

Obtención de bioetanol a partir de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*)

Rafael Torres Robles¹, Mitzi Nayeli Cano López¹ y Jorge Aburto Anell²
Universidad Politécnica de Pachuca (UPP)¹, Gerencia de Biocatálisis Instituto Mexicano del Petróleo²
Zempoala, Hgo.; Cd de México, D.F.; México
rafaeltorres@upp.edu.mx

Abstract- In this work raises the possibility of getting bioethanol from the kikuyo grass (*Pennisetum clandestinum*). This substrate was characterized by obtaining 54.44% of total sugars and 53.29% of reduced sugars; it is considered that it has a potential as a source of carbon to produce ethanol. Saccharification of pasture was conducted at two scales, 50 ml and 2 l. Syrup obtained in 2 l exhaust has been fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and the broth is distilled, obtaining ethanol to the 79.3% of purity, with a conversion of glucose to ethanol from 0.51 g ethanol / g sugar. These results advise to continue to study the possibility of a bioprocess development.

Keyword— ethanol, lignocellulosity, biomass, kikuyo grass, bioprocess.

Resumen- En este trabajo se plantea la posibilidad de obtener bioetanol a partir del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). Este sustrato se caracterizó obteniendo 54.44% de azúcares totales y 53.29% de azúcares reductores, por ello se considera que tiene potencial como fuente de carbón para producir etanol. La sacarificación del pasto se realizó a dos escalas, 50 ml y 2 l. El jarabe obtenido en el extractor de 2 l se fermentó con *Saccharomyces cerevisiae* y el caldo se destiló, obteniéndose etanol de 79.3% de pureza, con una conversión de glucosa a etanol de 0.51 g de etanol / g de azúcar. Estos resultados señalan que se debe estudiar la posibilidad de desarrollar el bioproceso.

Palabras Clave: etanol, biomasa lignocelulosa, pasto kikuyo, fermentación, bioproceso

I. INTRODUCCIÓN

El etanol es el producto biotecnológico más importante en términos de volumen y valor en el mercado. Las materias primas actuales son ricas en azúcar, tales como jugo de caña de azúcar y melaza, así como materiales a base de almidón, tales como trigo y maíz. Sin embargo, la intensa investigación y desarrollo de las últimas décadas hacen que los materiales lignocelulósicos sean la materia prima más importante para la producción de etanol en el futuro (Taherzadeh & Karimi, 2007).

Los tres mayores constituyentes de la biomasa lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) encuentran aplicaciones prácticas apreciables: celulosa y hemicelulosa para obtener etanol y/o biomasa y lignina como fuente de combustible o adhesivo (Oliva *et al.*, 2004).

Para tratar de solventar el problema de la crisis energética en la que se encuentra México, es necesario desarrollar tecnologías, que de manera progresiva vayan sustituyendo la variedad de combustible derivados del crudo. En el caso de los combustibles para el transporte, el etanol anhidro representa una opción viable para oxigenar y complementar el uso de la gasolina como carburante (Rodríguez *et al.*, 2009).

Para la obtención de etanol anhidro, como biocombustible, se emplean diversos pastos y forrajes como biomasa lignocelulósica, lo cual tiene varias ventajas: no habría competencia con la producción de alimentos ya que pueden ser empleadas tierras marginales o degradadas por la agricultura, o pueden utilizarse tierras no destinadas para el cultivo de alimentos; lo anterior presenta un menor costo que las materias primas convencionales, pues pueden realizarse mezclas de variedades; además, son recursos renovables y abundantes para la bioconversión a azúcares (Sánchez-Macías *et al.*, 2009).

II. MÉTODOS EXPERIMENTALES

La Figura 1 muestra un diagrama general del proceso de obtención de bioetanol a partir del pasto kikuyo.

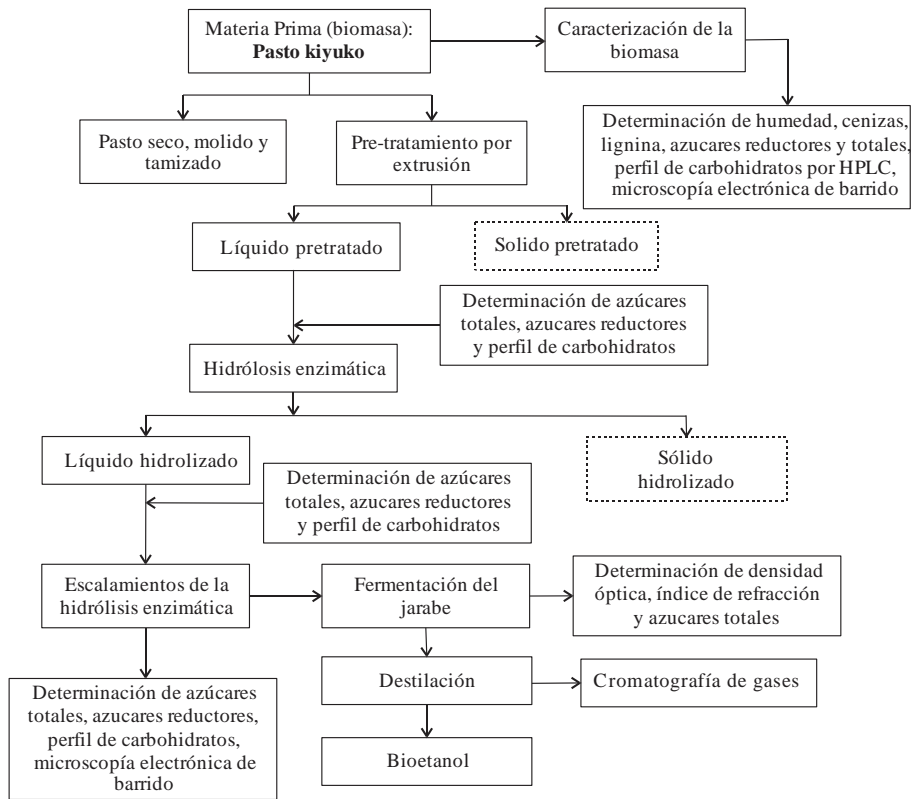


Fig. 1. Diagrama de la metodología para la obtención de bioetanol a partir de pasto kikuyo.

Si en una sección desea colocar sub-secciones estas deberán ser tituladas por letras, tal y como se muestran a continuación, nuevamente la forma más fácil de ponerlas donde sea necesario en su artículo será seleccionado el subtítulo, posicionar el curso donde desee insertar la nueva subsección y presionar la tecla ESC (escape) para que le mantenga el formato y la numeración.

J. Obtención y Caracterización de la muestra de materia prima

Como materia prima se utilizó pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) obtenido de los jardines del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP). Para la manipulación del material, posterior a su recolección, se determinó la humedad del pasto y éste se secó en un horno a 65 °C durante 72 h, se molió y tamizó en malla no. 60 (0.25 mm). Finalmente se midió nuevamente la humedad.

La caracterización de la muestra consistió en determinar: Humedad, cenizas, su hidrólisis ácida, la determinación de la lignina insoluble en ácido (LIA) y de la lignina soluble en ácido (LSA), los azúcares totales, los azúcares reductores y el perfil de carbohidratos.

La humedad fue determinada con un analizador automático de humedad (termo balanza marca OHAUS modelo MB45) por triplicado. Se taró la charola de aluminio en la balanza, se pesó una

muestra de mínimo 500 mg, se distribuyó de manera uniforme hasta que alcanzó el peso constante y el equipo se detuvo automáticamente arrojando el porcentaje de humedad.

La determinación de cenizas se realizó en un crisol a peso constante; se tomaron 5 g de muestra y se colocó el crisol con muestra en una parrilla y se quemó lentamente hasta que el material ya no desprendió humos. Se tomó el crisol para llevarlo a la mufla en donde se calcinó completamente. Cuando la mufla se enfrió, se pasó el crisol a un desecador y se determinó el peso del crisol con las cenizas.

Para realizar la hidrólisis ácida se colocaron 3 filtros de crisol en una mufla a 575 ± 25 °C por una noche. Inmediatamente de sacar los filtros de la mufla se pasaron a un desecador para dejarlos enfriar por una hora, aproximadamente. Se pesaron los filtros previamente identificados. Se regresaron los filtros a la mufla hasta que alcanzaron un peso constante. Se pesaron 310 mg de muestra con la humedad previamente medida en un matraz de tapa de rosca por triplicado. Se adicionaron 3 ml de ácido sulfúrico al 72 % a cada matraz y se agitó hasta que quedó completamente mezclado. Los matraces se incubaron en un baño de agua a 30 °C por 1 h a 120 rpm. Pasada la hora, se sacaron los matraces del agua y se diluyó el ácido adicionando 51 ml de agua destilada. Se tapó el matraz y se agitó varias veces hasta que se mezcló perfectamente. Por último, se colocaron los matraces en la autoclave a 121 °C durante 1 h (Martínez, 2012).

Para la determinación de LIA, se filtró al vacío el contenido de los matraces con las muestras en filtros de crisol previamente pesados, se recuperó el filtrado en un matraz y se midió el volumen de cada filtro. El filtrado se transfirió a un recipiente para almacenar, ya que se ocupó para la determinación de lignina soluble en ácido y el sólido se enjuagó con 50 ml de agua destilada. Se colocaron los filtros en una estufa a 105 °C durante 4 h para alcanzar el peso constante y se pasaron a un desecador para que se enfriaran. Una vez fríos, se pesaron y se colocaron en una mufla a $575 + 25$ °C por 24 h. Después del tiempo transcurrido, se pasaron los filtros a un desecador y se dejaron enfriar durante 24 h. Se pesaron y se regresaron los filtros a la mufla hasta que se alcanzó peso constante. El peso corresponde al contenido de cenizas del hidrolizado (Sluiter *et al.*, 2011).

