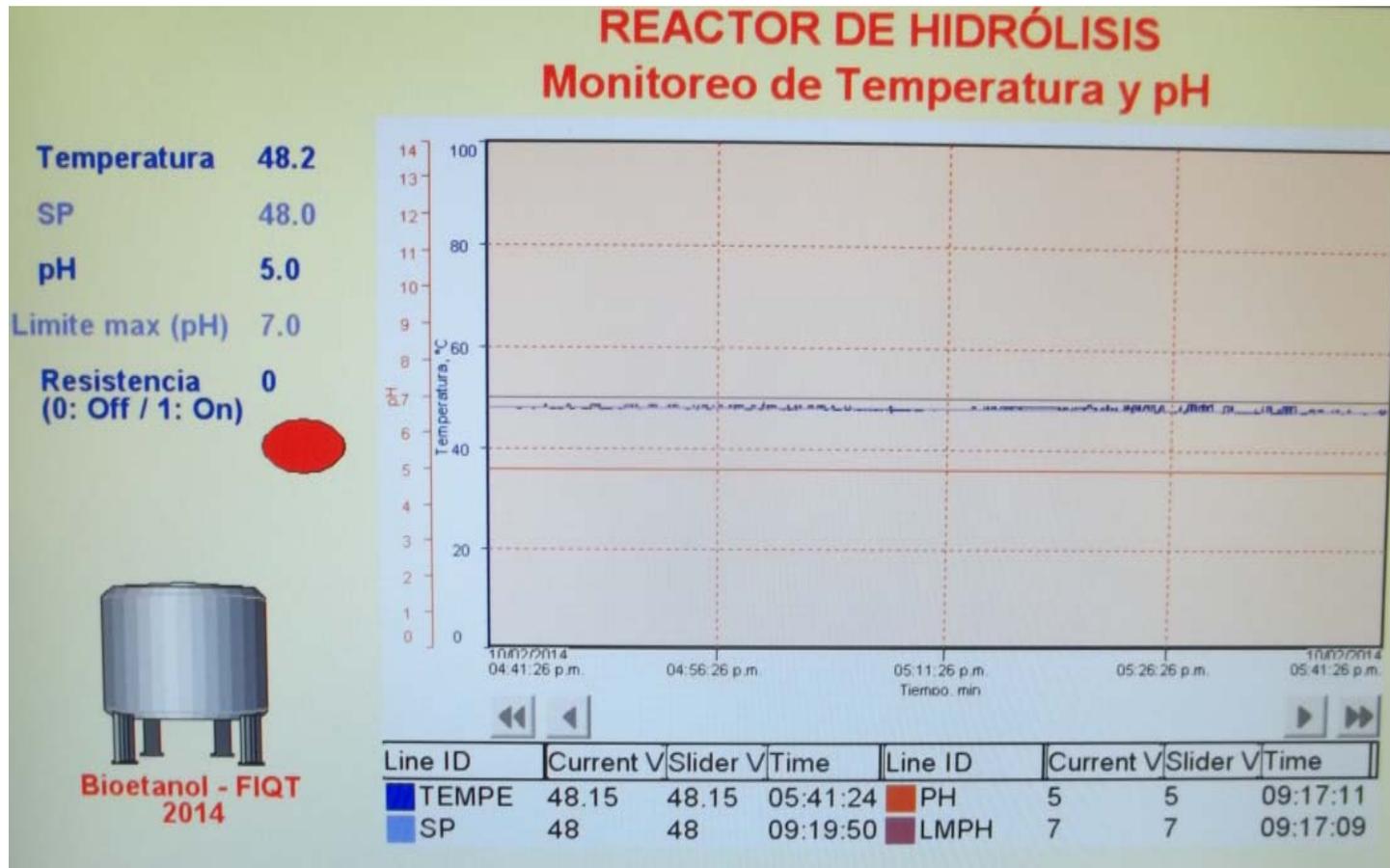
$$\% \text{ Fibras} = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_i} \right) \times 100 \%$$

