



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Producción de azúcares fermentables a partir de *Lupinus rotundiflorus* aplicando pretratamientos físicos y químicos e hidrólisis enzimática

Tesis

que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Presenta

J. Jesús Vargas Radillo

DIRECTOR

Dr. Mario Alberto Ruíz López

CODIRECTOR

Dr. Fernando López-Dellamary Toral

Zapopan, Jalisco

22 de junio de 2012

Dedicatoria

A mi esposa Lucy y a mis hijos Sofi y Chuy.

A mis hermanos y hermanas.

A mis padres (qepd).

Agradecimientos

Expreso mi reconocimiento y agradecimiento sincero a los profesores del posgrado BEMARENA por el apoyo recibido y por permitirme participar en el doctorado. En especial a los profesores integrantes del cuerpo tutorial, asesores y jurado, así como todas aquellas personas que de alguna forma intervinieron en el desarrollo del proyecto.

Índice

Resumen	viii
Abstract	ix
1. Introducción	x
2. Antecedentes	1
2.1 Materia prima (<i>Lupinus rotundiflorus</i>).....	1
2.2 Materiales lignocelulósicos.....	3
2.2.1 Celulosa.....	5
2.2.2 Hemicelulosa.....	7
2.2.3 Lignina.....	8
2.3 Transformación de la biomasa.....	10
2.3.1 Procedimientos de transformación.....	10
2.3.2 Sacarificación de los polisacáridos (Pretratamientos).....	12
2.4 Deslignificación en medio ácido.....	15
2.4.1 Perácidos.....	16
2.4.2 Polioxometalatos y heteropolianiones (POMs).....	17
2.5 Hidrólisis enzimática.....	19
2.5.1 Factores que afectan la hidrólisis enzimática.....	22
2.5.1.1 Características estructurales.....	23
2.5.1.2 Condiciones de reacción.....	23
2.6 Literatura citada.....	24
3. Hipótesis	30
4. Objetivo General	31
4.1 Objetivos particulares.....	31
5. Material y Métodos	32
5.1 Diagrama de flujo.....	32
5.2 Biomasa.....	33
5.3 Preparación y caracterización de la biomasa.....	33
5.4 Pruebas de control.....	34
5.4.1 Evaluación de monosacáridos.....	34
5.4.2 Prueba de papel filtro para sacarificación (Ensayo FPU).....	36
5.4.3 Azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	38
5.5 Azúcares fermentables con HCl concentrado.....	40
5.5.1 Preparación de HCl a 32% y 42.6%.....	40
5.5.2 Hidrólisis (método Bergius-Rheinau modificado).....	41
5.6 Pretratamiento con UV en medio alcalino y digestión enzimática.....	42
5.6.1 Fotoreactor Rayonet.....	42
5.6.2 Pretratamiento con UV en medio alcalino (procedimiento).....	42
5.6.3 Digestión enzimática.....	44

5.7	Pretratamiento con perácidos y polioxometalatos.....	44
5.7.1	Preparación de la mezcla de perácidos.....	44
5.7.2	Titulación de perácidos (Pxa) (oxígeno activo).....	45
5.7.3	Obtención de la sal de Keggin $\alpha\text{-K}_5[\text{SiVW}_{11}\text{O}_{40}]$	46
5.7.4	Pretratamiento con perácidos y sal de Keggin.....	46
5.8	Literatura citada.....	47
6.	Capítulos	49
	Fermentable sugars from <i>Lupinus rotundiflorus</i> biomass by concentrated hydrochloric acid hydrolysis	
	BioreSources (2011) 6(1):345-356.....	50
	Fermentable sugars from <i>Lupinus rotundiflorus</i> by photolysis, freezing-defreezing and enzymatic hydrolysis (borrador preliminar)	62
	Pretreatment of <i>Lupinus rotundiflorus</i> biomass using peracids mix and Keggin salt to improve enzymatic digestion (borrador preliminar)	71
7.	Conclusiones Generales	79
	Apéndices	81

Índice de Figuras

	Página
Fig.1	Fotografía de <i>Lupinus rotundiflorus</i> 1
Fig. 2	Nódulos en raíz de <i>L. rotundiflorus</i> 2
Fig. 3	Representación esquemática de la pared celular 4
Fig. 4	Microfibrillas de celulosa con enlaces tipo puente de hidrógeno enlazando moléculas vecinas formando cadenas 6
Fig. 5	Estructura de la celulosa 6
Fig. 6	Estructura básica de la glucuroxilana (izquierda) y modelo de la pared celular de la fibra, representando el efecto vinculante entre las xilanas y las microfibrillas 8
Fig. 7	Estructura simplificada de una sección del polímero de la lignina 9
Fig. 8	(A) Métodos de transformación de la biomasa (B) Productos obtenidos por hidrólisis de polisacáridos 11
Fig. 9	Representación esquemática de la alteración que sufre la pared celular debido a los pretratamientos 12
Fig. 10	Estructura de α -Keggin en su representación atómica y poliédrica 18
Fig. 11	Heteropolianión sustituido de Keggin (anión lagunar de Keggin), $[\text{SiVW}_{11}\text{O}_{40}]^{4-}$ 18
Fig. 12	Modo de acción catalítica enzimática y modelo computacional de la estructura de la exoglucanasa 21
Fig. 13	Esquema simplificado de algunos factores limitantes de la eficiente hidrólisis de la celulosa 22
Fig. 14	Diagrama de flujo experimental propuesto para la extracción de azúcares a partir de <i>L. rotundiflorus</i> , resaltando los tres métodos empleados 32
Fig. 15	Aspectos del procesamiento del <i>L. rotundiflorus</i> para la etapa experimental 33
Fig. 16	Molino Retsch GmbH 5657 HAAN con el que se efectuó la molienda del material 34
Fig. 17	Cromatógrafo Varian utilizado para el estudio de monosacáridos 35
Fig. 18	Preparación en el laboratorio de HCl al 42.6% 40
Fig. 19	Baño maría con agitación y temperatura controladas para efectuar la hidrólisis ácida de <i>L. rotundiflorus</i> 41
Fig. 20	Fotoreactor Rayonet, con lámparas intercambiables 42
Fig. 21	(A) muestra con agitación mecánica (B) fotoreactor trabajando 43
Fig. 22	Preparación de perácidos 45
Fig. 23	Preparación de sal de Keggin 46

Fig. 24	Baño de aceite de silicón.....	47
Fig. 25	Schematic representation of the acid saccharification of <i>L. rotundiflorus</i>	52
Fig. 26	Optical microscope micrographs of <i>L. rotundiflorus</i>	55
Fig. 27	Holocellulose (sugars) and lignin content variation in raw material (before hydrolysis) and in the insoluble residues after the two stage hydrolysis of <i>L. rotundiflorus</i> without leaves.....	57
Fig. 28	Effect of photolysis pretreatment on sugar concentrations present in the hydrolysate at different times of hydrolysis.....	67
Fig. 29	Plot chart of saccharification versus peracids mix (Pxa), % AO; polioxometalates (POMs) load, mMol/L; time, min; temperature, °C	75
Fig. 30	Response surface and main effects of digestion hydrolysis with Peracids mixture.....	76
Fig. 31	Curva de calibración para azúcares reductores	81
Fig. 32	Concentración de enzima para producir 2.0 mg/mL de glucosa	82
Fig. 33	Cromatograma del análisis HPLC de la planta de <i>L. rotundiflorus</i>	83
Fig. 34	Obtención de la concentración de la muestra problema utilizando el dato de azúcares reductores y la curva de calibración.....	89

Índice de Tablas

	Pagina
Tabla 1	Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos..... 13
Tabla 2	Volúmenes de ácido cítrico 0.1M y citrato de sodio 0.1M para obtener un buffer de pH determinado 39
Tabla 3	Pretratamiento aplicado a <i>L. rotundiflorus</i> en fotoreactor Rayonet 42
Tabla 4	Chemical composition and monosaccharide content of <i>L. rotundiflorus</i> plant parts (%)..... 56
Tabla 5	General chemical composition and monosaccharide content in <i>L. rotundiflorus</i> without foliage and after each of the stages of HCl hydrolysis (%)..... 56
Tabla 6	Hydrolyzed sugars yield after the different saccharification steps of <i>L. rotundiflorus</i> with HCl, insoluble residue and lost (unrecovered) material (%) 57
Tabla 7	Pretreatments applied to <i>L. rotundiflorus</i> grounded, in Rayonet reactor and their principals response variables..... 66
Tabla 8	Experimental conditions of treatments (2 ⁴ factorial design), and fermentable sugars yield (w/w) od raw material..... 74
Tabla 9	Estándares de glucosa a diferentes concentraciones..... 81
Tabla 10	Concentración de glucosa (como azúcares reductores) de las enzimas diluídas, necesarias en la prueba de evaluación de las unidades de papel filtro (FPU) de la celulasa comercial celluclast 82
Tabla 11	Datos obtenidos del cromatograma HPLC al analizar <i>L. rotundiflorus</i> 83
Tabla 12	Contenido relativo de monosacáridos en biomasa de <i>L. rotundiflorus</i> 84
Tabla 13	Contenido de monosacáridos como porcentaje de la biomasa original..... 85
Tabla 14	Rendimiento de azúcares y porcentaje relativo de monosacáridos en los 2 pasos de sacarificación de <i>L. rotundiflorus</i> con HCl 86
Tabla 15	Azúcares reductores de la biomasa de <i>L. rotundiflorus</i> tratada con UV a diferentes condiciones e hidrolizada enzimáticamente 87
Tabla 16	Contenido de H ₂ O ₂ y OA de la mezcla de perácidos, Pxa..... 91
Tabla 17	Azúcares reductores obtenidos con el método DNS, en el pretratamiento Pxa-POMs y digestión enzimática de <i>L. rotundiflorus</i> 92

Resumen

La biomasa lignocelulósica es una importante fuente de componentes orgánicos que pueden ser transformados en combustibles y otros productos químicos por medio de diversos métodos, entre ellos el pretratamiento y la hidrólisis enzimática, siendo la etapa crítica los pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos o biológicos.

Utilizando *Lupinus rotundiflorus*, el cual está disponible en amplias regiones geográficas de nuestra zona, como sustrato, se aplicaron tres secuencias de sacarificación: a) Ácido clorhídrico en dos etapas (método Bergius-Rheinau); b) pretratamiento con irradiación con luz ultravioleta en una suspensión alcalina y digestión enzimática; c) pretratamiento con mezcla de perácido (peracético y permonosulfúrico), polioxometalatos (sal de Keggin) más hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática fue hecha con una mezcla de celulasas, celobiasas y xilanasas.

Los métodos analíticos de control fueron: Evaluación del tipo y cantidad de monosacáridos medidos por HPLC cuando se aplicó el proceso Bergius-Rheinau; Azúcares reductores por el método DNS y espectrofotometría UV cuando se aplicaron los procesos de irradiación con luz en medio alcalino más hidrólisis enzimática y mezcla de perácidos y sal de Keggin más hidrólisis enzimática.

Con el proceso Bergius-Rheinau se obtuvo un rendimiento de 48.4% en azúcares fermentables respecto a la biomasa inicial, constituidos de 26.8% de glucosa, 13.2% de xilosa, 7.6% de otros azúcares, y 14.5% de lignina. Con el proceso de irradiación con luz en medio alcalino más hidrólisis enzimática se obtuvo un rendimiento de 51.8% en azúcares fermentables respecto a la biomasa, mientras que el pretratamiento con mezcla de perácidos y sal de Keggin más hidrólisis enzimática produjo un rendimiento del 57.9% en azúcares fermentables.

Aunque se obtuvieron rendimientos en azúcares fermentables relativamente altos en este proyecto, y con apoyo en la revisión de la literatura científica, se puede concluir que aún no se encuentra un proceso de sacarificación de los materiales lignocelulósicos que sea simultáneamente eficiente y económico y pueda competir con la utilización de sacarosa o almidón como materias primas para este fin, por lo que la investigación en este campo continua probando métodos. La radiación solar o la utilización de agentes químicos específicos que catalicen la oxidación de la lignina podría ser el camino para solucionar esta problemática.

Abstract

Lignocellulosic biomass is an important source of organic compounds that can be transformed into fuels and other chemicals, through various methods, including pretreatment and enzymatic hydrolysis, Pretreatment being the critical stage, it can be physical, chemical, physicochemical or biological.

Using *Lupinus rotundiflorus*, which is a largely available material in many geographic areas of our zone, as substrate, we applied three saccharification sequences: a) hydrochloric acid in two stages (Bergius-Rheinau process); b) pretreatment with UV light irradiation in an alkaline suspension and enzymatic digestion; c) pretreatment with mixture of peracid (peracetic and permonosulphuric) and polyoxometalates (Keggin salt) plus enzymatic hydrolysis.

Enzymatic hydrolysis was made in both cases with a mixture of cellulases, xylanases and celobioses.

The analytical methods of control were: type and amount of monosaccharides evaluated by HPLC when Bergius-Rheinau process was applied; reducing sugars by the DNS method and UV spectrophotometry when both light irradiation in alkaline media pretreatment plus enzymatic hydrolysis, and peracids mixture with Keggin salt plus enzymatic hydrolysis, were applied, for measuring the effectiveness of the saccharification.