La determinación de LSA se realizó en base al método *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass* (Sluiter, *et al.*, 2011). La lignina se determinó dentro de las 6 h de la hidrólisis. En un espectrofotómetro Uv-Vis marca *Perkin Elmer* modelo CIMBDA 45, se realizó un barrido de la muestra en celdas de cuarzo de 190 a 500 nm y se utilizó agua destilada como blanco, esto se realizó con el fin de conocer el perfil descrito por dicho material al graficar absorbancia contra longitud de onda (Sluiter *et al.*, 2011). Por último, se realizaron los cálculos necesarios para la determinación de la lignina insoluble en ácido (LIA), el residuo insoluble en ácido (RIA), la lignina soluble en ácido (LSA) y la lignina total.

Para la determinación de los azúcares totales (Cruz, 2007), se preparó la solución de Fenol al 5 % (p/v) y se realizó una curva patrón de glucosa. Después se tomó un volumen de jarabe recuperado de la digestión ácida y se llevó a un volumen final de 1 ml con agua destilada. Se adicionó 1 ml de solución de fenol al 5 % (p/v) directamente en la muestra, se mezcló y se adicionaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejándolo caer lentamente por las paredes del tubo, posteriormente se homogenizó cuidadosamente en vórtex y se dejó enfriar la muestra durante 20 min. Se determinó la absorbancia a 490 nm frente al blanco en un Espectrofotómetro Uv-Vis marca *Thermo Spectronic* modelo HELIOS y se calculó la concentración de azúcares presentes en la muestra a partir de una curva patrón.

Para la determinación de azúcares reductores se preparó el reactivo 3,5 Di nitro sulfato (DNS) y se realizó una curva patrón de glucosa. Se procedió a tomar un volumen de jarabe recuperado de la

digestión ácida y se llevó a un volumen final de 1 ml con agua destilada. Se agregó 1 ml de reactivo DNS directo a la muestra y se calentó durante 5 min en un baño de agua a temperatura de ebullición, la muestra se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se agregaron 8 ml de agua destilada y se homogeneizó en el vórtex. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm frente a un blanco. Finalmente se interpoló el valor de absorbancia en la curva patrón.

Para el perfil de carbohidratos (Martínez, 2012), se prepararon los estándares de azúcares estructurales. Después las muestras fueron analizadas con un Cromatógrafo de líquidos de alto desempeño (HPLC) marca *Hewlett-Packard* modelo 1100 con detector de dispersión de luz marca *Agilent Technologies* modelo 1260 ELDS.L

Para la preparación de las muestras, se transfirieron 20 ml de la alícuota recuperada de la digestión ácida a un matraz Erlenmeyer de 50 ml. Se neutralizó la muestra con carbonato de calcio hasta que alcanzó un pH de 5-6. Una vez que se alcanzó un pH entre 5-6, se permitió que la muestra sedimentara y se decantó el sobrenadante. Esta muestra se centrifugó y se filtró con un filtro de 0.2 μm , se recuperó el filtrado en un vial sellado y previamente etiquetado. Las muestras tenían un volumen final de reacción de 1000 μl , de los cuales se agregaron 100 μl de una solución de alanina, 50-100 μl de muestra (en las muestras concentradas) y el resto de agua grado HPLC. Se mezclaron en vórtex durante 30 segundos. Se analizaron los estándares de calibración y las muestras por cromatografía de líquidos con las condiciones descritas en la Tabla 1.

Tabla I. Concentración de carbohidratos obtenidos.

| Carbohidrato | Tiempo de Retención min | Concentración mg/ml | Azúcares % (p/p) | Suma de Azúcares % |
|--------------|----------------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|
| Xilosa | 5.387 | 0.23 | 8.15 | 38.1 |
| Glucosa | 6.377 | 0.76 | 29.95 | |
| Alanina* | 10.86 | - | - | |

* La alanina es un estándar para la cuantificación de azúcares por medio de HPLC

Se construyó una curva de calibración con los estándares estructurales y mediante una regresión lineal se encontró la ecuación de la recta. Esta recta se usó para determinar la concentración de mg de cada carbohidrato por ml de muestra (Sluiter *et al.*, 2011).

Una muestra de pasto seco, molido y tamizado con malla No. 60, se sometió a una micrografía electrónica de barrido para observar y caracterizar la superficie del pasto, la cual por la gran profundidad del campo, permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra (Pineda A., 2016). La muestra se colocó bajo el lente y se ajustó a 25 kV, 1.8 Torr, a las siguientes magnificaciones: 300x, 500x, 1,000x y 2,000x.

Lavado del pasto: El lavado del pasto se realizó con el fin de determinar los azúcares que aporta la biomasa de manera autónoma; esto se determinó mezclando 500 mg de pasto, tamiz No. 60, en 10 ml de agua destilada en un tubo de 15 ml y se filtró al vacío. Al volumen filtrado se determinó la cantidad de azúcares totales y reductores.

La caracterización se completó midiendo la velocidad de sacarificación, los cambios morfológicos del pasto, la velocidad de absorción de humedad del pasto y la extrusión; se llevó a cabo una microscopía electrónica de barrido para observar los cambios en la morfología del pasto.

Para determinar la velocidad de sacarificación se preparó un buffer de citratos y se mezcló en un reactor de vidrio enchaquetado de 50 ml y se llevó a cabo la reacción en un tiempo de 3 a 5 h con las condiciones de operación de: Buffer de citratos 50 mM a un pH de 4.8, con 0.45 ml de coctel

enzimático E9 marca Novozymes, pasando 0.5 g de pasto por un tamiz de 60, a una temperatura de 50 °C y una agitación de 150 rpm.

Para determinar los azúcares que se obtuvieron exclusivamente de la sacarificación del pasto, es indispensable realizar los cálculos de aquellos que aporta la enzima y lo que aporta el pasto, los cuales se determinan con los blancos de sacarificación descritos a continuación: Blanco de sacarificación buffer y enzima el cual se realizó en un reactor de vidrio enchaquetado de 50 ml, se adicionaron 0.45 ml de enzima y 9.55 ml de buffer de citratos 50 mM a un pH de 4.8, todo ello se mantuvo a 50 °C y 150 rpm durante 5 h. Cada hora se tomaron dos muestras. La muestra 1 fue inactivada en un baño de agua a 100 °C y la muestra 2 se procesó sin inactivar; ambas muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 14,000 rpm y al sobrenadante de ambas se le determinaron azúcares totales y reductores. El Blanco de sacarificación buffer y pasto se realizó en un reactor de vidrio enchaquetado de 50 ml al cual se le adicionaron 0.5 g de pasto (peso seco) y 9.5 ml de buffer de citratos 50 mM, pH de 4.8, la mezcla se mantuvo a 50 °C y 150 rpm durante 5 h. Cada hora se tomaron dos muestras. La muestra 1 fue inactivada en un baño de agua a 100 °C y la muestra 2 se procesó sin inactivar; ambas muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 14,000 rpm y al sobrenadante de ambas se le determinaron azúcares totales y reductores.

Para obtener la velocidad de absorción del pasto se pesaron 500 mg de pasto base húmeda y se adicionaron 15 ml de agua destilada. La muestra se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente, se decantó el agua, utilizando vacío. Finalmente se midió la humedad con ayuda de la termobalanza. Se realizó esta misma acción para 7 muestras más a diferentes intervalos de tiempo. Se obtuvo una gráfica en donde se interpoló el porcentaje de humedad respecto al tiempo.

Para la extrusión como pretratamiento, se mezclaron 50 g de pasto sin tamizar en 15 l de agua durante 15 min y se filtraron al vacío. La torta obtenida se colocó en el alimentador del Extrusor monotorquillo *Intelli-Torque Plastic-Corder*, Marca *Bradebber* y se procedió a extruir el pasto.

II. Resultados y Discusión

Obtención de la muestra: Para la manipulación del material posterior a su recolección, se midió la humedad del pasto, obteniendo 84.65 %. Posteriormente se secó en un horno para facilitar su manejo (Cardona, *et al.* 2013a). El pasto seco y tamizado se puso en la termobalanza, obteniendo una humedad de $1.39 \% \pm 0.132$.

El porcentaje de cenizas obtenido de tres muestras de pasto fue de $12.69 \% \pm 0.187$, valor que se encuentra entre las cenizas obtenidas del pasto *Pennisetum sp* (11.1 %) y *Pennisetum hybridum* (14.6 %) (Cardona *et al.*, 2013b)

Se llevó a cabo la hidrólisis ácida con el fin de determinar los valores de lignina en la muestra. El contenido de lignina insoluble en promedio es de $10.32 \% \pm 0.449$, el cual es un valor inferior a 16.04 ± 0.3 , reportado para *Pennisetum sp* (Mateus, 2011).

Determinación de lignina soluble en ácido (LSA): La lignina soluble en ácido es de $2.76 \% \pm 0.098$, tomando en cuenta un coeficiente de absorción (ϵ) de 30 l/(g·cm), debido a que el perfil de absorbancia del pasto es similar al rastrojo de maíz, por pertenecer a la familia de las gramíneas. Estas representan las siguientes características: Tallo cilíndrico y hueco; ramificaciones a nivel del suelo y/o extendidas lateralmente, las hojas son en vaina y limbo y son de tamaño muy variable que pueden oscilar entre pocos milímetros hasta varios metros (Gutiérrez., 2015) y una dilución de 5.7 l (Obtenido del cociente de 1000 μ L o volumen final sobre 175 μ L de muestra añadida). Este valor es ligeramente

menor al valor mínimo reportado de 2.9 a 6 % de Lignina en Detergente Ácido para *Pennisetum clandestinum* (JP, 2001).