Determinación de carbohidratos

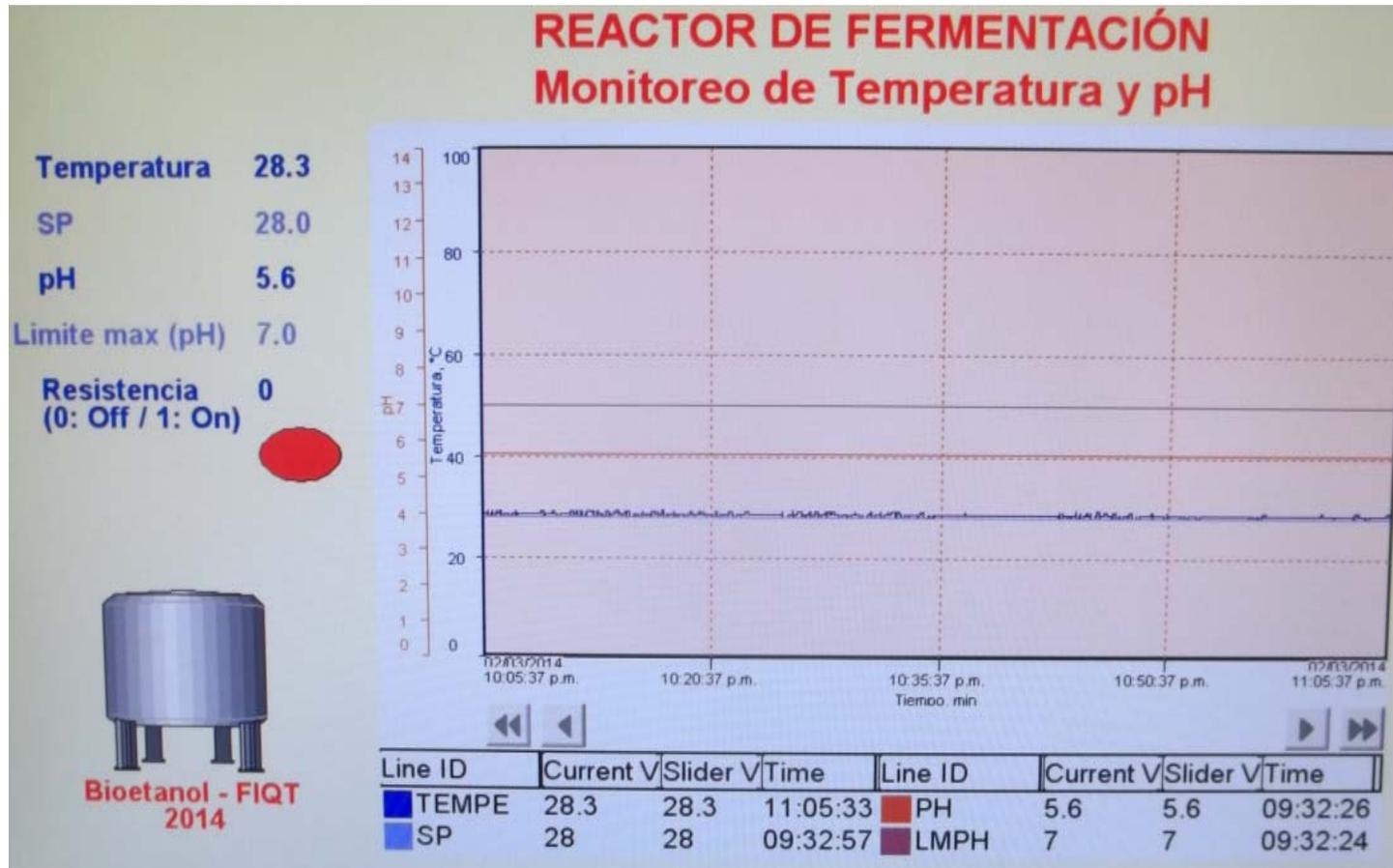
Calcular el porcentaje de carbohidratos por diferencia del valor porcentual 100, según:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 \% - \% \left(\begin{array}{l} \text{Humedad} + \text{Cenizas} + \text{Proteínas} + \\ \text{Aceites y Grasas} + \text{Fibras} \end{array} \right)$$

APÉNDICE 5: PANTALLA DE MONITOREO DE TEMPERATURA Y PH DURANTE EL DESARROLLO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA



APÉNDICE 6: PANTALLA DE MONITOREO DE TEMPERATURA Y PH DURANTE EL DESARROLLO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA



APÉNDICE 7: PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

Preparación de la solución de biftalato de potasio patrón

Secar el patrón primario de biftalato de potasio ($C_8H_5KO_4$) en la estufa a 110 °C hasta peso constante. Pesar 425 mg de dicho patrón primario seco y luego diluir a 1 L con agua destilada.

Calcular la demanda química de oxígeno ($\mu g O_2 mL^{-1}$) de la solución de biftalato de potasio patrón, cuyo valor teórico es de 500 $\mu g O_2 mL^{-1}$.