With the Bergius-Rheinau process 48.4% of fermentable sugars respect to dry raw material was obtained, consisting of 26.8% glucose, 13.2% xylose, 7.6% other sugars, and 14.5% lignin. With UV irradiation in alkaline media pretreatment plus enzymatic hydrolysis process, 51.8% of fermentable sugars were obtained; while when peracids mixture and Keggin salt pretreatment plus enzymatic hydrolysis process was applied, 57.9% of fermentable sugars was obtained.

Although high fermentable sugars yield was obtained in this project, supported in the scientific literature review, we can conclude that it is not still a saccharification process of lignocellulosic materials which is simultaneously efficient and economical and can compete with the use of sucrose or starch as raw materials for this purpose, so that research continues in this field testing methods. Solar radiation or the use of specific chemicals for lignin oxidation could be the methods that solve this problem.

1. Introducción.

Las fuentes de energías renovables como alternativa a los combustibles fósiles, ha recibido un creciente interés entre los investigadores, interés que se incrementa en forma directa con la demanda de satisfactores, y el impacto en el desequilibrio térmico que provoca la emisión de gases (sobre todo dióxido de carbono) por la combustión de estos combustibles tradicionales. Entre estas energías renovables, la obtención de combustibles y otros productos útiles a partir de la biomasa, es una alternativa como fuente de energía debido a su abundancia, disponibilidad, y bajo o nulo precio de la misma.

Definida como “todo material orgánico producido por un proceso biológico natural en un ecosistema”, el primer y mayor uso de la biomasa es en la producción de los biocombustibles de primera generación (etanol, biodiesel y biometano) a partir del almidón de granos y tubérculos, de la sacarosa de caña de azúcar (*saccharum officinarum*) (Sánchez y Carmona, 2005), de gramíneas como el sorgo dulce (*Sorghum saccharum L.*) (Nuanpeng y col, 2010), y de plantas como la remolacha azucarera (*Beta vulgaris L.*) (Carter y col, 1982), y para producir diesel a partir de las semillas de oleaginosas. Estos biocombustibles son ampliamente producidos, incluso a nivel industrial, ya que los el almidón y la sacarosa pueden ser prácticamente fermentados de forma directa.

Los biocombustibles en general tienen a su favor su naturaleza renovable o regenerable en tiempo relativamente corto y su balance neutro de carbón, ya que el dióxido de carbono emitido por su combustión es capturado de nuevo por los vegetales, aunque los biocombustibles de primera generación, en particular, tienen el inconveniente de que la materia prima se utiliza de forma prioritaria en la alimenticia, por lo que su precio y disponibilidad se han dificultado.

Es por ello que se han explorado otro género de materias primas: la biomasa lignocelulósica (biocombustibles de segunda generación) y las algas que tienen un porcentaje alto de carbohidratos fermentables y lípidos en su estructura (biocombustibles de tercera generación).

La biomasa lignocelulósica no compite con las materias primas destinadas a la alimentación, son muy abundantes, y muchas veces son desechos no aprovechados de origen forestal, agrícola o agroindustrial como los son tallos, hojas y cáscaras, así como cultivos de especies con bajo contenido de lignina y rápido crecimiento destinados exclusivamente para este propósito. Otra ventaja es que no solo contiene carbohidratos, sino también otros componentes orgánicos

utilizables. La bioconversión de los residuos lignocelulósicos a productos útiles de alto valor agregado requiere de procesos multietapas, que incluye pretratamiento e hidrólisis para obtener moléculas metabolizables (hexosas o pentosas), lignina, lípidos y proteínas. Estos componentes sirven de sustrato para el crecimiento microbial o mediante técnicas de separación y purificación producir productos químicos (Sánchez, 2009).

El etanol no es el único producto que se puede obtener a partir de la fermentación de los carbohidratos, ya que la fermentación de la glucosa con microorganismos específicos permite obtener bioproductos de alto valor agregado como ácidos orgánicos, aminoácidos y vitaminas, mientras que por digestión anaeróbica se obtiene biogás, el cual puede utilizarse para generar electricidad o como combustible de los vehículos sustituyendo al gas natural. De igual forma, utilizando lignina como sustrato se obtienen diversos productos útiles, mientras que la xilosa como sustrato genera xilitol y furfural (Sánchez, 2009). Este sistema de aprovechamiento integral para producir multiproductos básicos y productos de química especializada, permite que estos sistemas de transformación compitan con la petroquímica básica.

Por otra parte, el principal obstáculo de las materias lignocelulósicas es la accesibilidad a los carbohidratos del agente hidrolizante, lo cual dificulta la transformación de los mismos en monosacáridos. La sacarificación de los materiales lignocelulósicos es un reto para la biotecnología, cuyo propósito es encontrar un método económico y sencillo. Se ha hecho amplia investigación al respecto, incluyendo la búsqueda de materias primas idóneas, alteración genética de éstas, y la aplicación a la materia prima, y el empleo de diversas condiciones de pretratamiento con agentes químicos o biológicos más hidrólisis enzimática (Ritter, 2008). Algunos de estos pretratamientos han logrado reducir el costo y mejoría en la facilidad de la hidrólisis, entre los que se puede mencionar: Explosión de vapor, con una planta industrial en Canadá (Iogen) y otra en España (Abengoa Bioenergy) que utilizan bagazo de caña, paja de trigo, pastos y residuos de madera; Ácido sulfúrico diluido con plantas en Suiza (Sekab) y Dinamarca; Oxidación en húmedo; Organsolv catalizado con sosa con la planta Lignol en Canadá, que aprovecha de manera integral glucosa, hemicelulosas y lignina (Harmsen y col, 2010).

Entre los materiales lignocelulósicos que han despertado interés para este fin, es la biomasa de los lupinos (*Lupinus sp*), debido a su adaptabilidad, propagación y rendimiento en biomasa. La empresa Biopol en Islandia pretende establecer una planta, la cual se encuentra en fase de construcción, para la producción de etanol y lignina a partir de biomasa de *Lupinus nootkatensis*.

En nuestro medio, algunas de estas especies de lupinos se adaptan y propagan fácilmente en diversas condiciones, aún adversas de clima y suelo, y se han reportado especies endémicas disponibles en estado silvestre, como el *Lupinus rotundiflorus*, por lo que se ha hecho investigación sobre el aprovechamiento integral de la misma (Zamora y col, 2009).

Esta investigación contempló el uso de pretratamientos no tradicionales para la sacarificación de biomasa de *L. rotundiflorus*, inmersa en la línea de investigación dedicada a la generación de energía y productos renovables sustentables.

2. Antecedentes

2.1 Materia prima (*Lupinus rotundiflorus*, M.E. Jones).

Los lupinos, *Leguminosae* (subfamilia *faboideae* o *papilonoideae*), agrupa alrededor de 300 especies; se encuentran ampliamente distribuidos en diversas regiones, principalmente en el oeste del continente americano desde Alaska hasta Argentina, y la cuenca del mar Mediterráneo (Mc Vough, 1987). Son hierbas, arbustos o subarbustos anuales o perenes, con amplia distribución en nuestro país. En México se tienen reportadas cerca de 100 especies de este género (Bermúdez y col, 2000). La variedad *Lupinus rotundiflorus* crece de forma silvestre en las montañas del pacífico en zonas perturbadas de los bosques de pino y encino a alturas de 1500 a 2000 msnm y en las orillas de los caminos. Esta especie crece abundantemente en los estados de México, Jalisco, Michoacán, Guanajuato y Nayarit. En Jalisco se ha reportado en los municipios de San Gabriel, Atemajac de Brizuela, Tapalpa, Talpa, Mascota, y Cd. Guzmán, aunque se desconoce si es una especie endémica de esta zona (McVaugh, 1987). *L. rotundiflorus* Es un arbusto ramificado, con corona basal formada por un pequeño tallo que sirve de base a múltiples ramas amacolladas (Fig. 1)

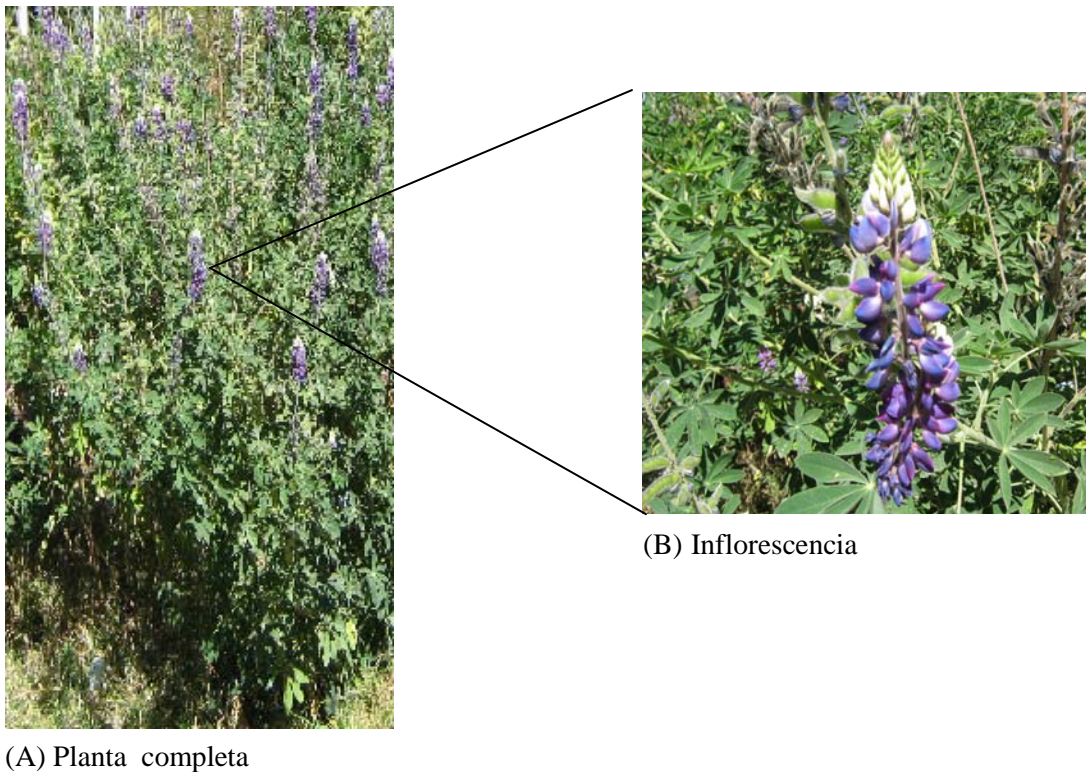


Fig. 1. Fotografía de *Lupinus rotundiflorus*.

Es una especie silvestre abundante, con posibilidad de colectar plantas y semillas para establecer cultivos y estudiarla (Ruiz y col. 2000). Los lupinos son plantas que tienen diversas propiedades útiles al ecosistema: Se distribuyen en zonas de amplia diversidad climática; algunas especies se desarrollan en zonas áridas, y contribuyen activamente a la fertilidad de los suelos en esas regiones. Estas especies desarrollan en su raíz (Fig. 2) diversos rizobios (*rhizobium bradyrhizobium*, *mesorhizobium* y *sinorhizobium*) (Zahran, 2001; Duthio y Pigeaire, 1993; Ayisi y col, 1992). Son especies capaces de fijar cantidades considerables de nitrógeno, hasta el nivel de 67-78% de sus propios requerimientos.



Fig. 2. Nódulos en raíz de *L. rotundiflorus*.

Una hectárea sembrada de lupino puede fijar en un año entre 150 y 316 Kg de nitrógeno (Larson y col. 1989), lo cual representa un aporte significativo a la sustentabilidad de los ecosistemas productivos. La etapa de acumulación de nitrógeno es mayor durante la floración, formación y crecimiento de la vaina, para disminuir durante el llenado de grano (Gataulina, 1990), lo que permite considerarlo como una alternativa interesante en la rotación de cultivos anuales.

Debido a que sus semillas son ricas en proteínas, aceite, carbohidratos y fibra, los lupinos son además utilizados para múltiples fines, tales como alimentación animal, plantas ornamentales y plantas de interés económico para forraje (Ishurd y col. 2006). Sin embargo, a pesar de la extensa información que existe de las características nutritivas de las semillas y otras propiedades, existe poca información sobre el aprovechamiento de los polisacáridos de los lupinos como fuente fermentable para la producción de diversos productos útiles de valor agregado.

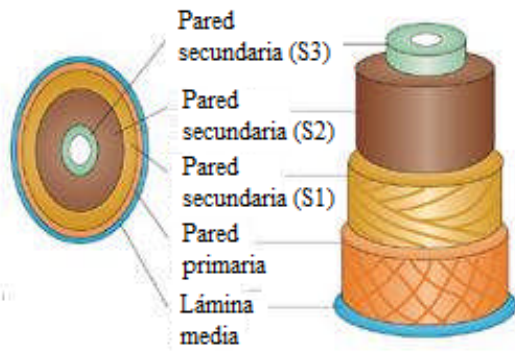
L. rotundiflorus y el resto de lupinos, adquiere especial atención por su amplia distribución en Jalisco, y también por la amplia biomasa que desarrolla debido a las múltiples ramas y gran sistema radicular.