La Figura 2 muestra que el pico en donde se encuentra la máxima absorbancia se encuentra entre 340 y 350 nm. Así, la cantidad de residuo insoluble en ácido promedio es de 23.01 % \pm 0.45.

La lignina total es la suma de la lignina insoluble en ácido y la lignina soluble en ácido. Sun y Cheng (2002) reportaron que los pastos de crecimiento rápido contienen 12 % de lignina, el cual es comparable con el 13.08 % \pm 0.365 obtenido, en este trabajo, para el pasto kikuyo. Es importante señalar que este pretratamiento también disuelve y degrada parte de la hemicelulosa presente; además actúa sobre las moléculas de lignina y hemicelulosa saponificando los enlaces éster intermoleculares de sus estructuras (Sun & Cheng, 2002). Como consecuencia de lo anterior, la lignina se disuelve y se separa en el licor obtenido del pretratamiento, el cual es rico en compuestos fenólicos (Mussatto & Teixeira, 2010).

Determinación de azúcares totales y azúcares reductores: Los azúcares totales se determinaron por el método de Fenol-Sulfúrico. La muestra tiene en promedio 54.44% \pm 1.396 de azúcares totales. Los azúcares reductores se determinaron por el método 3-5, di nitro salicilato (DNS). La muestra tiene en promedio 53.29% \pm 0.875 de azúcares reductores. Este resultado concuerda con lo que reportan Sánchez y Cardona en 2005 de un máximo de 56.3 % para pasto elefante (*Pennisetum sp*) y un máximo de 50.4 % para pasto King grass (*Pennisetum hybridum*). La Tabla 1 muestra el tiempo de retención y la concentración de azúcares.



Fig. 2. Barrido de lignina soluble proveniente de pasto kikuyo

Microscopía electrónica de barrido: En las Figuras 3 a la 11 se muestran diferentes campos de la superficie del pasto kikuyo, y en ellas se observan diversos aspectos morfológicos del pasto. En la

Figura 3a se observa la epidermis de la planta, la cual cubre y protege el cuerpo de la misma, la respiración, el pasaje de luz, etc. (Aguirre, González, & S., (2000)). En la Figura 3b, se observa claramente un “estoma”, el cual se especializa en el intercambio gaseoso con el medio ambiente y regula la transpiración (Aguirre, González, & S.J (2000)).

En la Figura 3c se observa un “xilema”, el cual se encarga de transportar agua y minerales y su pared está constituida por lignina (Monsalve y Gómez, 2016). En la Figura 3d se observa claramente un miembro o segmento del vaso o xilema (Monsalve & Gómez, 2016).

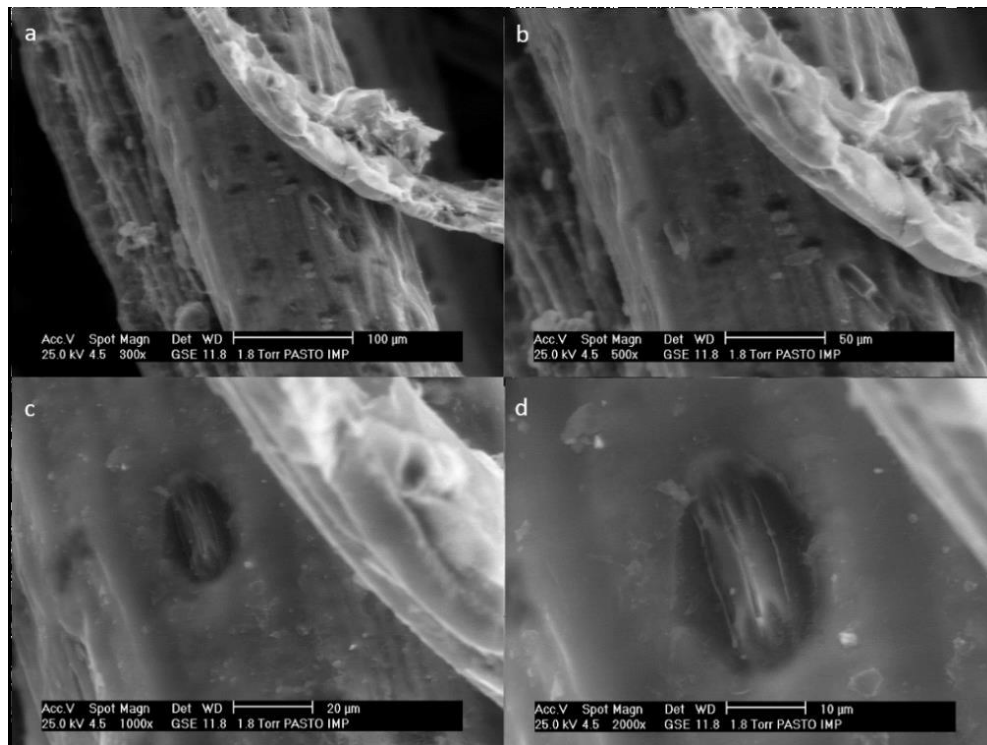


Fig. 3. Epidermis y estoma del pasto kikuyo seco: a) 300x b) 500x c) 1000x d) 2000x

En la Figura 4 se observa la epidermis del pasto kikuyo, la cual tiene los tricomas (o pelos) simples en forma de agujón, típicos de una gramínea; estos son útiles en la clasificación taxonómica (Aguirre, González, & S., 2000).

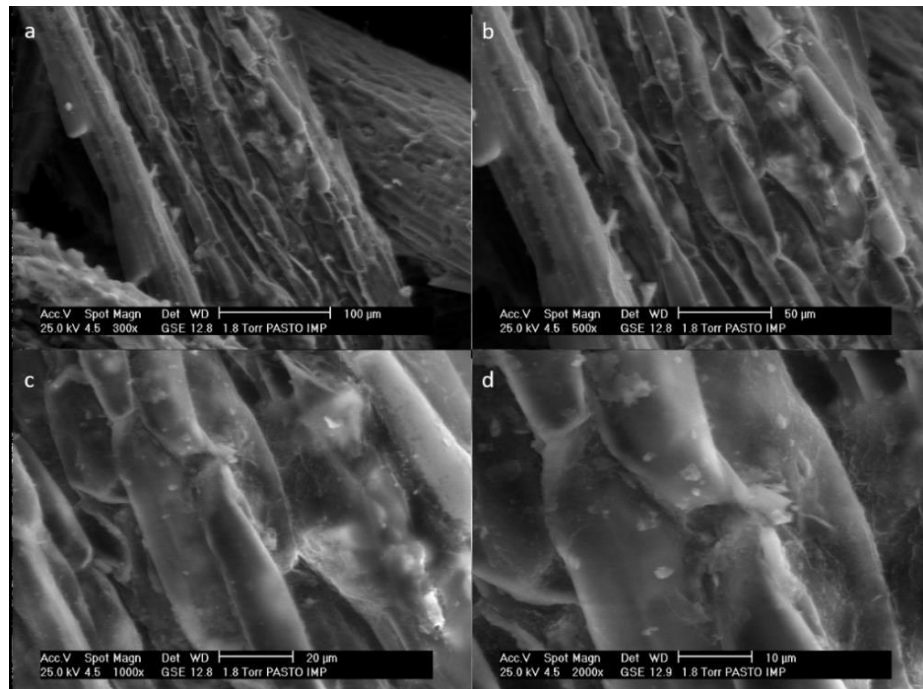


Fig. 4. Xilema del pasto kikuyo seco: a) 300x b) 500x c) 1000x d) 2000x

En la Figura 5 se observa con mayor claridad la epidermis del pasto con los “estomas”. Cada estoma está constituida por un par de células de forma arriñonada llamadas células oclusivas, las cuales poseen un núcleo y orgánulos celulares como cloroplastos. En las Figuras 6a a la 6d se observa un pequeño orificio que es llamado ostiolo, el cual abre o cierra para el intercambio gaseoso planta-medio ambiente (Aguirre, González, & S., 2000).

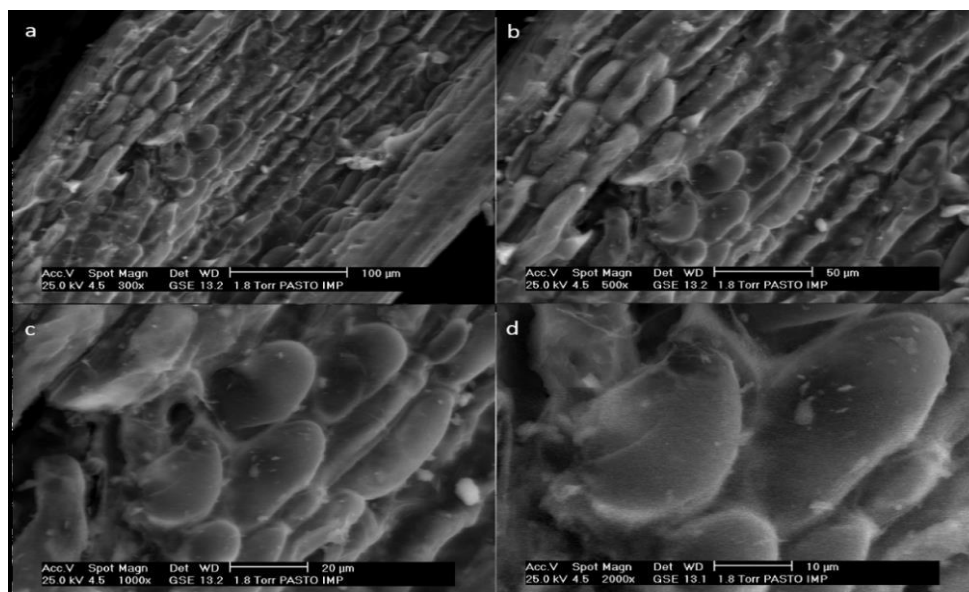


Fig. 5. Tricomas de la epidermis de pasto kikuyo seco: a) 300x b) 500x c) 1000x d) 2000x