Determinación de la demanda química de oxígeno en cada muestra tomada por el método del reflujo cerrado

El método consiste en que la cantidad de un oxidante específico reacciona con la muestra bajo condiciones controladas. Al digerir una muestra, el ión dicromato oxida el material DQO en la muestra, dando como resultado el cambio del cromo hexavalente (Cr^{6+}) al estado trivalente (Cr^{3+}). Ambas especies de cromo son coloreadas y absorben la región visible del espectro. El ión dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) absorbe al máximo en la región de 420 nm, donde la absorción de ión crómico (Cr^{3+}) es mucho menor. El ión crómico absorbe al máximo en la región de 600 nm, donde el dicromato tiene una absorción cercana al cero.

Observar las condiciones de la muestra (hidrolizado hemicelulósico, hidrolizado enzimático, mosto fermentado o vinaza) -preservada con ácido sulfúrico a un pH menor a 2 inmediatamente después de su muestreo- y seleccionar el tipo de prueba para ésta (rango bajo o alto). Para cualquier tipo de prueba (rango bajo o alto), tomar 2,5 mL de muestra en un tubo de ensayo y añadir 1,5 mL de reactivo dicromato de potasio (rango bajo o alto sólo se diferencian en el peso del dicromato de potasio). Luego, agregar 3,5 mL de ácido sulfúrico y colocar el tubo de ensayo en el digestor por 2 horas a una temperatura entre 148 y 152 °C. Una vez culminada la

digestión, dejar enfriar, lentamente, la muestra digerida en el tubo de ensayo (no forzar el enfriamiento para evitar precipitación). Finalmente, realizar la lectura de su absorbancia en el espectrofotómetro (para las muestras de rango bajo, la longitud de onda es de 420 nm y, para las muestras de rango alto, la longitud de onda es de 600 nm). Así, se tienen diferentes valores de absorbancia para cada muestra tomada durante el proceso, los cuales serán usados, posteriormente.

Calcular la demanda química de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) en cada muestra tomada durante el proceso (hidrolizados hemicelulósicos, hidrolizados enzimáticos, mostos fermentados y vinazas), utilizando la curva de calibración patrón de DQO.

Preparación de la curva de calibración patrón de DQO

Preparar, previamente, una curva de calibración patrón tomando por lo menos 5 muestras estándares de la solución de biftalato de potasio patrón con equivalentes de la DQO ($\mu\text{g O}_2 \text{ mL}^{-1}$) que cubran cada rango de concentración (rango bajo o alto) en 5 tubos de ensayo, para las cuales se procede de igual forma que las muestras tomadas durante el proceso. De esta manera, se tienen datos de absorbancia y DQO conocida ($\mu\text{g O}_2 \text{ mL}^{-1}$). Realizar la gráfica de estos 2 parámetros (absorbancia versus demanda química de oxígeno conocida) para hallar la curva de calibración patrón de DQO.

APÉNDICE 8: PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES

Preparación de la solución de biyodato de potasio patrón

Secar el patrón primario de biyodato de potasio ($\text{KH}(\text{IO}_3)_2$) certificado en la estufa a 105 °C hasta peso constante. Pesar 812,4 mg de dicho patrón primario seco y luego diluir a 1 L con agua destilada.

Calcular la concentración molar (M) de la solución de biyodato de potasio patrón.

Estandarización de la solución de tiosulfato de sodio

Tomar una alícuota de 20 mL de la solución de biyodato de potasio patrón (concentración conocida) y agregar unas gotas de solución de almidón. Luego, titular con solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) en bureta clase A de 50 mL, registrando el volumen gastado (Vg).

Calcular la concentración normal (N) de la solución de tiosulfato de sodio.

Preparación de la solución de fenol patrón

Pesar 100 mg de fenol y diluir a 100 mL con agua destilada en fiola clase A. Luego, valorar con solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Estandarización de la solución de fenol patrón

En un matraz erlenmeyer de 500 mL, agregar 50 mL de solución stock de fenol y diluir a 100 mL con agua destilada. Verter 10 mL de solución de bromato - bromuro y 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado. Luego, pesar 1 g de yoduro de potasio (KI) y adicionar al matraz erlenmeyer. Titular la mezcla resultante con solución estándar de tiosulfato de sodio

0,025 N en bureta de 50 mL. Agregar unas gotas de solución de yodo y continuar valoración hasta que el color azul de la solución desaparezca.

Calcular la concentración de la solución de fenol patrón ($\mu\text{g mL}^{-1}$), la cual debe estar alrededor de $1\ 000\ \mu\text{g mL}^{-1}$.