2.2 Materiales lignocelulósicos.

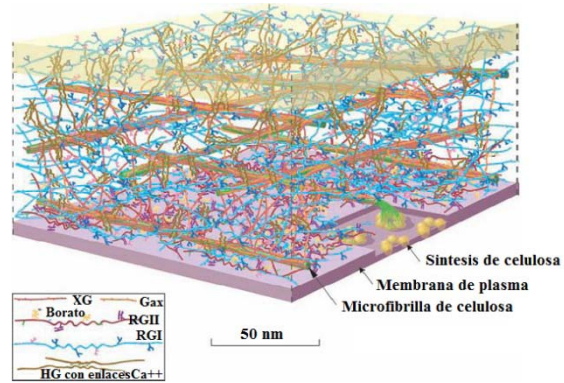
El término “Biomasa lignocelulósica” generalmente es usado cuando se refiere a los árboles, aunque en el caso de que se destine a la producción de bioenergía, el término se generaliza a todo tipo de plantas, residuos y desechos agrícolas, cosechas para bioenergía, desechos industriales y desechos sólidos municipales. A diferencia de la biomasa destinada a la alimentación (almidón y sus derivados), tiene una serie de ventajas, tales como el bajo costo y el abundante suministro (Sathisuksanoh y col, 2009). De esta forma, los materiales lignocelulósicos pueden agruparse en tres grandes grupos, de acuerdo a su origen: maderas blandas (coníferas), maderas duras (angiospermas), y herbáceas, entre las que se incluye granos, follaje y tallos de la planta, como por ejemplo el bagazo de caña, césped y leguminosas, como los lupinos.

Los materiales lignocelulósicos están compuestos en forma mayoritaria de celulosa, hemicelulosa y lignina, así como menores cantidades de pectina, proteínas, extraíbles y cenizas. Estos componentes están presentes en diferentes proporciones, distribuidos en los diferentes componentes anatómicos de las plantas, principalmente en la pared celular.

La celulosa es el principal componente de la pared celular que proporciona resistencia mecánica y estabilidad química, sintetizada por la energía solar que es absorbida en el proceso de fotosíntesis ($6 CO_2 + 12H_2O + Luz \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 + 6H_2O$) y almacenada. Se ha estimado que alrededor de 7.5×10^{10} toneladas de celulosa son consumidas y regeneradas cada año en el mundo (Kirk-Othmer, 2007), por lo que se considera el componente orgánico más abundante a nivel mundial. Los lignocelulósicos consisten también de agua, proteínas minerales y otros componentes (Fig. 3).

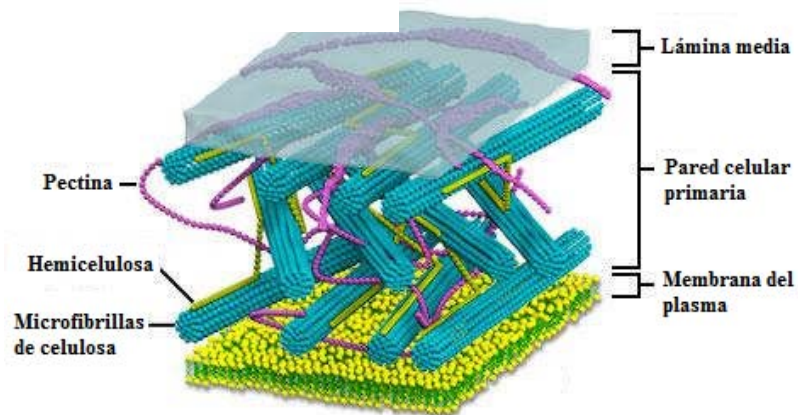


(A) Diferentes niveles de organización (Iandolo).

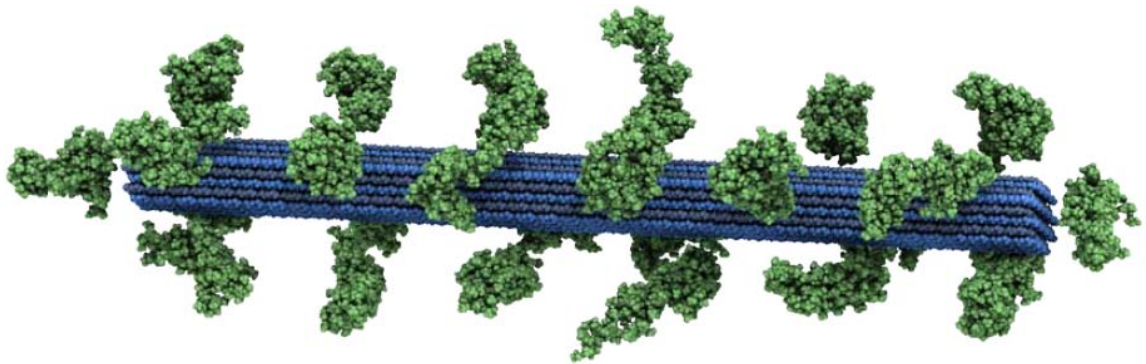


XG = Xiloglucana; RGII = Ramnogalacturona II; RGI = Ramnogalacturona I; HG = Homogalacturona

(B) Organización de los polisacáridos en la pared de las plantas (Somerville y col, 2004).



(C) Componentes y su posición en la estructura de la pared celular (Iandolo).



(D) Modelo atomista de la lignocelulosa de maderas blandas (Xu y col).

Fig. 3. Representación esquemática de la pared celular.

La pared celular es una estructura muy compleja con múltiples funciones, desde la protección de la célula hasta la regulación del ciclo de vida del vegetal. La mayoría de las plantas tienen pared primaria o exterior compuesta principalmente de lignina, y una pared secundaria o interior compuesta sobre todo de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina.

La fig. 3(B) es un modelo representativo de la pared celular de las dicotiledóneas. Es de destacar en este modelo que las microfibrillas de celulosa están entrecruzadas con hemicelulosa, principalmente con xiloglucanas por medio de puentes de hidrógeno. Ramnogalacturona I (RGI) está también alineada con las microfibrillas. Homogalacturona, arabinanas, galactanas y ramnogalacturonas II se visualizan como cadenas laterales unidas a un esqueleto RGI de alto peso molecular.

En la fig. 3(D) se muestra la microfibrilla elemental de celulosa en color azul, mientras que las moléculas de lignina son representadas en verde. El tamaño total del modelo es de 3.3 millones de átomos (Vincken y col, 2003).

2.2.1 Celulosa.

La celulosa es un polímero lineal de unidades de β -D-glucopiranosas conectadas por enlaces β -1,4 glucosídicos. La celulosa constituye alrededor del 40-50% de la biomasa y el grado de polimerización puede variar desde 500 hasta 15,000 unidades (Holtzapfle, 1993).

La naturaleza de los enlaces entre las moléculas de glucosa permite el arreglo del polímero en largas cadenas lineales, lo que permite que, junto con el hecho de que los hidroxilos están uniformemente distribuidos a ambos lados de los polímeros, la formación de enlaces tipo puente de hidrógeno entre las moléculas de la celulosa vecinas, generando la estructura clásica de varias cadenas paralelas o fibrillas unidas entre sí (Fig. 4), lo cual se favorece por su grado de polimerización (Faulon y col, 1994).

Otro aspecto destacable es que la naturaleza hidrofílica de la superficie de la celulosa da como resultado la formación de una capa densa de agua que podría oponerse a la degradación enzimática (Matthews y col, 2006).

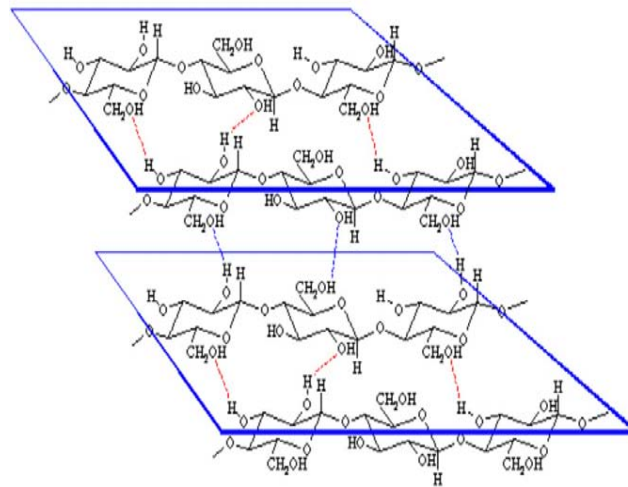


Fig. 4. Microfibrillas de celulosa con enlaces tipo puente de hidrógeno enlazando moléculas vecinas, formando cadenas (Harmsen, 2010).

Las microfibrillas están inmersas en una matriz de hemicelulosa y pectina cubiertas por lignina, lo que provoca la unión de múltiples microfibrillas en macrofibrillas, las cuales a su vez se unen entre sí para originar las fibras celulósicas (Fig. 5).

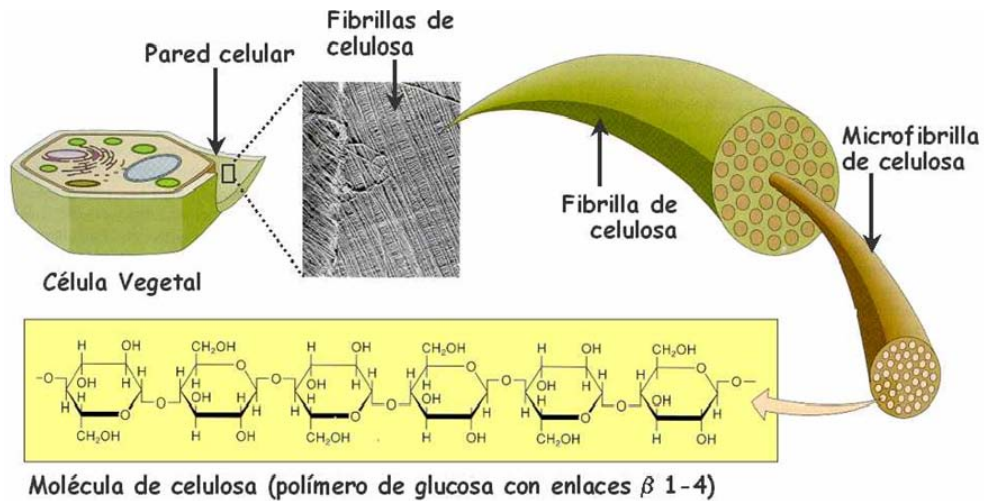


Fig. 5. Estructura de la celulosa.

La mayor parte (alrededor de 2/3 partes) de la celulosa es de forma cristalina (Chum y col, 1985), pero también tiene áreas amorfas, en las que muchas de las cadenas celulósicas pierden su orden paralelo y adquieren una conformación mucho más desorganizada. Las cadenas de

celulosa poseen zonas alternas de áreas amorfas y cristalinas, empezando y terminando con la configuración de inicio.

La zona cristalina es más resistente a cualquier tipo de alteración que la zona amorfa. Una manera de mejorar la digestibilidad enzimática de la celulosa es reduciendo su grado de cristalinidad. Otros factores que favorecen la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos son el tamaño de partícula (área externa), volumen de poro interno (área interna) y grado de polimerización.

Estos factores actúan de forma conjunta (Taherzadeh y Karimi, 2008). El área superficial esta siempre ligada con la cristalinidad, aunque la mayoría de los investigadores considera que éste es un factor muy importante por sí solo, ya que afecta el grado de degradabilidad de la celulosa. El área superficial accesible puede ser limitante en la hidrólisis, ya que la actividad hidrolizantes de las enzimas celulasas necesita la absorción directa sobre la superficie de las moléculas (Sun y Chen, 2002). El área superficial externa está relacionada con el tamaño y la forma de las fibras, mientras que el área interna depende del tamaño de los poros y de la estructura capilar de las fibras. Mientras que las fibras secas habitualmente tienen grandes áreas superficiales externas, su área interna superficial es frecuentemente más pequeña. El área interna puede ser incrementada por hinchamiento de las fibras a través de humectación con agua u otros solventes polares. Un dato que puede ser interesante y aprovecharse para alterar la pared celular, es el hecho de que el agua sufre alguna recristalización en la zona amorfa de la celulosa, natural o inducida. El secado de las fibras puede resultar en un colapso y contracción irreversible de la estructura capilar de las fibras, reduciendo el área superficial (Fan y col, 1980).