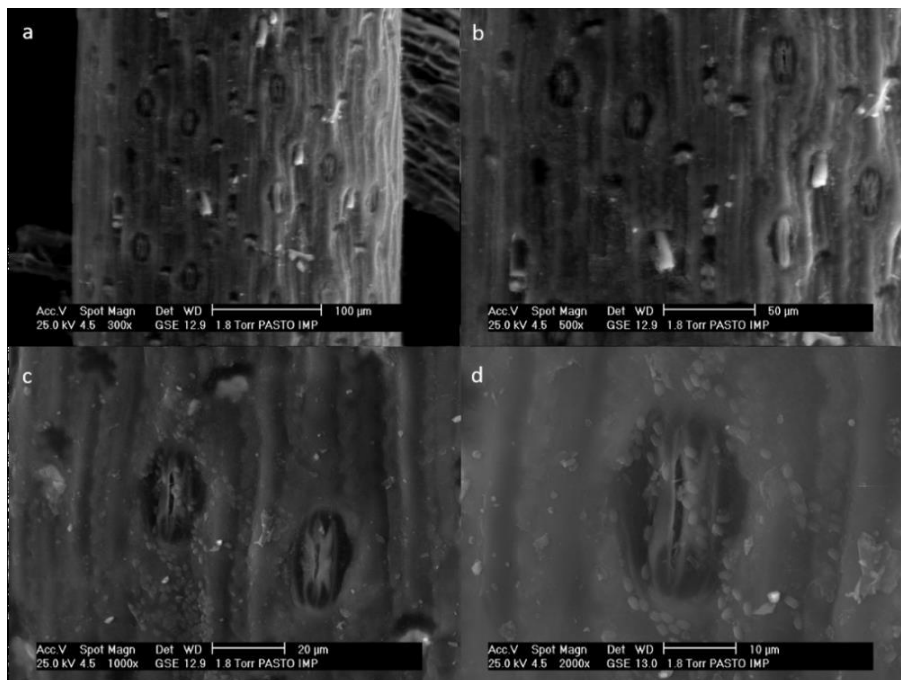


Fig. 6. Detalle de las estomas del pasto kikuyo seco: a) 300x b) 500x c) 1000x d) 2000x.

Lavado de pasto: El lavado del pasto se realizó con el fin de identificar la cantidad de azúcares presentes en la muestra sin pretratamiento y sin sacarificación (Vázquez, 2012). Los azúcares reductores obtenidos fueron de 0.0024 ± 0.03 % (p/p) y azúcares totales de 0.0037 ± 0.04 % (p/p). Estos valores se tomaron como indetectables para cálculos posteriores.

Velocidad de sacarificación de pasto: El pasto seco, molido y tamizado se sometió a una sacarificación con el coctel enzimático E9 durante 5 h (Figura 7b), obteniendo los azúcares descritos en la Tabla 2.

Tabla II. Azúcares obtenidos durante la sacarificación.

| Tiempo, h | 3 | 5 |
|-----------------------------|------------------|------------------|
| Azúcares reductores % (p/p) | 26.36 ± 1.69 | 47.81 ± 0.05 |
| Azúcares totales % (p/p) | 31.59 ± 1.94 | 48.46 ± 3.73 |

Como se observa en la Figura 7a, el pasto tamizado se hidrata con el buffer utilizado, mientras que en la Figura 7b, se obtiene una mezcla homogénea color verdosa, esto se debe a la acción del coctel enzimático sobre la biomasa.

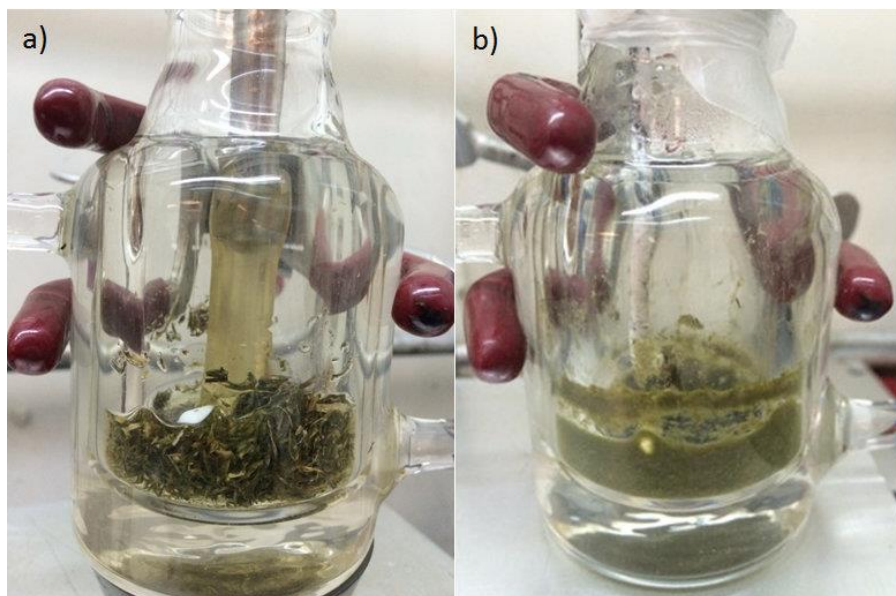


Fig. 7. Sacarificación enzimática en reactor de vidrio enchaquetado a) Tiempo cero, b) 5 h de reacción.

Con relación a los azúcares obtenidos en la caracterización, el rendimiento del proceso fue de 49.46 % y 89.7 % para azúcares reductores a 3 y 5 h de reacción y de 59.27 % y 89.01 % para azúcares totales a 3 y 5 h de reacción, respectivamente. Por ello, se puede mencionar que el pasto kikuyo muestra susceptibilidad al ataque enzimático del coctel utilizado (Gutiérrez., 2015).

En la Figura 8, se muestra la epidermis del pasto con gránulos blancos, los cuales son residuos del coctel enzimático que se adhirieron al pasto para su rompimiento. En la figura 9 se observan los tricomas del pasto, los cuales fueron invadidos por el coctel enzimático y ahora los residuos de este, invaden la epidermis. La Figura 9d muestra, en la esquina superior izquierda, un ostiolo cerrado. En la Figura 10a, se observa la epidermis del pasto destruida por la acción del coctel enzimático. En el centro de la Figura 10c se observa un ostiolo cerrado y nuevamente se observan gránulos blancos productos del ataque enzimático.

Como se puede apreciar en las micrografías de las Figuras 7 a la 11 a diferentes ampliaciones del campo, el pasto a 5 h de reacción podría presentar huellas de la deslignificación (Figura 11) causada por la hidrólisis del coctel enzimático (puntos blancos), los cuales se encuentran distribuidos en todos los campos. Para estas micrografías, fue necesario secar el pasto en un horno durante 72 h para su visualización en el microscopio de barrido electrónico.

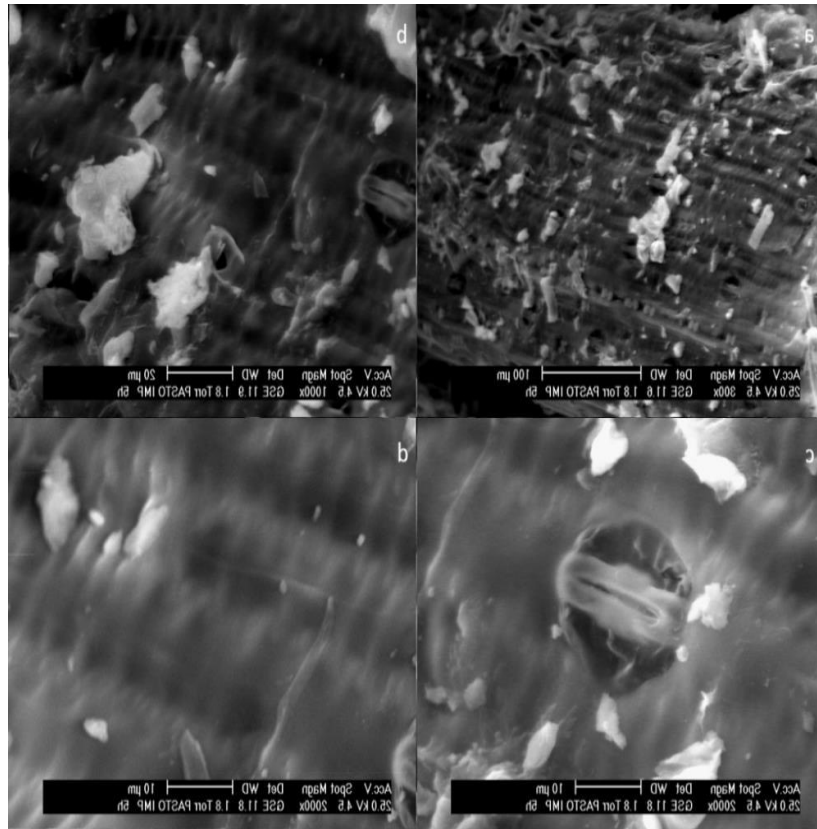


Fig. 8. Epidermis con gránulos blancos del pasto: 5 h de sacarificación; a) 300x b) 500x c) 1000x d) 2000x.