Determinación de la concentración de fenoles en cada muestra tomada por el método de extracción con cloroformo

En una muestra acondicionada, se determina la cantidad de fenoles (mg L^{-1}) mediante la lectura de su absorbancia en radiación ultravioleta extrema (EUV) a 460 nm. El acondicionamiento de la muestra consiste en tratarla con hidróxido de amonio (NH_4OH) 0,5 N, ajustando el pH entre 7,8 y 8,0 con solución buffer fosfato y utilizando solución 4-aminoantipirina en presencia de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) para el desarrollo del color. Posteriormente, se realiza la extracción con cloroformo (CHCl_3) y filtrado con sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro.

Tomar 500 mL de muestra (hidrolizado hemicelulósico, hidrolizado enzimático, mosto fermentado o vinaza) -preservada con ácido sulfúrico a un pH menor a 2 inmediatamente después de su muestreo- utilizando una probeta graduada. Verter la muestra en el balón de destilado y ajustar el pH a 4, aproximadamente, utilizando solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) y NaOH 2,5 N. Destilar 450 mL y detener la destilación. Luego, agregar 50 mL de agua caliente y continuar con la destilación hasta coleccionar 500 mL de muestra destilada. Ajustar el pH de la muestra destilada entre 7,8 y 7,9 utilizando solución buffer fosfato y, luego, agregar NH_4OH 0,5 N. Transferir la muestra destilada a una pera de separación de 1 L. Adicionar 3 mL de la solución 4-aminoantipirina y mezclar. Después, adicionar 3 mL de la solución de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y mezclar. Esperar 15 minutos para la generación del color (amarillo claro). Realizar inmediatamente la extracción utilizando CHCl_3 (usar 25 mL de CHCl_3 para lectura en celda de 1 cm a 5 cm ó 50 mL de CHCl_3 para lectura en celda de 10 cm), efectuando agitaciones constantes por unas 10 veces como mínimo, dejar reposar,

volver a realizar las agitaciones por unas 10 veces más y dejar reposar nuevamente. Recolectar el extracto filtrando, previamente, con 5 g de Na_2SO_4 anhidro. Finalmente, realizar la lectura de su absorbancia en el espectrofotómetro a 460 nm. Así, se tienen diferentes valores de absorbancia para cada muestra tomada durante el proceso, los cuales serán usados, posteriormente.

Calcular la concentración de fenoles (mg L^{-1}) en cada muestra tomada durante el proceso (hidrolizados hemicelulósicos, hidrolizados enzimáticos, mostos fermentados y vinazas), utilizando la curva de calibración patrón de fenol.

Preparación de la curva de calibración patrón de fenol

Preparar, previamente, una curva de calibración patrón de fenol tomando una serie de 500 mL de la solución de fenol patrón ($\mu\text{g mL}^{-1}$) conteniendo 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μg de fenol en 6 probetas graduadas, para las cuales se procede de igual forma que las muestras tomadas durante el proceso. De esta manera, se tienen datos de absorbancia y concentración de fenol conocida (μg). Realizar la gráfica de estos 2 parámetros (absorbancia versus concentración de fenol conocida) para hallar la curva de calibración patrón de fenol.

APÉNDICE 9: PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (GLUCOSA)

Determinación de azúcares reductores (glucosa)

Se basa en el procedimiento de Miller con el uso del reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con glucosa como estándar. Centrifugar la muestra del reactor a 4 000 rpm por 15 minutos. Agregar 1 mL de la muestra (fase líquida) preparada en un matraz volumétrico de 10 mL y completar con agua destilada. Colocar 0,5 mL de dilución en un tubo cónico de 15 mL con tapa rosca y agregar 0,5 mL del reactivo. Agitar vigorosamente por 30 segundos. Calentar la mezcla a 90 °C por 5 minutos. Enfriar en baño con hielo y adicionar 5 mL de agua destilada. Agitar la dilución y dejar en reposo por 15 minutos protegiendo el tubo cónico de la luz. Finalmente, realizar la lectura de su absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm usando una celda de lectura de 1 cm. Así, se tienen diferentes valores de absorbancia para cada muestra tomada durante el proceso, los cuales serán usados, posteriormente.

Calcular la concentración de azúcares reductores (glucosa, g L⁻¹) en cada muestra tomada durante el proceso (hidrolizados enzimáticos y mostos fermentados), utilizando la curva de calibración patrón de glucosa.

Preparación de la curva de calibración patrón de glucosa

Preparar, previamente, una curva de calibración patrón tomando como muestras concentraciones de glucosa conocidas (g L⁻¹) en 5 tubos de ensayo, para las cuales se procede de igual forma que las muestras tomadas durante el proceso, exceptuando los dos primeros pasos. De esta manera, se tienen datos de absorbancia y concentración de glucosa conocida (g L⁻¹). Realizar la gráfica de estos 2 parámetros (absorbancia versus concentración de glucosa conocida) para hallar la curva de calibración patrón de glucosa.