2.2.2 *Hemicelulosas.*

Las hemicelulosas son polisacáridos que poseen estructuras lineales o ramificadas. Estos polisacáridos se encuentran asociados con la celulosa y representan aproximadamente el 30% de la biomasa en peso. A diferencia de la celulosa, las hemicelulosas son químicamente heterogéneas, con bajo grado de polimerización (menor a 200), en su mayoría amorfas. Los residuos básicos presentes son xilosas, arabinosas, manosas, glucosas, galactosas, ácidos glucurónicos y sus metiléteres. Se clasifican de acuerdo al azúcar que compone su eje principal. En las maderas blandas, las mananas (cuyo monómero es la manosa), son las hemicelulosas principales, mientras que en las maderas duras y en las herbáceas las dominantes son las xilanas

(Jørgensen y col, 2007). El eje principal de las xilanas está formado por xilosas con enlaces β -1,4 y β -1,3, muchos de ellos acetilados. Su forma más común es como heteroxilanas con pequeñas ramificaciones formadas de otros azúcares o ácidos. Las maderas duras y las herbáceas están compuestas principalmente de glucuroarabinoxilanas, siendo la arabinosa y el ácido glucurónico el sustituyente más abundante (Saha, 2003). Las heteroxilanas pueden entrecruzarse unas con otras, absorberse en la celulosa, unirse a las proteínas estructurales y a la lignina, constituyentes de la matriz en la que está incrustada la celulosa. Forman una barrera física al ataque enzimático o microbial sobre la celulosa (Fig. 6), Además su contenido en acetilos tiene el efecto de obstaculizar estéricamente la actividad enzimática, interfiriendo con el reconocimiento del sustrato.

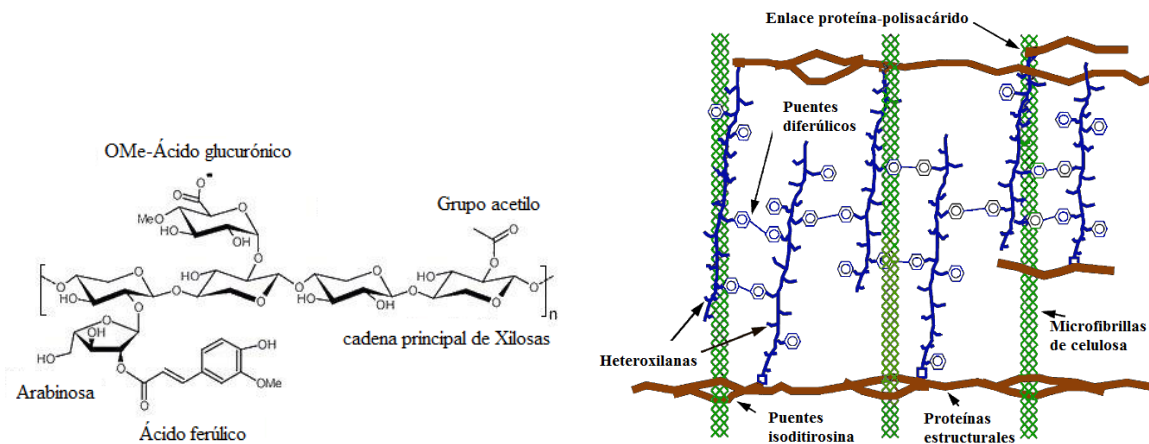


Fig. 6. Estructura básica de la glucuroxilana (izquierda) y modelo de la pared celular de la fibra, representando el efecto vinculante entre las xilanas y las microfibrillas (Hövel y col, 2003).

Las hemicelulosas tienen enlaces débiles con la celulosa, los cuales pueden ser fácilmente eliminados mediante pretratamientos adecuados. Lo anterior facilita la digestión subsecuente de la celulosa (Saha y col, 2005).

2.2.3 Lignina.

Es un compuesto no bien definido ni uniforme, con una compleja red de sustancias químicas similares con muy diferentes pesos moleculares. Son polímeros altamente ramificados compuestos de alcoholes coniferílicos, sinapílicos y cumarílicos, con un anillo aromático y diferentes sustituyentes (Brown, 2003). Una gran variedad de enlaces unen las unidades estructurales (fenilpropano), tales como enlaces éter alquil-alquil, alquil-arilo y arilo-arilo (Fig. 7)

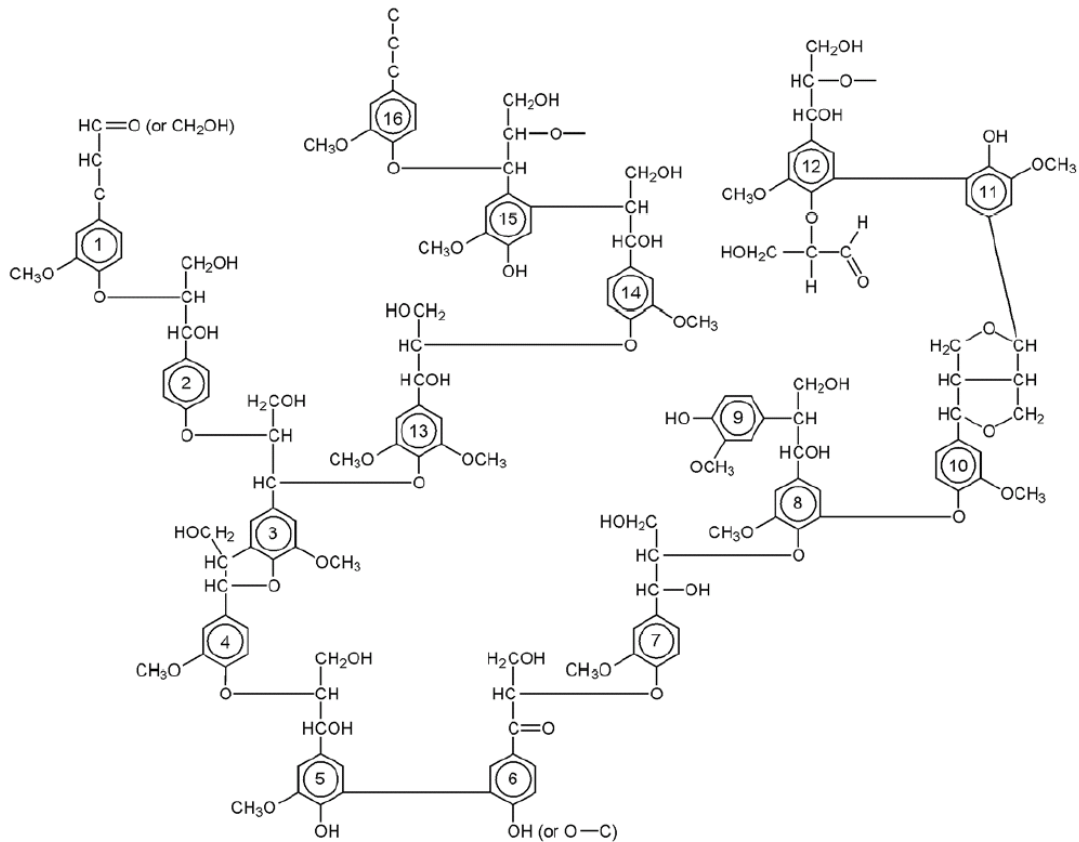


Fig. 7. Estructura simplificada de una sección del polímero de la lignina (Harmsen, 2010).

La lignina es capaz de formar enlaces covalentes con las hemicelulosas, de esta manera proporciona integridad, rigidez estructural y previene el hinchamiento de los materiales lignocelulósicos. Se ha comprobado que es uno de los mayores factores responsables de la resistencia a la hidrólisis enzimática de la biomasa. Hay varias formas en que la lignina puede obstaculizar la digestión de la biomasa, tales como el impedimento estérico y la oposición a la humectación de la fibra, siendo éste último uno de los factores más importantes para el incremento de la superficie interna (Mooney y col, 1998). Este efecto puede variar con la composición de la lignina, ya que las maderas blandas son con frecuencia más resistentes a la hidrólisis enzimática que las maderas duras, debido al gran contenido de subunidades guayacilo presentes en ellas, en oposición a las subunidades guayacilo y siringilo (más sencillas que las unidades guayacilo) de las maderas duras (Ramos y col, 1992). Además, se sabe que la lignina

disuelta inhibe a las celulasas y xilanasas, lo cual complica aún más su digestión (Berlin y col, 2006).

2.3 Transformación de la biomasa.

2.3.1 Procedimientos de transformación.

Los materiales lignocelulósicos son materiales difíciles de convertir en productos químicos debido a su compleja estructura, como ya se especificó en las secciones anteriores. Se han desarrollado diferentes tecnologías para este fin, reportándose una sustitución del 10-15% de químicos a granel obtenidos a partir del petróleo, por productos químicos que tienen origen en la biomasa (Haveren y col, 2008). Los métodos de transformación de biomasa pueden ser llevados a cabo mediante procedimientos físicos, químicos y termomecánicos (Bajus, 2008). Estos últimos incluyen pirolisis, gasificación y licuefacción para obtener energía de diversos tipos, combustibles líquidos, combustibles sólidos y químicos (Fig. 8A). Existen métodos de la conversión termomecánica de materiales lignocelulósicos (MLC) mencionados, incluyendo el post procesamiento de gas de síntesis para obtener metanol y la producción de combustibles líquidos por el proceso de Fischer-Tropsch (Stocker, 2008).

La pirolisis (tratamiento térmico del material en ausencia de oxígeno) de MLC produce solventes regenerables, así como monómeros para producir polímeros y otros químicos de uso industrial, mientras que la licuefacción es el método de obtención de aceites crudos lo cuales rinden productos químicos después de la etapa de refinación (Zhang y col, 2008).

Los métodos de pretratamiento e hidrólisis enzimática (sacarificación) al que hemos estado haciendo referencia, se incluye en la categoría de aplicación de métodos físicos, químicos y termomecánicos para fraccionar los materiales lignocelulósicos (Fig. 8B). Es posible obtener una gran cantidad de sustancias químicas útiles a partir de MLC por medio de la fraccionación de MLC con base en la solubilización selectiva de las hemicelulosas (por procesamiento hidrotérmico en medio acuoso, o por prehidrólisis con ácidos minerales, entre otros métodos) (Gullon 2010).

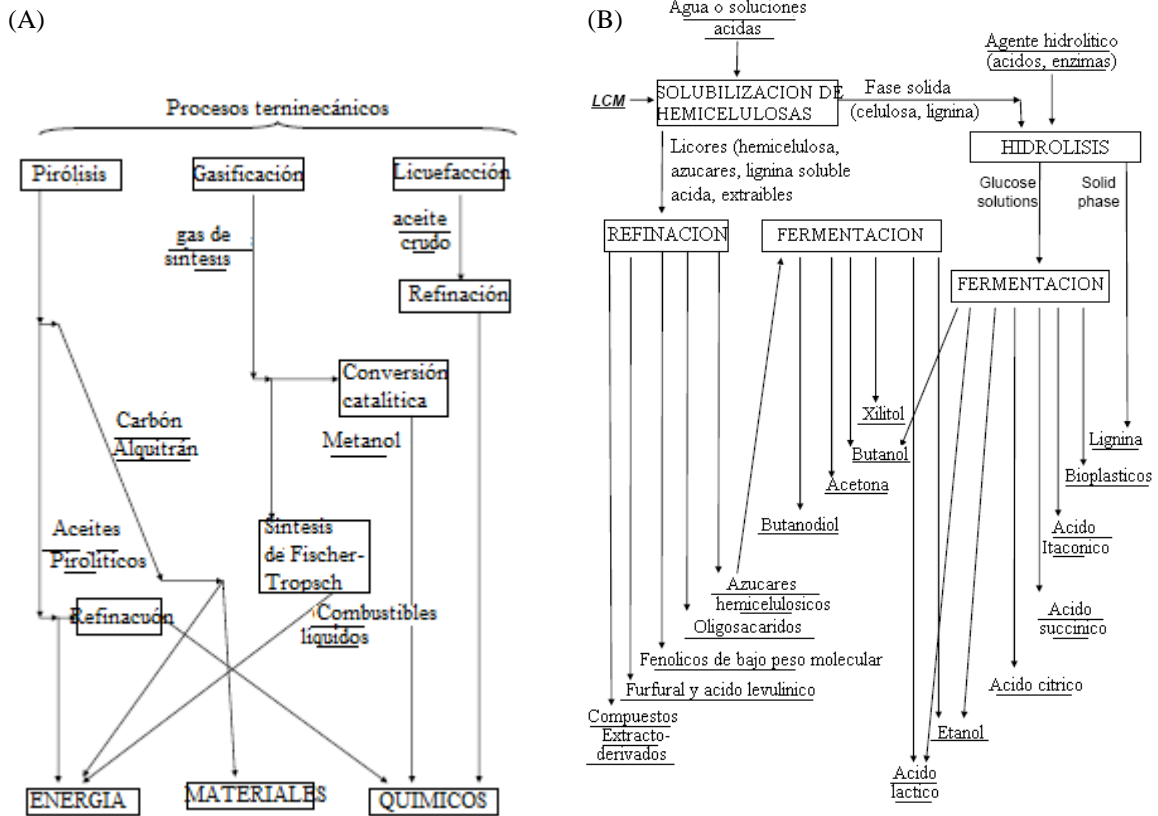


Fig.8. (A) Métodos de transformación de la biomasa; (B) Productos obtenidos por hidrólisis de polisacáridos (Gullon 2010).