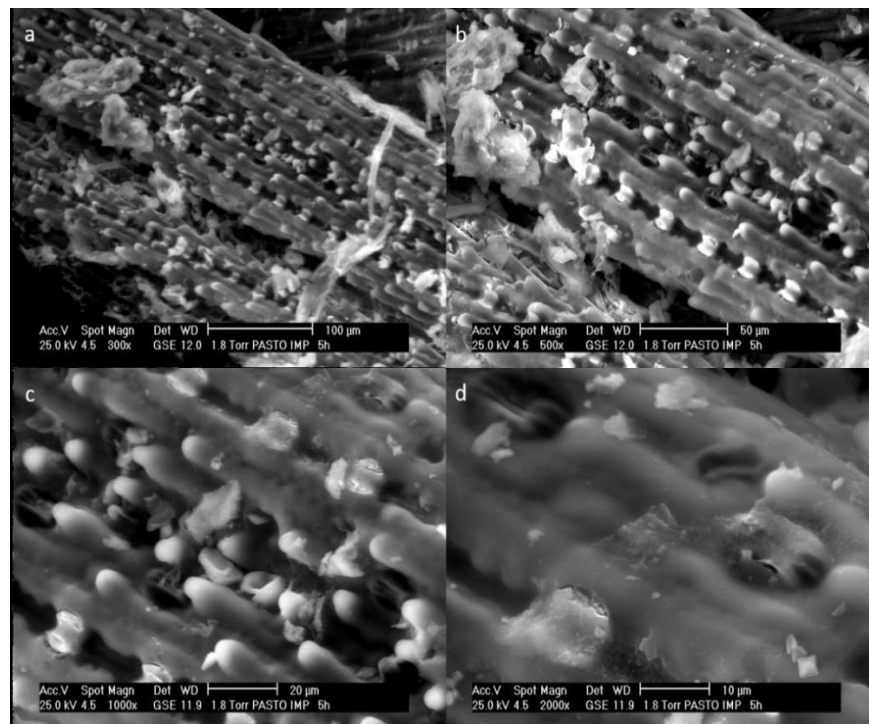


Fig. 9. Tricomas del pasto kikuyo invadidos: 5 h de sacarificación; a) 300x b) 500x c) 1000x d) 2000x.

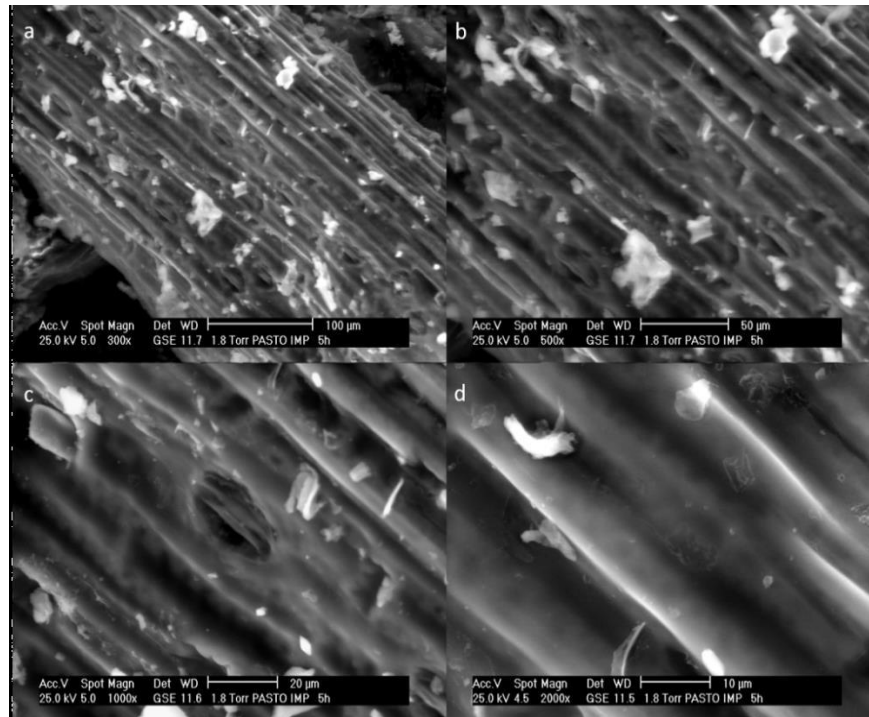


Fig. 10. Epidermis destruida por la enzima: 5 h de sacarificación; a) 300x b) 500x c)1000x d) 2000x.

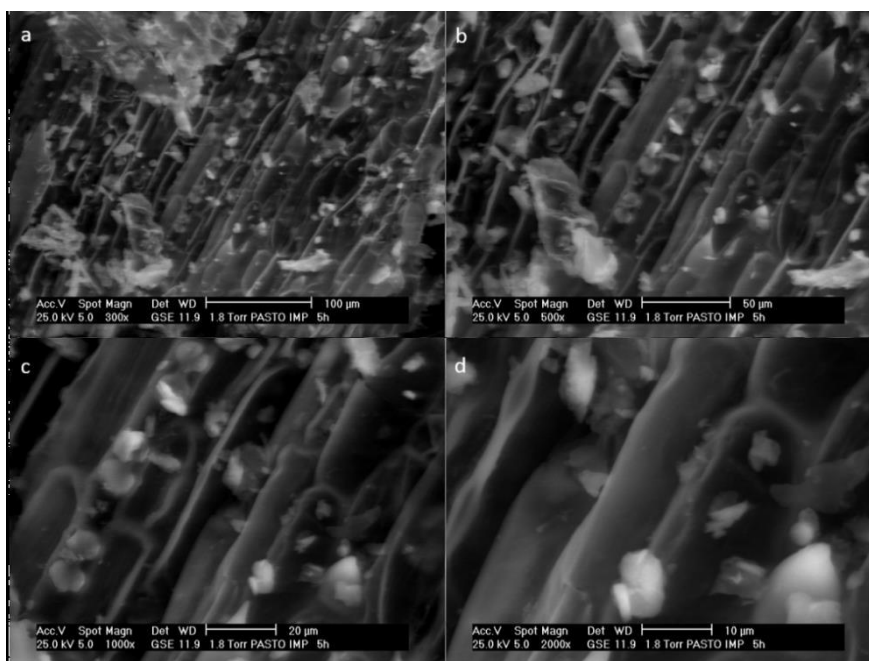


Fig. 11. Huellas de deslignificación: 5 h de sacarificación; a) 300x b) 500x c) 1000x d) 2000x.

El blanco de buffer y la enzima arrojaron la cantidad de 9.2 % (p/p) de azúcares reductores y 30.36 % (p/p) de azúcares totales en la muestra, los cuales se restan a la cantidad de azúcares obtenidos en las posteriores sacarificaciones. El blanco de buffer y pasto arrojó la cantidad de 1.75 ± 0.038 % (p/p) de azúcares reductores y 2.26 ± 0.04 % (p/p) de azúcares totales en la muestra.

Como se muestra en la Figura 12, la humedad del pasto (70 %) a 15 min se vuelve asintótica. Estas pruebas se realizaron para investigar si la extrusión puede ser una alternativa para manejar el pasto.

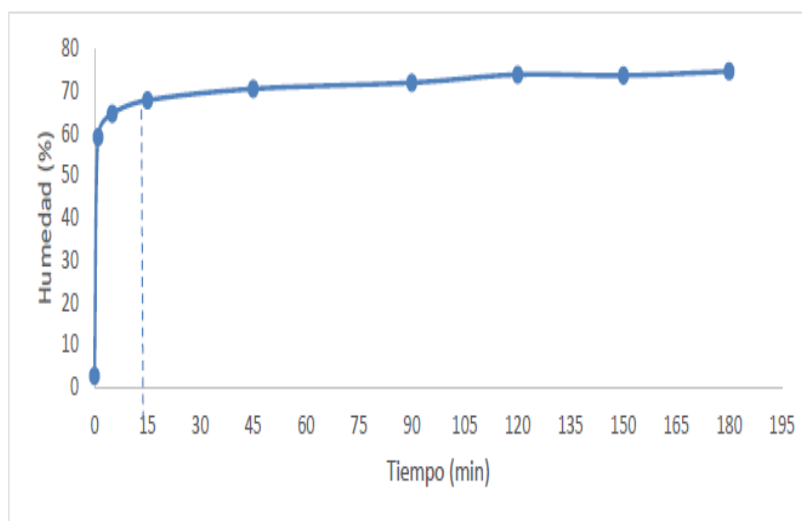


Fig. 12. Velocidad de humidificación del pasto kikuyo.

Se sometió el pasto a una extrusión y así disponerlo a la reacción de sacarificación; el rendimiento promedio de la sacarificación del pasto extruido y del tamizado fue de 18.19 % y 18.65 %, respectivamente, para azúcares reductores a 3 y 5 h de reacción y de 55.92 % y 63.92 % para azúcares totales a los mismos tiempos de reacción. El rendimiento fue mayor que el obtenido en la sacarificación del pasto extruido, pues al aumentar la superficie de contacto del pasto con el coctel enzimático, la hidrólisis se vuelve más efectiva (Vázquez, 2012). Por lo anterior, el pretratamiento de extrusión, con las condiciones descritas para este material, no es apto para la recuperación de azúcares y de acuerdo con la sacarificación de pasto sin pre tratar, es suficiente con la hidrólisis enzimática para alcanzar un rendimiento de casi 90 % de recuperación de azúcares fermentables. Por ello, se mantuvieron como promisorios estos resultados de sacarificación enzimática y se procedió a realizar una prueba de escalamiento en un biorreactor de mayor tamaño.

A. Escalamiento de la sacarificación

El escalamiento de la sacarificación consistió en pasar de la escala de vidrio (recipiente de 50 ml) a un reactor de 2 l y se realizó con pasto seco molido y tamizado con malla No. 60 (0.25 mm) sin pre tratar. En la prueba de 2 l se llevó a cabo la sacarificación en una celda considerada de ultrafiltración, mostrada en la Figura 13 y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla III. Velocidad de formación de azúcares reductores y totales en el escalamiento 2 l.

| Tiempo, h | Azúcares Totales (%p/p) | Azúcares Totales (%p/p) |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 0 |
| 1 | 10.76 | 13.87 |
| 2 | 11.52 | 23.66 |
| 3 | 13.33 | 31.10 |
| 4 | 14.58 | 35.36 |
| 20 | 13.74 | 35.54 |
| 22 | 14.76 | 43.67 |
| 24 | 18.63 | 44.06 |
| 26 | 24.02 | 45.41 |
| 44 | 25.17 | 34.36 |
| 45 | 23.54 | 31.32 |



Fig. 13. Celda de ultrafiltración.

Como se observa en la Figura 14, la cantidad de azúcares reductores es mayor a la cantidad de azúcares totales, lo cual se considera incongruente, siendo los azúcares totales los oligosacáridos y polisacáridos presentes en la muestra; estos bajo una hidrólisis ácida producen monosacáridos (Cruz, 2007) y los azúcares reductores que son aquellos que no pueden ser hidrolizados a moléculas de azúcar más pequeños (García, 2009).

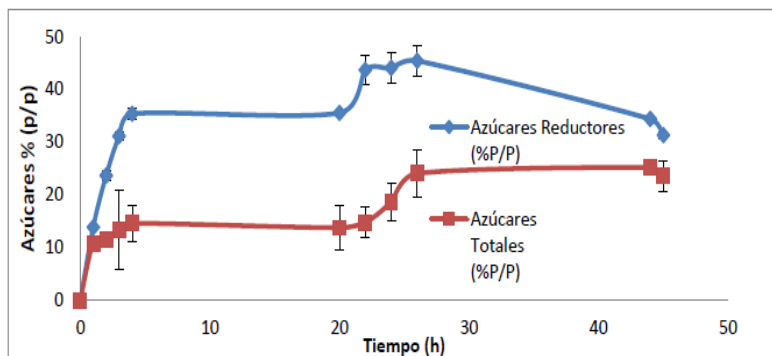


Fig. 14. Formación de azúcares totales y reductores en la sacarificación en celda de ultrafiltración.

Por lo anterior, se sometió al pasto a una prueba de invertasa, la cual se realizó por medio de una velocidad de reacción en donde se agregó pasto seco, molido y tamizado en una solución de sacarosa en buffer y se incubó a 50° C y 150 rpm, durante 24 h. Las muestras obtenidas se analizaron por HPLC y los resultados se muestran en las Figuras 15, 16, 17 y 18, para tiempos de reacción de 0, 1, 3 y 19 horas, respectivamente.

Como se observa en la Figura 15 el pico que se muestra entre 20 y 25 min, es sacarosa, el cual es convertido en glucosa y fructosa como se muestra en la Figura 16 y 17 (picos entre 10 y 15 min), hasta llegar a un punto en que el pico de sacarosa es indetectable, ya que ha completado su conversión en glucosa y fructosa a las 19 h de reacción que se observa en la Figura 18.

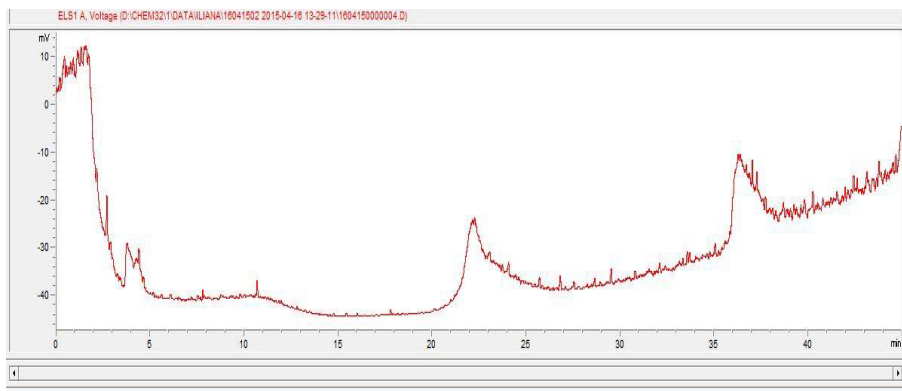


Fig. 15. Cromatograma del blanco de sacarosa (Tiempo 0).

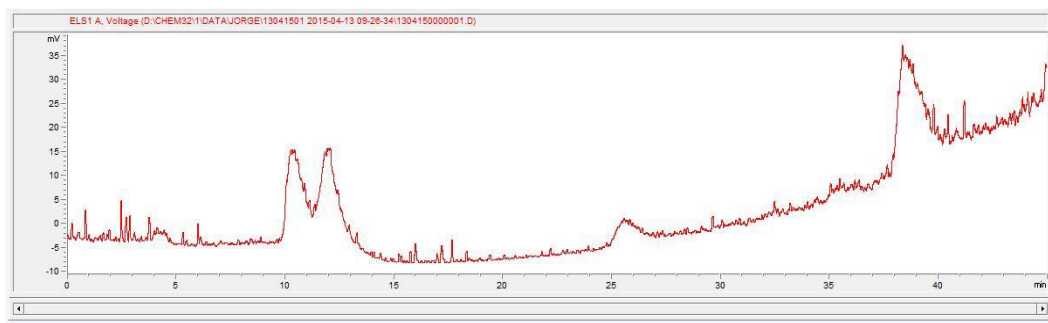


Fig. 16. Cromatograma del pasto con solución de sacarosa a 1 h de reacción.

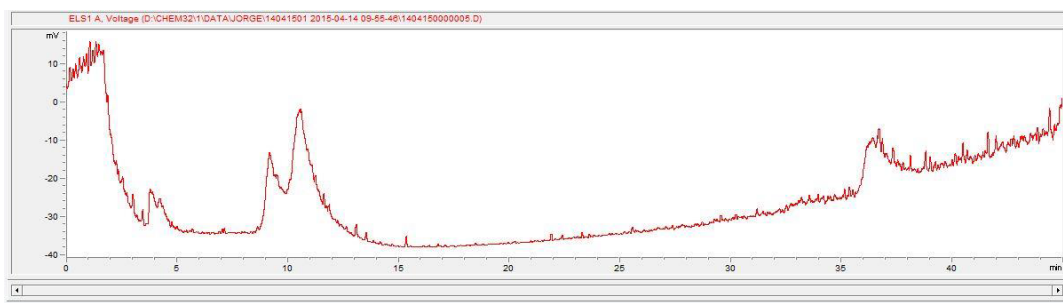


Fig. 17. Cromatograma del pasto con solución de sacarosa a 3 h de reacción.

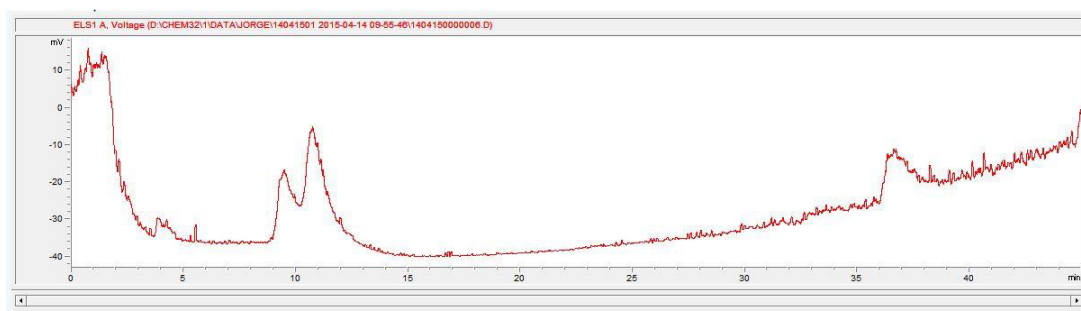


Fig. 18. Cromatograma del pasto con solución de sacarosa a 19 h de reacción.

El pasto kikuyo es considerado una maleza, por lo que el herbicida HERBOSATO basa la efectividad de su producto en la disminución de enzima invertasa ácida, por lo que disminuyen los niveles de fructosa y glucosa. Como consecuencia, menos sacarosa se desdobla para ser utilizada en crecimiento y se promueve su almacenamiento en las células, principalmente en el tercio superior del tallo (Drokasa Perú)¹.

Por lo tanto, la cantidad de azúcares reductores descrita en la Tabla 4, son azúcares pertenecientes no sólo a la sacarificación enzimática del pasto, sino también azúcares presentes en el coctel enzimático hidrolizados por el pasto. Dicho esto, se realiza un ajuste en los cálculos para determinar la cantidad de azúcares reductores que sólo se obtiene por sacarificación enzimática del pasto y se obtiene lo que se observa en Tabla 4 y en la Figura 19.

¹ Drokasa, Perú (2011). <http://www.drokasa.com.pe/HERBOSTATO%20.pdf>

Tabla IV. Azúcares totales y reductores obtenidos a las 24 h de sacarificación.

| Tiempo, h | Azúcares Totales (%p/p) | Azúcares Reductores (%p/p) |
|-----------|-------------------------|----------------------------|
| 24 | 23.73 ± 2.89 | 22.93 ± 2.9 |

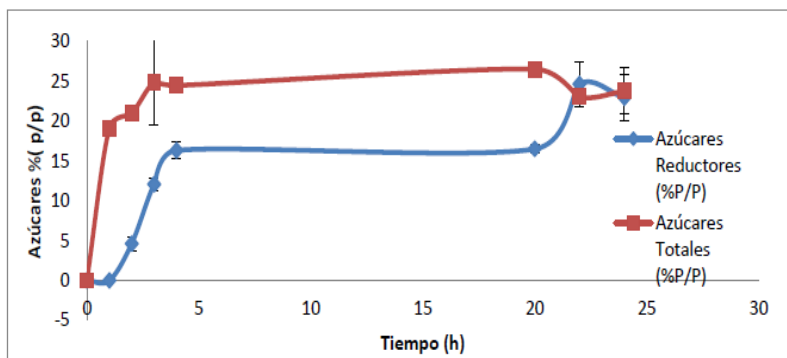


Fig. 19. Velocidad de sacarificación corregida.