El paso de solubilización de las hemicelulosas puede orientarse a la producción de oligosacáridos, azúcares fermentables de hemicelulosas, furfural o ácido levulínico. La celulosa residual del paso de solubilización de las hemicelulosas puede ser hidrolizada con ácidos o enzimas para la producción de soluciones de glucosa fermentable y una fase sólida compuesta principalmente de lignina utilizable como combustible o sustrato para gasificación o pirólisis.

La fermentación de los hidrolizados de celulosa conduce a una amplia gama de productos químicos, desde biocombustibles, bioplásticos, incluyendo solventes y ácidos orgánicos polifuncionales (Gullón y col, 2010). El esquema podría ser completado con la producción de biogás y biohidrógeno a partir de desechos del proceso principal. Los productos obtenidos son precursores de una amplia variedad de otros químicos.

2.3.2 Sacarificación de los polisacáridos (Pretratamientos).

El objetivo del pretratamiento es abrir la estructura de MLC y mejorar la accesibilidad de las enzimas al sustrato (Fig. 9)

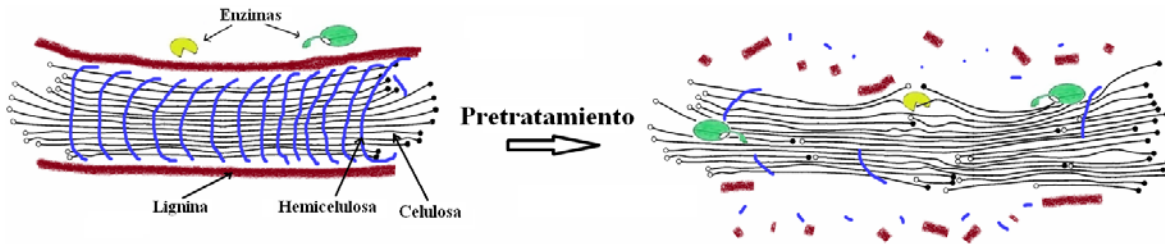


Fig. 9. Representación esquemática de la alteración que sufre la pared celular debido a los pretratamientos (Voynets y Dahman, 2011).

Un pretratamiento económico y efectivo debe ser capaz de generar suficiente celulosa reactiva para interactuar con las enzimas, no degradar la celulosa y hemicelulosa, no generar inhibidores de la hidrólisis enzimática ni de la fermentación, además de tener una baja demanda energética, para esto existen muchos métodos, los cuales son resumidos en la Tabla 1. Debido a la diversidad de materiales lignocelulósicos, las tecnologías y condiciones que producen resultados favorables con cierto material no garantizan lo mismo para un material diferente. A continuación se describen algunas características de los pretratamientos utilizados en este proyecto.

Molienda. En función del tamaño de criba utilizado, el material molido presenta un tamaño final de partículas de 2 a 0.2 mm. El efecto de la molienda es un decrecimiento en cristalinidad de la celulosa y alteración del complejo lignina-carbohidrato (Mais y col, 2002). La limitante principal es el consumo de energía, la cual se incrementa de forma exponencial con el decremento del tamaño de la partícula obtenida. En general este pretratamiento se utiliza combinado con otros antes de la digestión enzimática. Otra limitante es la falta de eliminación de lignina, la cual impide el accionar de las enzimas e inhibe su actividad.

Antecedentes

Tabla 1. Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos.

Pretratamiento	Proceso	Posibles Cambios en la biomasa	Notas	Referencias
Físicos	Molienda: -molino de bolas -molino de martillos -molino de cuchillas -molienda de energía vibratoria Irradiación: -Radiación gamma -Bombardeo de electrones -microondas -Ultravioleta Otros: -Hidrotérmico -Vapor a alta presión -Expansión -Extrusión -Pirolisis	-Incremento del área accesible y tamaño del poro -Disminución del grado de polimerización	-Alta demanda de energía -No remoción de lignina -No aplicable a nivel industrial -No se requiere la participación de agentes químicos	Mais y col, 2002 Kumakura y col, 1982
	Físico-Químicos	Explosión: -Explosión de vapor -Explosión de fibra con amoniaco(AFEX) - Explosión con CO ₂ -Explosión con SO ₂	Ídem pretratamientos Químicos	
Químicos	Alcalina: -Hidróxido de sodio -Amoniaco -Sulfito de amonio Acido: -Ácido sulfúrico -Ácido clorhídrico Ácido fosfórico Gas: -Dióxido de cloro -Dióxido de nitrógeno -Dióxido de azufre Agentes oxidantes: -Peróxido de hidrógeno -Oxidación en húmedo -Ozono Extracción de lignina con solventes: -Extracción con etanol-agua -Extracción con benceno-agua -Extracción con etilenglicol -Extracción con butanol-agua -Agentes hinchantes	-Incremento en el área superficial accesible -Deslignificación parcial o completa -Disminución de la cristalinidad -Disminución del grado de polimerización -Hidrólisis parcial o completa de las hemicelulosas	Estos métodos se consideran de los más efectivos, incluyendo aplicaciones a nivel industrial -Por lo general son tratamientos cortos, de rápido rendimiento, pero condiciones de operación muy duras, con la participación de agentes químicos	Emmel y col, 2003 Torget y col, 1991 Fan y col, 1982 Palonen y col, 2004 Pasquini y col, 2005
	Pretratamientos biológicos	Hongos y actinomicetos	-Deslignificación -Reducción de la polimerización de la celulosa -Hidrólisis parcial de la hemicelulosa	-Baja demanda de energía -No requiere la participación de agentes químicos -Condiciones suaves -Muy bajo rendimiento

Irradiación. Se utiliza radiación de alta energía, incluyendo radiación γ (Yang y col, 2008), ultrasonido (Imai y col, 2004), bombardeo de electrones (Bak y col, 2009), campo de pulsos electrónicos, UV, y microondas (Kitchaiya y col, 2003).

Otros tratamientos utilizados incluyen cavitación, repetido congelamiento y descongelamiento, y calentamiento a baja temperatura (Taherzadeh y Karimi, 2008).

El efecto provocado sobre la biomasa es el incremento del área superficial, decremento del grado de polimerización de la celulosa, hidrólisis de hemicelulosas y la despolimerización parcial de la lignina. Sin embargo, estos métodos por lo general son lentos, necesitan uso intenso de energía, y son costosos (Zheng y col, 2009). Por tanto la aplicación comercial de esta técnica debe contemplar el costo de su aplicación.

Químicos. El objetivo de aplicar los tratamientos químicos es eliminar lignina y/o hemicelulosas, así como obtener un menor grado de polimerización (DP) y cristalinidad de la celulosa. Son los pretratamientos más estudiados entre todas las categorías. Los pretratamientos químicos pueden ser ácidos o alcalinos.

Los métodos alcalinos utilizan principalmente hidróxido de sodio o de amonio. Son métodos deslignificantes, aunque en cierta medida también se remueve hemicelulosa por medio de la saponificación de los enlaces entre ambos polímeros, lo que provoca un incremento de la porosidad e hinchamiento de la celulosa (Tarkow y Feist, 1969).

Los pretratamientos ácidos se originaron de la hidrólisis con ácidos concentrados (HCl y H_2SO_4). El pretratamiento con HCl concentrado es la tecnología más antigua para obtener azúcares fermentables a partir de los materiales lignocelulósicos, inclusive fueron comercializados en un periodo de la segunda guerra mundial. La técnica con ácido concentrado se aplica en dos pasos: El primer paso es para eliminar hemicelulosas, mientras que el segundo paso del proceso utiliza ácido más concentrado, constituyéndose en la etapa de hidrólisis de azúcares. Aunque este es un método efectivo de hidrólisis, el ácido concentrado es tóxico, corrosivo, peligroso, y requiere de material resistente a la corrosión, además de que para la economía del sistema, el ácido debe ser reciclado (Sivers y Sachi, 1995). Por estas causas, ha ido perdiendo interés gradualmente. Por el contrario, el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido ha sido desarrollado exitosamente y ha adquirido popularidad. Solubiliza las hemicelulosas dejando la lignina y celulosa intactas para hidrolizar esta última en una etapa de digestión enzimática. Los sacáridos de hemicelulosa deberían ser completamente hidrolizados en monosacáridos

ajustando las condiciones del pretratamiento, aunque existe cierta degradación de la celulosa durante esta etapa. Se ha aplicado a diversas materias primas, en donde el ácido sulfúrico es el más utilizado ya que es el más efectivo y económico, con inconvenientes tales como: Corrosividad; la necesidad de neutralizar con NaOH la solución ácida de azúcares previo a la etapa enzimática, lo que ocasiona la formación del precipitado de Na_2SO_4 (yeso) el cual debe ser eliminado; la formación de inhibidores de la hidrólisis enzimática y de la fermentación; Incremento en el precio del ácido sulfúrico. Pese a la vigencia de este pretratamiento con H_2SO_4 , y con el objetivo de hacer más eficiente y económico el proceso, se han usado y evaluado diferentes ácidos incluidos los perácidos como el ácido peracético.

2.4 Deslignificación en medio ácido.

La deslignificación de diferentes materias primas se efectúa comúnmente en medio alcalino y no en medio ácido, ya que por las condiciones del medio, en condiciones alcalinas el ión hidroxilo (OH^-) actúa como deslignificante, mientras que en medio ácido el radical hidronio (H^+) degrada los carbohidratos. Es por ello que, como se ha descrito previamente, los pretratamientos de los lignocelulósicos para obtener azúcares fermentables se efectúan en medio alcalino para eliminar o degradar la lignina, mientras que los pretratamientos en medio ácido se utilizan para eliminar hemicelulosas, y no para eliminar o degradar lignina, aunque para esto requiere el uso de altas temperaturas lo que provoca la generación de agentes inhibidores de la hidrólisis y de la fermentación.

En algunas áreas específicas (blanqueo en el sector de pulpa y papel), se ha buscado deslignificar en medio ácido, puesto que, aunque tradicionalmente se ha utilizado el oxígeno y peróxido de hidrógeno como agentes deslignificantes con un control adecuado del pH del medio en la zona alcalina que evita la degradación de la celulosa, existe pérdida del reactivo por su descomposición, lo que no ocurre en el medio ácido (Suchi y Argyropoulos, 2002).

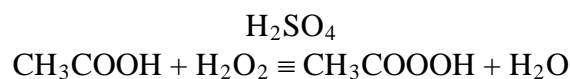
Para intentar deslignificar en medio ácido se han probado diversos compuestos para estabilizar e incrementar la selectividad de degradación de la lignina por parte del peróxido durante su actividad oxidante, por medio de la adición de activadores o catalizadores que interactúan directamente con el peróxido para generar potentes oxidantes *in-situ*, que permitan la deslignificación con baja o ninguna degradación de carbohidratos, usando agentes químicos de refuerzo, tales como: ácido dietilen triamino pentaacético (DTPA) (Odermatt y col, 1994);

metales de transición (tungsteno, molibdeno, cromo, osmio y selenio) (Eckert 1982); molibdato de sodio, molibdato de amonio, óxido de molibdeno, con deslignificación atribuida a la formación del complejo denominado diperoxo (Kubelka y col, 1992); silicomolibdato y ácido peracético actuando en forma conjunta (Jakara y col, 1995); Polioxometalatos basados en tungstato, molibdato y vanadato (Bianchi y col, 1998), con varios tipos de heteropoliácidos (HPA) de Keggin, se han aplicado también en la deslignificación en medio ácido.

Aunque el uso de tales agentes no han sido probados como pretratamiento para sacarificación, la deslignificación en medio ácido de los materiales lignocelulósicos, tal vez permitiría la eliminación de lignina y de algunas hemicelulosas de forma conjunta, con la consecuente disminución de la temperatura del pretratamiento, la menor generación de inhibidores y el incremento de la eficiencia de la hidrólisis y la sacarificación enzimática.

2.4.1 Perácidos.

Son derivados de los peróxidos, aunque tienen mayor poder oxidante que éstos. Desde este punto de vista, la deslignificación con perácidos se puede considerar como una deslignificación con peróxidos activados. Su poder oxidante es similar a la del dióxido de cloro y cloro gas, por lo que podría compararse con estos agentes. Se han usado sobre todo como activadores de la deslignificación con peróxido de hidrógeno, bajo condiciones ácidas o neutras, pero tienen en su contra su alto costo y pobre selectividad. El ácido peracético se prepara mezclando ácido acético y peróxido de hidrógeno con ácido sulfúrico como catalizador:

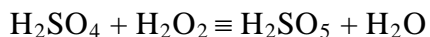


El producto final de la reacción anterior contiene alta concentración de ácido acético y de peróxido de hidrógeno, pero baja concentración de peracético, lo cual afecta la economía del proceso.

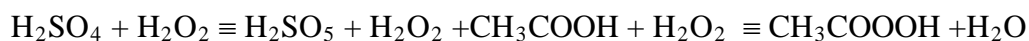
Para mejorar la selectividad del ácido peracético se han utilizado metales de transición, que reducen la descomposición del peróxido (Hill y col, 1992) o del ácido peracético (Yuan y col, 1997).