En el escalamiento de la sacarificación se obtuvo que un 96.62 % de los azúcares totales son reductores y el rendimiento global (con respecto a los azúcares obtenidos en la caracterización) de recuperación de azúcares fue de 43.58 % para azúcares totales y 43.02 % para azúcares reductores. El jarabe obtenido de este escalamiento se sometió a fermentación y el caldo de esta se destiló para su separación a etanol.

B. Fermentación Alcohólica

Se realizaron dos fermentaciones (Matraz 1 y Matraz 2) simultáneas durante 72 h, se tomaron muestras en diferentes tiempos y se analizaron de acuerdo con lo descrito en la metodología, los resultados se muestran en las Figuras 20 y 21. La velocidad de crecimiento microbiano se determinó por la densidad óptica y una interpolación con una curva patrón. En la Figura 20 se observa un comportamiento típico de crecimiento microbiano para el matraz 2, mientras que para el matraz 1 se observa un decrecimiento en la cantidad de biomasa.

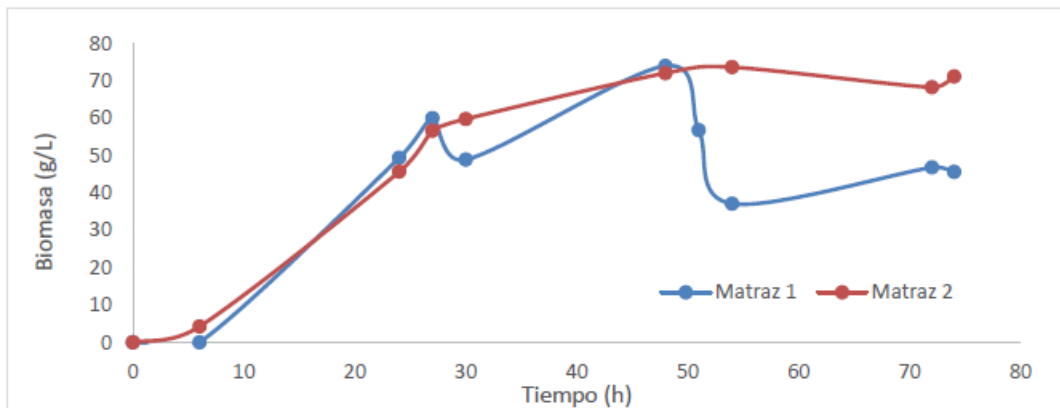


Fig. 20. Velocidad de crecimiento microbiano.

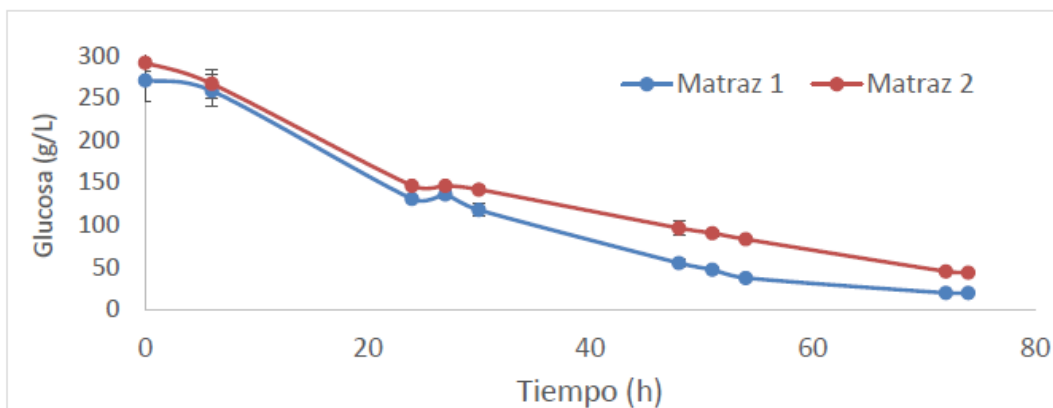


Fig. 21. Velocidad de consumo de fuente de carbono (Método fenol-sulfúrico).

La velocidad de producción de etanol se realizó mediante cromatografía de gases e interpolando en la curva patrón de etanol 1-10 % y 10-90 %.

La Figura 21 muestra la disminución de glucosa respecto al tiempo. De acuerdo con esta gráfica, se obtuvo la cantidad de sustrato consumido, restando la glucosa determinada en el tiempo de 74 h, a la glucosa suministrada a tiempo cero.

Con objeto de corroborar la concentración de la glucosa obtenida por el método de fenol-sulfúrico que se muestra en la Figura 21, se graficó en la Figura 22 la concentración de la glucosa contra el tiempo utilizando el método de calibración por índice de refracción. Ambas Figuras muestran una coincidencia en la disminución de lo glucosa.

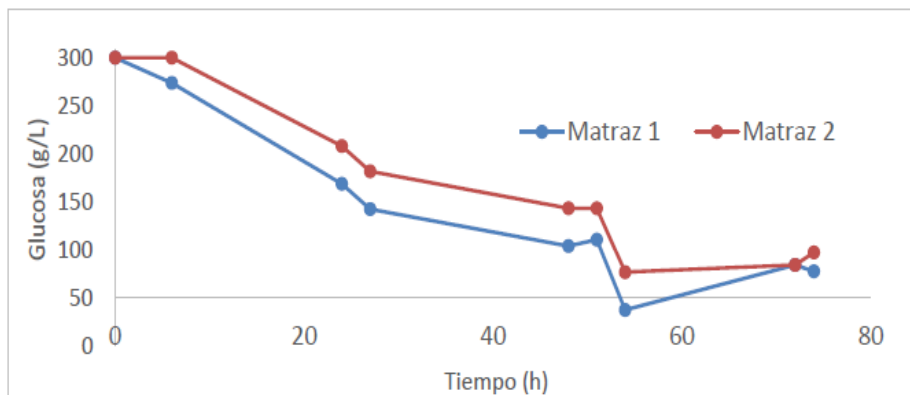


Fig. 22. Velocidad de consumo de fuente de carbono (Método: Índice de Refracción).

En la Figura 23 se muestra la producción de bioetanol en donde se da un aumento en la concentración de etanol con respecto al tiempo en ambos matraces.

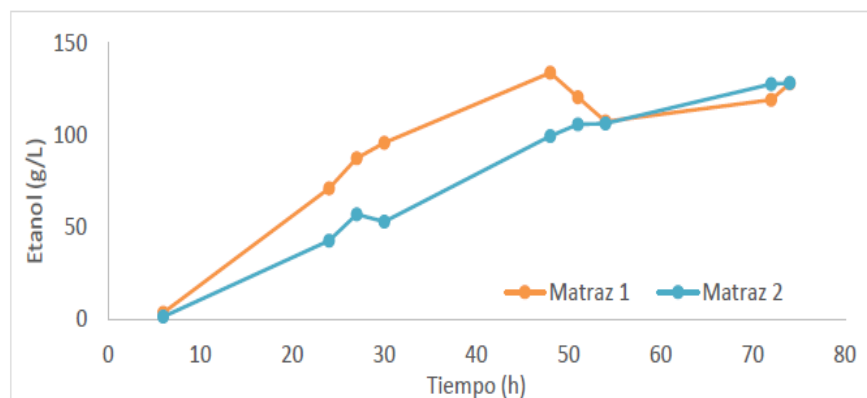


Fig. 23. Velocidad de producción de etanol.

Las Figuras 24 y 25 muestran las velocidades obtenidas por matraz, en las cuales se observa el incremento de la biomasa y de la producción de etanol y la disminución del sustrato (azúcares totales). Estas Figuras reflejan los datos mostrados en Tabla 5 con los valores necesarios para la obtención de los rendimientos para la fermentación.

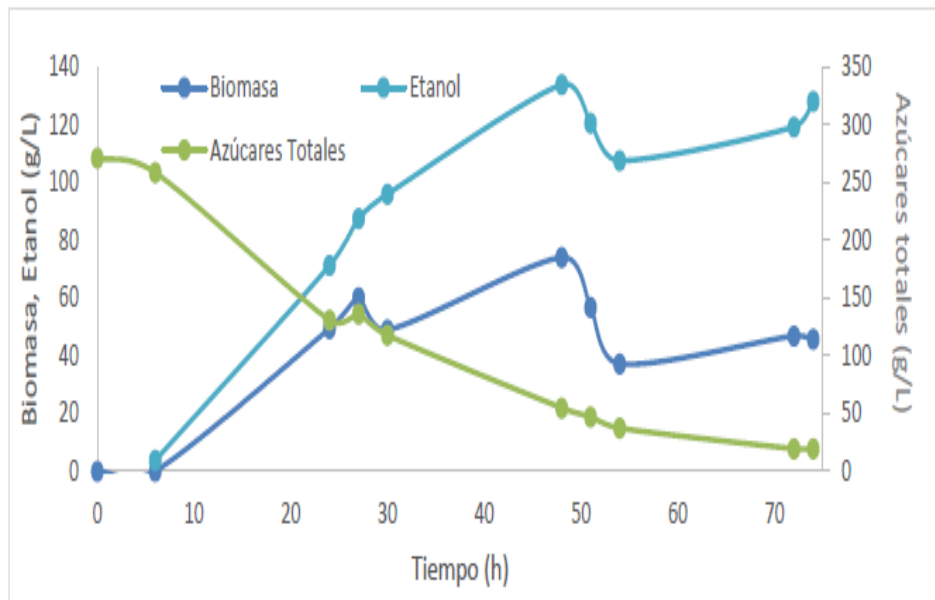


Fig. 24. Velocidades obtenidas del matraz 1.

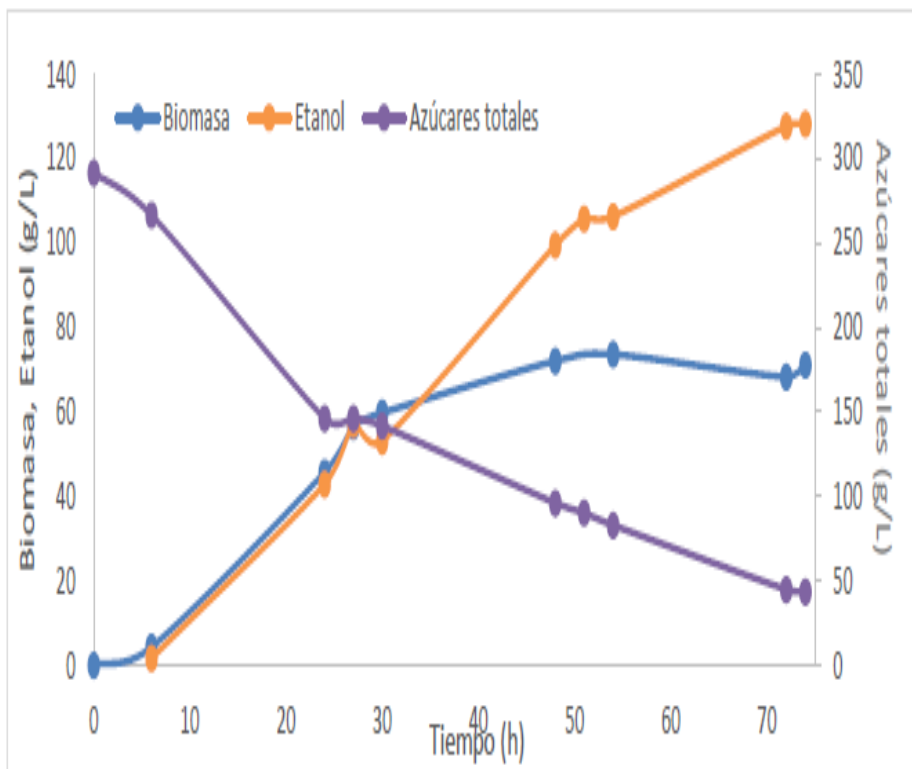


Fig. 25. Velocidades obtenidas del matraz 2

Tabla V. Datos obtenidos a las 74 h de fermentación de los matraces 1 y 2

| | Matraz 1, g/l | Matraz 2, g/l |
|--------------------|---------------|---------------|
| P= Producto | 127.997 | 128.269 |
| X=Biomasa | 45.610 | 71.137 |
| S=Sustrato | 251.388 | 248.119 |

A partir de las cantidades de biomasa, producto y sustrato se determinaron los rendimientos usando las expresiones sugeridas por Mutharasan, (1996):

$$Y_{p/x} = [\text{Producto formado (etanol)}] / [\text{Biomasa formada}]$$

$$Y_{p/s} = [\text{Producto formado (etanol)}] / [\text{Consumo de sustrato}]$$

$$Y_{x/s} = [\text{Biomasa formada}] / [\text{Consumo de sustrato}]$$

La Tabla 6 resume los rendimientos $Y_{p/x}$, $Y_{p/s}$ y $Y_{x/s}$ obtenidos.

Tabla VI. Rendimientos obtenidos para la biomasa, el producto y el sustrato

| Rendimiento | Matraz 1 | Matraz 2 |
|-------------|----------|----------|
| $Y_{p/x}$ | 2.806 | 1.803 |
| $Y_{p/s}$ | 0.509 | 0.516 |
| $Y_{x/s}$ | 0.181 | 0.286 |

Estequiométricamente, el factor de conversión de glucosa a etanol es de 0.51 g etanol/ g azúcar (Manzanares, 2015), el cual es representado por el valor $Y_{p/s}$ y se obtuvo un rendimiento de conversión de azúcares del 100 %.

El etanol carburante que se mezcla con la gasolina regular debe ser anhidro (Duarte P., 2006) por lo que el etanol obtenido en este trabajo no es viable para su uso como carburante. Para obtener el etanol en su forma más pura se requiere de una destilación azeotrópica como un método de purificación, siendo todavía el procedimiento más actual en el tratamiento de disolventes termolábiles no miscibles con agua e impurificados con contaminantes líquidos².

Este bioetanol obtenido puede utilizarse en muchos sectores industriales, como la elaboración de ambientadores y perfumes (etanol al 70 %). La industria química lo utiliza como compuesto de partida en la síntesis de productos como el acetato de etilo (disolvente para pegamento, pinturas, etc.), el éter di-etílico y podría aprovecharse por sus propiedades desinfectantes.

III. CONCLUSIONES

El entendimiento de la relación propiedad-estructura de la superficie es esencial para un mayor desarrollo y un diseño racional de materias primas; en este caso para la utilización del pasto kikuyo.

² Basurto, J.S. (2008).<http://operaciones-unitarias-1.wikispase.com/Tipos+de+destilación>

De acuerdo con el contenido de azúcares totales (54.44 %p/p) y azúcares reductores (53.29 %p/p) se definió que el pasto es un material lignocelulósico con potencial para la producción de bioetanol.

Al cuantificar el bioetanol obtenido por el proceso de sacarificación y fermentación se determinó que la pureza de la fracción 2 y 3 presentaron el 70 % y 30 %, respectivamente, con un rendimiento molar de 0.51 (producto/sustrato), lo cual indicó una conversión del 100 % de azúcares totales a bioetanol.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el bioetanol no podría ser utilizado como carburante debido a que no es anhidro. Sin embargo, se podría utilizar en la industria de ambientadores o perfumes o como precursor para la síntesis de productos tales como el acetato de etilo o éter di-etílico; otra consecución es la de proseguir hacia el desarrollo biotecnológico del bioproceso investigando las bioseparaciones requeridas para obtener el etanol puro y llevar a cabo, también, un estudio de rentabilidad que muestre la viabilidad del bioproceso.

IV. RECONOCIMIENTOS

A CONACyT por la facilidad de participar en el proyecto 153070(Y.60013) “Desarrollo y adaptación de tecnologías para la conversión de productos lignocelulósicos en etanol carburante”.

V. REFERENCIAS

- Aguirre, M., González, A., & S., J. (2000). Las plantas y su estructura I. Recuperado el 1 de Agosto de 2016, de <http://www.efn.unc.edu.ar/departamentos/biologia/intrbiol/planta1.htm>
- Cardona, E. M., Ríos, J. A., Peña, J. D., & Ríos, L. A. (2013). Pretratamiento alcalino de pasto elefante. *Información Tecnológica*, 24(5), 69-80.
- Cardona, E. M., Ríos, J. A., Peña, J. D., & Ríos, L. A. (2013). Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum* sp) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la producción de Bioetanol. *Información Tecnológica*, 24(5), 69-80.
- Cruz, F. (2007). Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México., Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química., México.
- Duarte P., V. M. (2006). Especificaciones de la calidad del etanol carburante y del gasohol (Mezcla de gasolina y etanol) Normas Técnicas para la infraestructura. Comisión Económica para América Latina y el Caribe-CEPAL.
- García, H. (2009). Comunicación personal. Facultad de Química de la UNAM.
- Gutiérrez., J. C. (2015). Estudio del pretratamiento por extrusión del pasto IMP para la obtención de bioetanol. Tesis de Licenciatura, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Ciudad de México.
- JP, M. (2001). Factors affecting the nutritive value of kikuyo grass (*Pennisetum clnadestinum*) - a review. (35), 65-84.
- Manzanares, P. (2015). Pretratamiento de extrusión reactiva para la producción de bioetanol a partir de paja de cebada. España: Tesis de Doctorado. Universidad de Valladolid. Escuela de Ingenierías Industriales. Dpto. de Ing. Quim. y Tec. del Medio Amb.
- Martínez, D. I. (2012). Manual de técnicas analíticas para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. Instituto Mexicano del Petróleo: Proyecto Y.O2000.
- Mateus, L. (2011). Evaluación de los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido y AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante "*Pennisetum* sp". Bogotá, D.C., Colombia: Universidad Nacional de

Colombia. Facultad de Ingeniería. Dpto. de Ingeniería Química y Ambiental. Laboratorio de Investigaciones en Combustibles y Energía.

- Monsalve, J., & Gómez, J. (2016). Biología. (Ucoz Página Web) http://biologia.ucoz.com/Xilema_y_floema.gif
- Mussatto, S., & Teixeira, J. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 897-907.
- Mutharasan, R. (1996). *Bioreactors. Engineering Biotechnology. Gateway Project*. Philadelphia: Drexel University.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., C. Scarlata, J. S., & Crocker, D. (2011). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. (T. National Renewable Energy Laboratory/TP-510-42618, Ed.) *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*.
- Vázquez, T. (2012). Evaluación de la Hidrólisis Enzimática de Bagazo de Sorgo para la Obtención de Azúcares Fermentables a Etanol y Efecto de Diferentes Tratamientos. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Química, México, D.F.