Otros perácidos estudiados son el peroximonosulfúrico (llamado ácido de Caro) y el perfórmico, ambos fuertemente oxidantes. El ácido permonosulfúrico es preparado por la

reacción entre el ácido sulfúrico y el peróxido de hidrógeno, con un equilibrio similar al del ácido peracético:



El agua presente en la mezcla resultante de la reacción afecta la eficiencia de la conversión, la cual alcanza un máximo de conversión de alrededor de 45% cuando se usa un exceso de ácido sulfúrico al 99% y peróxido de hidrógeno (proporción molar de 1.5:1.0). Tal eficiencia se puede aumentar usando peróxido al 70%, pero con el inconveniente de que se deben extremar las condiciones de seguridad. Otra forma de hacer más eficiente la conversión es añadiendo ácido acético a la mezcla de ácido peroxosulfúrico (Geng y col, 1993), formándose de esta manera una mezcla de ácido peracético y peroxomonosulfúrico, lo cual permite una alta conversión del peróxido en perácidos sin usar reactivos altamente concentrados, lográndose una conversión a un nivel del 94% (Song y col, 1993).



2.4.2 Polioxometalatos y heteropolianiones (POMs).

Son estructuras poliméricas inorgánicas, formando un grupo de complejos de heteropolianiones, basados generalmente en tungsteno y molibdeno, llamados también oxoaniones polinucleares o polioxometalatos, obtenida por primera vez por Berzelius en 1826 y cuya estructura general fue resuelta por difracción de rayos X por Keggin en 1933 (Pope, 1983). Son moléculas grandes (6-25 Å) y de alto peso molecular (1000-10000).

La primera estructura caracterizada y la más conocida es el heteropolianión de Keggin (Pope, 1983) representado por la fórmula $(\text{XM}_{12}\text{O}_{40})^{x-8}$, en la que X es el heteroátomo central, el cual puede ser divalente a pentavalente (Si^{4+} , P^{5+} , Al^{3+} etc.), x es el estado de oxidación, y M es el ión metálico, principalmente Mo^{6+} o W^{6+} . Por ejemplo, en la estructura $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$, X es un átomo de silicio. El anión de Keggin (Fig. 10) está compuesto de un tetraedro central (XO_4) rodeado por 12 octaedros (MO_6) (Keggin, 1933).

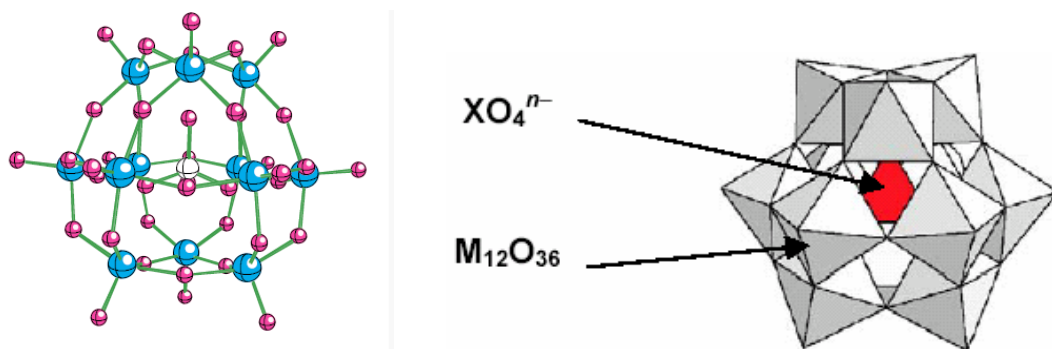


Fig. 10. Estructura de α -Keggin en su representación atómica y poliédrica (Jeannin, 1998).

La remoción de un átomo metálico con su oxígeno terminal (radical $M=O$)⁴⁺ forma un anión “lagunar” de Keggin, el cual actúa como un ligante de iones metálicos, del tipo metales de transición como V^{5+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , W^{6+} , Mo^{5+} , Ta^{5+} , etc. (Pope, 2004), lo cual los convierte en agentes activos para deslignificación. Así en $[SiVW_{11}O_{40}]^{4-}$ (anión vanadotungstosilícico), el vanadio (V^{5+}) es incorporado a la estructura de Keggin (Fig. 11).

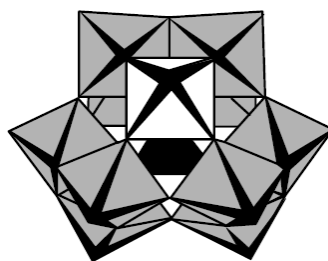


Fig. 11. Heteropolianion sustituido de Keggin (anión lagunar de Keggin), $[SiVW_{11}O_{40}]^{4-}$. Cada poliedro representa un grupo principal de átomos de metales de transición al centro y átomos de oxígeno en cada uno de los vértices. El tetraedro negro al centro representa el átomo de óxido de silicio, los once octaedros grises representan los óxidos de los átomos estructurales de W (Tungsteno) y el octaedro blanco representa el óxido del átomo de vanadio sustituyente (Reiner y col).

Este POM se destaca como un tipo de ión aceptor de electrones, de rápido crecimiento y cada vez de mayor utilidad (Grigoriev y col, 2000). La mayoría de los polioxometalatos tienen gran resistencia a la degradación oxidativa y habilidad para oxidar diversos materiales como la lignina. Funcionan como soporte para la actividad redox de los metales de transición de la misma forma

que los hongos degradantes de la madera emplean peroxidasas (lignina peroxidasa o manganeso peroxidasa), las cuales dejan la celulosa intacta, usando para esto en sus sitios activos iones de metales de transición (iones férricos en muchos casos) en plataformas orgánicas controladas para catalizar la oxidación, con el inconveniente de que estos complejos naturales no son estables a elevadas temperaturas (Atalla, 1996).

Por otra parte, los iones metálicos de transición poseen propiedades redox, pero necesitan un arnés que facilite su desempeño, ya que los metales de transición tienen solubilidad limitada en agua y se pierden como un precipitado sólido. Así los polioxometalatos no solo son un soporte para estos iones de transición, sino que además permiten imitar la acción de las enzimas peroxidasas, pero en sistemas inorgánicos térmicamente estables, con propiedades favorables, ya que son clasificados como ácidos muy fuertes aproximándose a la región de los superácidos, además de ser eficientes oxidantes reversibles en reacciones redox rápidas bajo condiciones suaves, baja toxicidad, estables en aire y agua, en medio ácido y muy solubles en agua (Weinstock y col, 1997).

2.5 hidrolisis enzimática.

Es usada como una etapa intermedia entre los pretratamientos y la fermentación que permite convertir los carbohidratos en una fracción acuosa de azúcares fácilmente metabolizables. Por otra parte, debido a que las enzimas son costosas (Duff y Murray, 1996), se ha limitado su aplicación a escala comercial, se han hecho esfuerzos para reducir su costo de producción, lo que se ha conseguido progresivamente (Zhang y col, 2006).

El grado y extensión de la digestión enzimática depende de las condiciones en que ésta se efectúe, pero también depende del pretratamiento. Un pobre pretratamiento puede ser compensado usando una alta carga de enzimas, mientras que un pretratamiento efectivo podría reducir la cantidad de enzimas requeridas. Es por esto que se debe encontrar las condiciones óptimas que minimicen el costo de ambos pasos en forma conjunta.

Las celulasas se dividen en tres grupos que actúan de forma conjunta para degradar la celulosa: Endoglucanasas (1,4- β -D-glucano glucanohidrolasas), exoglucanasas (1,4- β -D-glucano cellobiohidrolasas) y β -glucosidasas (β -D-glucosido glucohidrolasas) (Philippidis, 1994). Son obtenidas a partir de hongos, bacterias y plantas, aunque la mayoría de las investigaciones utilizan celulasas obtenidas a partir de hongos, debido a que las enzimas generadas por las

bacterias celulolíticas tienen muy bajo rangos de crecimiento y requieren condiciones anaeróbicas, a pesar de que producen celulasas de alta especificidad.

El hongo filamentoso mesofílico *Trichoderma reesei*, ha mostrado buenos resultados, con algunas cepas que liberan hasta 30 g/L de enzimas extracelulares, principalmente celulasas (Chambel, 2008). Produce enzimas de los tres tipos más resistentes a los inhibidores químicos con mejor estabilidad a 50 °C que otras celulasas fúngicas. Su aspecto negativo es la sensibilidad a los inhibidores, baja activación y su temperatura óptima.

El mecanismo de hidrólisis involucra tres pasos: adsorción del biocatalizador a la superficie de la celulosa, biodegradación de la celulosa, y finalmente la desorción de la enzima (Fig. 12). La forma en que actúa cada grupo de enzimas sobre la celulosa es diferente y complementaria.

La primera fase del proceso, denominada hidrólisis primaria, involucra a la mayoría de la celulosa sólida. Es el paso limitante de la hidrólisis total de la celulosa. Las endoglucanasas rompen los enlaces internos de la cadena celulósica así como los enlaces intermoleculares entre cadenas de celulosa adyacentes. Actúa principalmente sobre la parte amorfa y rompe enlaces glucosídicos de forma aleatoria, generando cadenas de carbohidratos solubles con menor grado de polimerización (celodextrinas) creando nuevos extremos de cadenas en la fracción sólida cristalina. A continuación las exoglucanasas actúan primero exclusivamente sobre los extremos de las cadenas poliméricas, y luego a lo largo de la cadena, son capaces de degradar la celulosa cristalina. Producen principalmente celobiosas, pero también glucosa y celodextrinas pequeñas (celotriosa, por ejemplo). Una exoglucanasa puede actuar sobre los extremos reductores y no reductores de las cadenas, pero los microorganismos frecuentemente producen más de un tipo de exoglucanasa, degradando cadenas de celulosa en ambas direcciones (Zhang y Lynd, 2004). Esta diferencia en la forma de actuar de endoglucanasas y exoglucanasas se explica por la estructura de la enzima: Ambas tienen un pequeño módulo de enlace celulósico y un gran dominio catalítico, los cuales están conectados por una sección conectora flexible. Esto proporciona cierta libertad del dominio catalítico para moverse sobre el módulo de enlace fijo sobre la superficie del sustrato. Sin embargo, las endoglucanasas tienen un sitio activo más abierto, lo cual permite su accionar en la parte media de la cadena de celulosa, mientras que las exoglucanasas tienen un sitio activo en forma de túnel el cual puede hidrolizar solamente los extremos de las cadenas (Teeri, 1997).

La hidrólisis secundaria del proceso ocurre en fase líquida, actuando sobre los azúcares solubles formados en la hidrólisis primaria en el que endoglucanasa y exoglucanasa rompieron los oligosacáridos generando celobiosas. Esta segunda fase es importante e implica la acción de las β -glucosidasas, las cuales convierten la mayoría de las celobiosas (o en algunos casos celodrextinas) en glucosa monomérica.

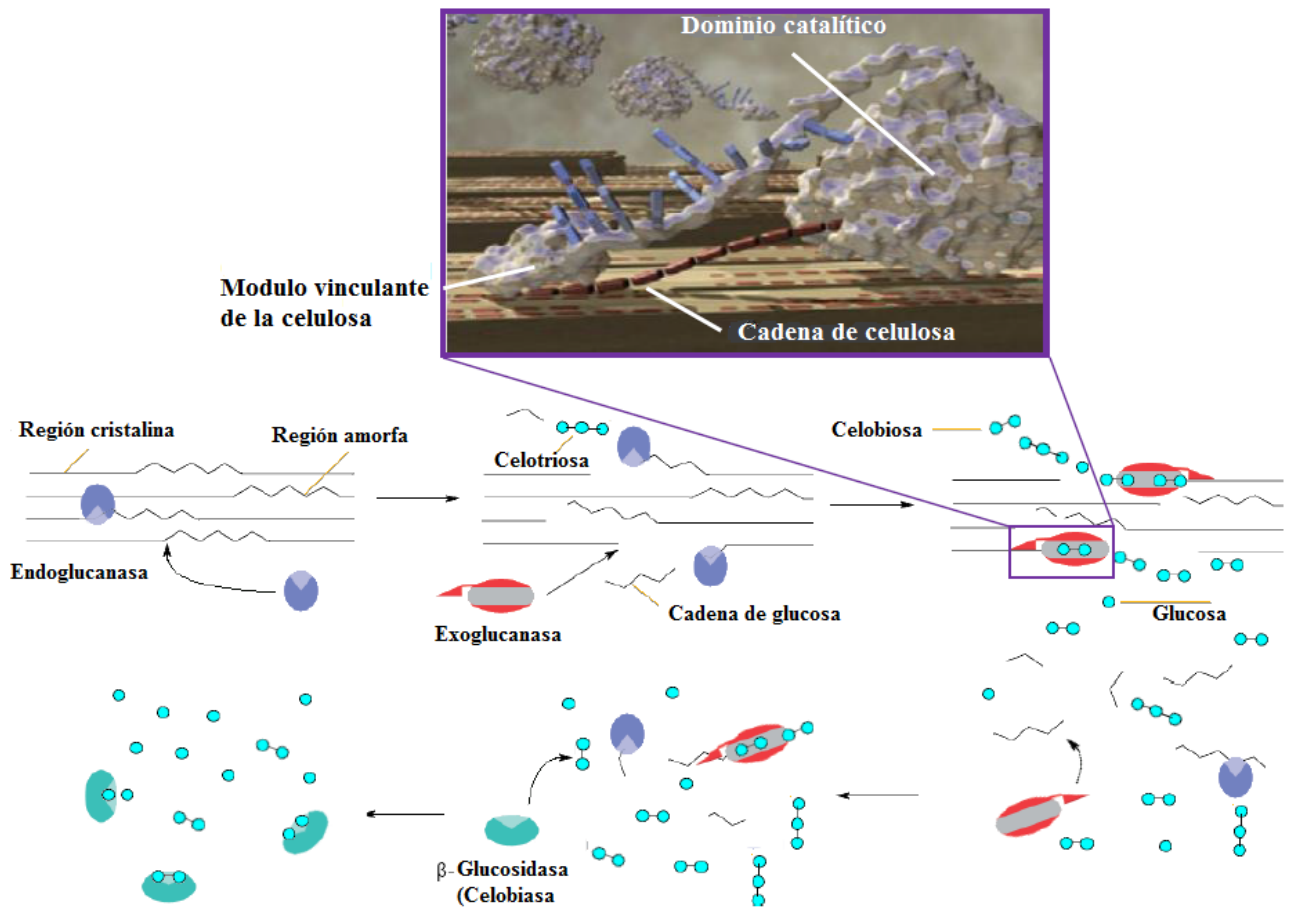


Fig. 12. Modo de acción catalítica enzimática y modelo computacional de la estructura de la exoglucanasa (Jørgensen, 2007).

La degradación de hemicelulosas implica la acción conjunta de muchas enzimas. De forma similar a las celulasas, hay endoxilanasas, exoxilanasas y β -xilanasas, en la que las dos primeras atacan la estructura central de xilanas desde el interior y desde el extremo de las cadenas, respectivamente, mientras que las β -xilosidasas hidrolizan los azúcares oligoméricos a xilosa (Saha, 2003).

Sin embargo, la estructura de las hemicelulosas es más compleja que la celulosa, y muchas xilanasas son incapaces de romper los enlaces entre las unidades de las xilosas liberadas. Por lo tanto se necesitan enzimas accesorias para remover azúcares y ácidos en las cadenas laterales. Sin embargo, muchas enzimas accesorias solamente remueven cadenas laterales desde oligosacáridos de xilosa, por lo que requieren de una hidrólisis parcial de xilanas antes que la cadena lateral pueda ser fracturada. Esto provoca un esfuerzo continuo entre todas las enzimas involucradas (Poutanen y col, 1991).

2.5.1 Factores que afectan la hidrólisis enzimática.

Hay varios factores que pueden dificultar la actividad enzimática y disminuir la digestibilidad. Además de las características estructurales ya mencionadas (lignina, acetilos, hemicelulosa, área superficial, cristalinidad, etc.), las condiciones experimentales (temperatura, pH, carga de sustrato y enzimas) en las que se lleva a cabo la reacción tienen un gran efecto en el rendimiento global de la glucosa y la cinética de liberación (Fig. 13)

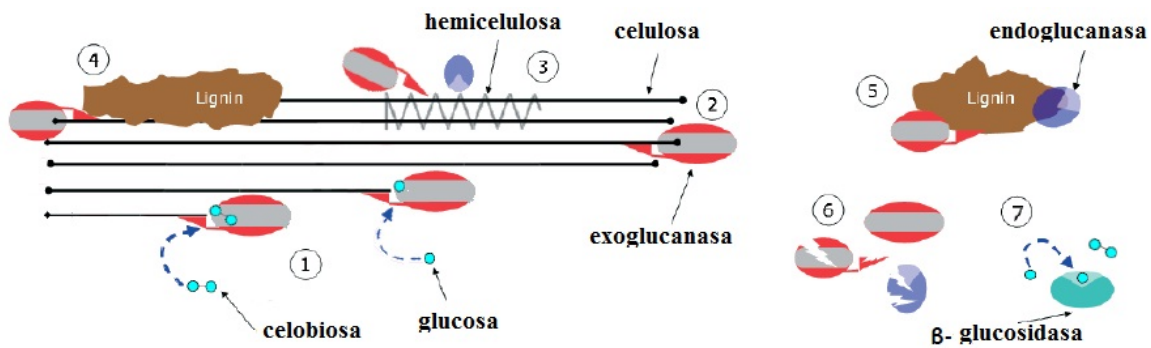


Figura 13. Esquema simplificado de algunos factores limitantes de la eficiente hidrólisis de la celulosa: 1.- Inhibidores generados por la acción de celobiohidrolasas sobre celobiosa -la mayoría- y glucosa, respectivamente; 2.- Enlaces improductivos de exoglucanasas sobre la cadena de celulosa; 3 y 4.- hemicelulosa y lignina asociadas con el recubrimiento de microfibrillas que impiden el acceso de celulasas a la superficie de celulosa; 5.- Enzimas (celulasas y hemicelulasas) que pueden ser adsorbidas sobre superficies de partículas de lignina solubles; 6.- Desnaturalización o pérdida de actividad enzimática debido a corte mecánico, actividad proteolítica o baja termoestabilidad; 7.-Inhibición de la β -glucosidasa por exceso de glucosa (Kristensen, 2009).

2.5.1.1 Características estructurales.

Como se ha mencionado, la lignina, grupos acetilo, y cristalinidad (medido como índice de cristalinidad, IC) en conjunto constituyen un obstáculo para la actividad enzimática. Chang y col, (2000) y Zhu (2005), han concluido que la lignina y la cristalinidad juegan roles más importantes que los grupos acetilo, debido a que estos dos factores determinan si la digestibilidad es alta o baja. La lignina en su forma sólida impide el acceso a la celulosa, mientras que en su forma soluble puede causar adsorción de enzimas. De cualquier forma dificulta a las enzimas el acceso a su objetivo. La alta cristalinidad de la celulosa dificulta el acceso de las enzimas a los enlaces para encontrar lugares de inicio de la degradación. Por el contrario, la baja cristalinidad, incluso si el contenido de lignina es alto, se traduce en digestibilidad. En términos prácticos, la cristalinidad es el factor principal que beneficia los tiempos cortos de reacción y las proporciones iniciales de hidrólisis, pero también favorece el rendimiento final. La eliminación de la lignina permite lograr el máximo del rendimiento teórico, pero no la cantidad de azúcares generados al principio de la reacción.

2.5.1.2 Condiciones de reacción.

Las dos condiciones más importantes son temperatura y el pH. El incremento de la temperatura aumenta la frecuencia de colisiones entre el sustrato y los sitios activos, lo que aumenta la cinética de la reacción. Sin embargo, temperatura muy alta provoca la desnaturalización de las enzimas, fenómeno que ocasiona cambios internos en el biocatalizador y en la mayoría de los casos pérdida irreversible de actividad.

Para cada enzima hay una temperatura óptima, en la cual la proporción de la reacción es la mayor y las enzimas retienen su actividad por largo tiempo. El pH afecta también la actividad, ya que a ciertos valores de pH la forma del sitio activo puede cambiar, con posibilidad de desnaturalizar la enzima (Ortega y col, 2001).

La mayoría de las celulasas y xilanasas comerciales, tienen condiciones óptimas a 50-60 °C y pH 4.0-5.0. Altas velocidades de agitación favorecen el contacto suficiente entre el sustrato y las enzimas y promueve la transferencia entre el calor y la masa dentro del reactor, pero agitación excesiva puede causar corte mecánico y llevar a la desactivación de la enzima (Ganesh y col, 2000).

La alta carga de sustrato resulta usualmente en altas concentraciones de glucosa en el licor final porque incrementaría el contacto entre el sustrato y enzimas, pero después este punto, la inhibición por el producto final será alta afectando la cinética de la reacción (Cheung y Anderson, 1997). La celobiosa es un fuerte inhibidor de las exoglucanasas, mientras que la glucosa y hemicelulosas causan una menor inhibición (Holtzapple y col, 1990), lo cual es más notorio al inicio de la reacción donde es mayor la formación de celobiosa (Zhu, 2005). Una forma de evitar los efectos de esta inhibición es agregando β -glucosidasa. Sin embargo, ya que esta enzima es también inhibida por la glucosa, se debe controlar la concentración final de ésta.

Por otra parte, la influencia de la carga de enzimas sobre la digestibilidad de la biomasa depende de las características estructurales resultantes del pretratamiento, lo cual tiene relación con la concentración limitante enzimática después de la cual no hay un significativo efecto en la formación del producto. Los sustratos que tienen un buen pretratamiento usualmente tienen más baja concentración limitante de enzimas (Zhu, 2005). En los laboratorios, frecuentemente se usan dosis de celulasa de 10 FPU/g (Unidades de papel filtro, definida como un micromol de azúcares reductores de glucosa producidos por 1 ml de enzima por minuto) debido a que proporciona un perfil de hidrólisis con altos niveles de rendimiento de glucosa dentro de tiempos de reacción aceptables (48-72 h) (Gregg y Saddler, 1996).

2.6 Literatura citada

- Ahring BK, Jensen K, Nielsen P, Bjerre AB, Schmidt AS, (1996). Pretreatment of wheat Straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. *Biores Technol.* 58: 107-113.
- Atalla RH, (1996). Oxidative delignification of wood or wood pulp by transition metal-substituted polyoxometalates, US Patent 5695606.
- Ayisi K, Putnam D, Vance C and Graham P, (1992). *Bradyrhizobium inoculation and nitrogen fertilizer effects on seed, yield and protein of white lupine.* *Agronomy Journal* 84: 857-861.
- Bak JS, Ko K, Han YH, (2009). Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. *Biores Technol.* 100: 1285 – 1290.
- Bajus M, (2008). Biofuels second generation, *Pet Coal* 50(3): 27-48.
- Berlin A, Balakshin M, Gilkes N, Kadla J, Maximenko V, Kubo S, Saddler J, (2006). Inhibition of cellulase, xylanase and beta-glucosidase activities by softwood lignin preparations, *J. Biotechnol.* 125: 198-209.
- Bermudez TK, Robledo QN, Barrera NL, Wink M, (2001). Alkaloid profiles of leaves and seeds of *Lupinus hintonii* C.P. Smith. *Z. Naturforsch* 57: 243-247.
- Bianchi ML, Crisol R, and Schuchardt U, (1998). Hydrogen Peroxide Bleaching of Commercial Pulp in the Presence of Heteropolyacids. *Proceedings of Fifth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp.* 191-194 pp.

- Brown R, (2003). *Biorenewable Resources: Engineering New Products from Agriculture*. Wiley, New York.
- Carter JN, Doney DL, Theurer JC, (1982). Potential Alcohol Production from Beta Vulgaris Genotypes as Affected by Nitrogen Level and Water Stress. *Journal of the A.S.S.B.T.* 21(4):324-344
- Chambel J, (2008). Parametric study for definition of standard test of lignocellulosic digestibility and kinetic modeling. Master Degree Thesis in Biological Engineering, Instituto Superior Técnico, Portugal.
- Chang V, Holtzapfle M, (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol* 84(86): 5-37.
- Cheung S, Anderson B, (1997). Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater, *Biores Technol.* 59: 81–96.
- Chum H, Douglas L, Feinberg D, Schroeder H, (1985). Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose. Solar Energy Research Institute, Golden Colorado, 1-64 pp.
- Dhouib A, Ellouz M, Aloui F, Sayadi S, (2006). Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 405-411.
- Duff S, Murray W, (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Biores Technol.* 55: 1–33.
- Duthio NC and Pigeaire A, (1993). Stability of the nitrogen concentration of inoculated white lupins during pod development. *Annals of Botany* 72: 55-61.
- Eckert RC, (1982). Delignification and Bleaching Process and Solution for Lignocellulosic Pulp with Peroxide in the Presence of Metal Additives. Canadian patent 1,129,161.
- Emmel A, Mathias AL, Wypych F, Ramos LP, (2003). Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid- catalysed steam explosion. *Biores Technol.* 86: 105-115.
- Fan L, Lee Y, Beardmore D, (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng.* 22: 177-199.
- Fan L, Lee Y, Gharpuray M, (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol* 23: 158-183.
- Faulon, J., G.A. Carlson, et al. (1994). A three-dimensional model for lignocellulose from gymno-spermeous wood. *Organic Geochemistry* 21: 1169-1179.
- Ganesh K, Joshi J, Sawant S, (2000). Cellulase deactivation in a stirred reactor. *Biochemical Engineering Journal* 4: 137-141.
- Gataulina GG, (1990). Symbiotic and Mineral Nitrogen in Lupin Nutrition, In: *Proceedings. 6th International Lupin Conference*. Dietrich Von Baer. (ed), Noviembre 1990, Temuco, Chile 406: 187-191 pp.
- Geng ZP, Chang H-M, Jameel Evans HB, Amini B and Webster JR, (1993). Mixed Peracids: Manufacture and Use as Non-Chlorine Delignification and Bleaching Agents. *Tappi Pulping Conference Proceedings* 353-357 pp.
- Greg, D, Saddler J, (1996). Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood-to-ethanol process. *Biotechnol Bioeng.* 51: 375-383.
- Grigoriev VA, Hill CL, Weinstock IA, (2000). *J. Am. Chem. Soc.* 122: 3544-45.
- Gullón P, Conde E, Moure A, Domínguez H and Juan Parajó C, (2010). Selected Process Alternatives for Biomass Refining: A Review. *The Open Agriculture Journal* 4: 135-144.

- Harmsen PFH, Huijgen WJJ, Bermúdez López LM, Bakker RRC, (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Energy Research Centre of the Netherlands (ECN)
- Haveren JV, Scott EL, Sanders J. (2008). Bulk chemicals from biomass Biofuels, Bioprod. Bioref. 2: 41–57.
- Hill RT, Walsh PB and Hollie JA, (1992). Part 1: Peracetic Acid -an Effective Alternative for Chlorine Compound Free Delignification of Kraft Pulp. Tappi Pulping Conference Proceedings 1219-1223.
- Holtzapple M, Cognata M, Shu Y, Hendrickson C, (1990). Inhibition of cellulase by sugars and solvents. Biotechnol Bioeng. 36: 275–287.
- Holtzapple M, (1993). Cellulose. In: Macrae R, Robinson R, Sadler M (ed.). Encyclopedia of food science, food technology and nutrition, vol 2, Academic Press London, UK: 2731-2738 pp.
- Hövel K, Shallom D, Niefind K, Belakhov V, Shoham G, Baasov T, Shoham Y, Schomburg D, (2003). Crystal structure and snapshots along the reaction pathway of a family 51 α -L-arabinofuranosidase. The EMBO Journal, 22: 4922-4932.
- Iandolo D. Development of microbial and/or enzymatic systems for the valorization of lignocellulosic wastes. Dottorato in Scienze Biotecnologiche-XXII ciclo Indirizzo Biotecnologie Industriali Università di Napoli Federico II.
- Imai M, Ikari K, Suzuki I, (2004). High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. Biochem Eng J. 17: 79–83.
- Ishurd O, Kermagi A, Elghazoun M, Kennedy JF, (2006). Structural of a glucomannan from Lupinus various seed. Carbohydr. Polym. 65: 410–413.
- Israilides C, Philippoussis A, (2003). Bio-technologies of recycling agroindustrial wastes for the production of commercially important polysaccharides and mushrooms. Biotechnol. Gen. Eng. Reviews 20: 247–259.
- Jakara J, Paren A and Patola J, (1995). Peroxide Activation - a Key to High Brightness in TCF Bleaching of Softwood Kraft Pulp. 8th ISWCP 1: 377-382.
- Jeannin YP (1998). The Nomenclature of Polyoxometalates: How To Connect a Name and a Structure. Chemical Reviews 98:51-76.
- Jørgensen H, Kristensen J, Felby C, (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. Biofuels, Bioprod. Biorefining 1: 119-134.
- Keggin JF, (1933). Structure of the molecule of 12-phosphotungstic acid. Nature 131:908–909.
- Kirk-Othmer. Cellulose. Encyclopedia of Chemical Technology, 5th Edition, (2007). Wiley Interscience, New York, p. 360.
- Kitchaiya P, Intanakul P, Krairiksh M J, (2003). Enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic wastes by microwave pretreatment under atmospheric-pressure. J Wood Chem Technol 23: 217–225.
- Kristensen JB, (2009). Enzymatic hydrolysis of lignocelluloses (Substrate interactions and high solids loadings. Forest & Landscape 42
- Kubelka V, Francis RC and Dence CW, (1992). Delignification with Acidic Hydrogen Peroxide Activated by Molybdate. J. Pulp Pap. Sci. 18(3): 108-114.
- Kumakura M, Kojima T, Kaetsu I, (1982). Pretreatment of lignocellulosic wastes by combination of irradiation and mechanical crushing. Biomass 2: 299-308.

- Larson K, Cassaman K, and Phillips D, (1989). Yield, dinitrogen fixation, and aboveground nitrogen balance of irrigated white lupin in a mediterranean climate. *Agronomy Journal* 81: 538-543.
- Mais U, Esteghlalian AR, Saddler JN, Mansfield SD, (2002). Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 815-832.
- Matthews J, Skopec C, Mason P, Zuccato P, Torget R, Sugiyama J, (2006). Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I β . *Carbohydr Res* 341:138–152.
- McVaugh R, (1987). A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico, In: *Flora novogaliciana*. Vol. V. Leguminosae, The University of Michigan Press, Ann Arbor, MI, , USA, 580-599.
- Mooney C, Mansfield S, Touhy M, Saddler J, (1998). The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Biores Technol* 64: 113-119.
- Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros I, Oliva JM, Cabañas A, Ballesteros M, (2003). Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105: 87-100.
- Nuanpeng S, Laopaiboon L, Srinophakun P, Klanrit P, Jaisil P, Laopaiboon P, (2010). Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. *Electronical Journal of Biotechnology*, 14(1).
- Odermatt J, Patt R, Kordsachia O, and Troughton N, (1994). TCF Bleaching of Conventional and EMCC® Softwood Kraft Pulp. *Tappi Pulp Bleaching Conference Proceedings*. 77-85.
- Ortega N, Busto M, Perez-Mateos M, (2001). Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 47: 7-14.
- Palonen H, Thomsen AB, Tenkanen M, Schmidt AS, Viikari L, (2004). Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 117: 1-17.
- Pasquini D, Pimenta MTB, Ferreira LH, Curvelo AAS, (2005). Extraction of lignin from sugar cane bagasse and Pinus taeda wood chips using ethanol-water mixtures and carbon dioxide at high pressures. *J. Supercrit. Fluid* 36: 31-39.
- Philippidis G, (1994). Cellulase production technology. In: Himmel M, Baker J, Overend R (Ed.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington DC, USA: 292-324.
- Pope, MT, (1983). *Heteropoly and Isopoly Oxometalates*. Springer-Verlag, Berlin.
- Pope MT, (2004). In *Comprehensive Coordination Chemistry II: From Biology to Nanotechnology*; Wedd AG, (Ed.), Elsevier Ltd., Oxford, UK, Vol. 4, p 635-678.
- Poutanen K, Tenkanen M, Korte H, Puls J, (1991). Accessory enzymes involved in the hydrolysis of xylans. In: Leatham G, Himmel M, (ed.), *Enzymes in biomass conversion*. American Chemical Society, Washington D.C., USA: 426–436.
- Ramos L, Breuil C, Saddler J, (1992). Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 34(35): 37-48.
- Reiner RS, Springer EL, Atalla RH. *Electrochemical delignification of wood pulp using polyoxometalate mediators*. USDA Forest Products.
- Ritter SK, (2008). Genes to gasoline (Genomics strategies provide clues for unraveling cellulosic biomass. *Chemical & Engineering News (C&EN)*, 86(49):10-17

- Ruiz MJJ, Ruiz MA, Zamora JF. (2000). The genus *Lupinus*: Taxonomy and distribution in Jalisco, México. In: Van Santen E, Wink M, Weissmann S, and Roemer P (eds.). Proceedings of the 9th International Lupin Conference Klink/Muritz, Germany: 297-300.
- Saha B, (2003). Hemicellulose Bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 30: 279-291.
- Saha B, Iten L, Cotta M, Wu Y, (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnol Progress* 21: 816-822.
- Sánchez C, (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27:185-194.
- Sánchez OJ, Cardona CA, (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia* 11 (30): 671-678.
- Sathisuksanoh N, Zhu Z, Rollin J, Zhang Y-H, (2009). Cellulose solvent- and organic solvent-based lignocellulose fractionation (COSLIF). In: Waldron K, editor. *Bioalcohol Production*. UK, , Woodheading publishing.
- Sivers M V, Zacchi G (1995). A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Biores Technol.* 51: 43–52.
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredes A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H, (2004). Toward a systems approach to understanding Plant cell walls. *Science* 306 (5705):2206-2211.
- Song J, Pan D, Chang H-M, and Jameel H, (1993). Peroxymonosulfuric Acid and Mixed Peracids Solution as Bleaching Agents. 7th ISWPC 34-43.
- Stocker M, (2008). Biofuels and biomass-to-liquid fuels in the biorefinery: catalytic conversion of lignocellulosic biomass using porous materials. *Angew Chem Int Ed*; 47(48): 9200-211.
- Suchi M, Argyropoulos DS, (2002). Catalysis and activation of oxygen and peroxide delignification of chemical pulps: a review. *Tappi journal* 1(2): 1-18
- Sun Y, Cheng J, (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Biores Technol.* 83: 1-11.
- Taherzadeh MJ, Karimi K, (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 1621-1651.
- Tarkow H, Feist W, (1969). A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid NH₃. *Advance Chemistry Series 95*. Am. Chem. Soc., Washington DC: 197-218.
- Teeri T, (1997). Crystalline cellulose degradation: new insights into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15: 160–167.
- Torget R, Himmel ME, Grohmann K, (1991). Dilute sulfuric acid pretreatment of hardwood bark. *Biores. Technol.* 35: 239-246.
- Vincken J-P, Schols HA, Oomen RJFJ, McCann MC, Ulvskov P, Voragen AGJ, and Visser RGF, (2003). If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Physiol.* 132: 1781-1789.
- Volynets B, Dahman Y, (2011). Assessment of pretreatments and enzymatic hydrolysis of wheat straw as a sugar source for bioprocess industry. *International Journal of Energy and Environment (IJEE)* 2(3):427-446.
- Weistock IA, Atalla RH, Reiner RS, Moen MA, Hammel KE, Houtman CJ, Hill CL, Harrup MK, (1997). A new environmentally benign technology for transforming wood pulp into paper. Engineering polyoxometalates as catalysts for multiple processes. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 116 (1-2):59.
- Xu J, Crowley MF, Petridis L, Guo H-B, Guo H, Krishnan M, Lindner B, Summers AO,

- Miller SM, Liang L, Parks JM, Schulz R, Saharay M, Cheng X and Smith JC. High-performance computer simulation in the energy biosciences
http://computing.ornl.gov/workshops/scidac2010/papers/biology_j_xu.pdf
- Yang CP, Shen ZQ, Yu GC, (2008). Effect and after effect of gamma radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biores. Technol.* 99: 6240–6245.
- Yuan Z, M. d'Entremont Y, and Van Heinegen ARP, (1997). The Role of Transition Metal Ions During Peracetic Acid Bleaching of Chemical Pulps. *Pulp Paper Can.* 98(11): 408-413.
- Zamora F, García-López P, Ruiz MA, Rodríguez R, (2009). Composición y evaluación de alcaloides en *Lupinus exaltatus Zucc.* durante su crecimiento y desarrollo. *Interciencia* 34(9):672-676.
- Zheng Y, Pan Z, Zhang R, (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric & Biol Eng.* 2(3): 51-68.
- Zahran HH, (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J. Biotechnol.* 4(91): 143-153.
- Zhang Y, Lynd L, (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88: 797–824.
- Zhang Y, Himmel M, Mielenz J, (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24: 452–481.
- Zhang B, von Keitz M, Valentas K, (2008). Maximizing the liquid fuel yield in a biorefining process. *Biotechnol. Bioeng.* 101(5): 903-12.
- Zhu L, (2005). Fundamental study of structural features affecting enzymatic hydrolysis of Lignocellulosic biomass. Doctoral Degree Thesis in Chemical Engineering, Texas A&M University, USA.

3. Hipótesis

La aplicación de procesos fotoquímico y químico no convencional como pretratamientos del material lignocelulósico de *Lupinus rotundiflorus*, provocará cambios físicos en la pared celular de las fibras, así como la oxidación y parcial disolución de la lignina, lo que facilitará la hidrólisis enzimática de los carbohidratos.

4. Objetivo General

Evaluar el efecto de los pretratamientos fotoquímico y químico no convencional sobre la eficiencia de la hidrólisis enzimática de la biomasa de *Lupinus rotundiflorus*, utilizada en la producción de azúcares fermentables.

4.1 Objetivos Particulares

- 1.- Determinar la composición química básica y perfil de monosacáridos de *Lupinus Rotundiflorus*.
- 2.- Evaluar el rendimiento en azúcares fermentables a partir de *Lupinus rotundiflorus* al aplicar un proceso de hidrólisis ácida.
- 3.- Evaluar el efecto de un pretratamiento fotoquímico (Luz UV) y evaluar su efecto sobre la hidrólisis enzimática.
- 4.- Aplicar un pretratamiento químico con una mezcla de perácidos catalizados con polioxometalatos y estudiar su efecto sobre la pared celular y la hidrólisis enzimática de *L. rotundiflorus*.
- 5.- Hidrolizar enzimáticamente *L. rotundiflorus* pretratado estableciendo las condiciones con las cuales se obtengan rendimientos óptimos de azúcares fermentables.

5. Material y Métodos

5.1 Diagrama de flujo.

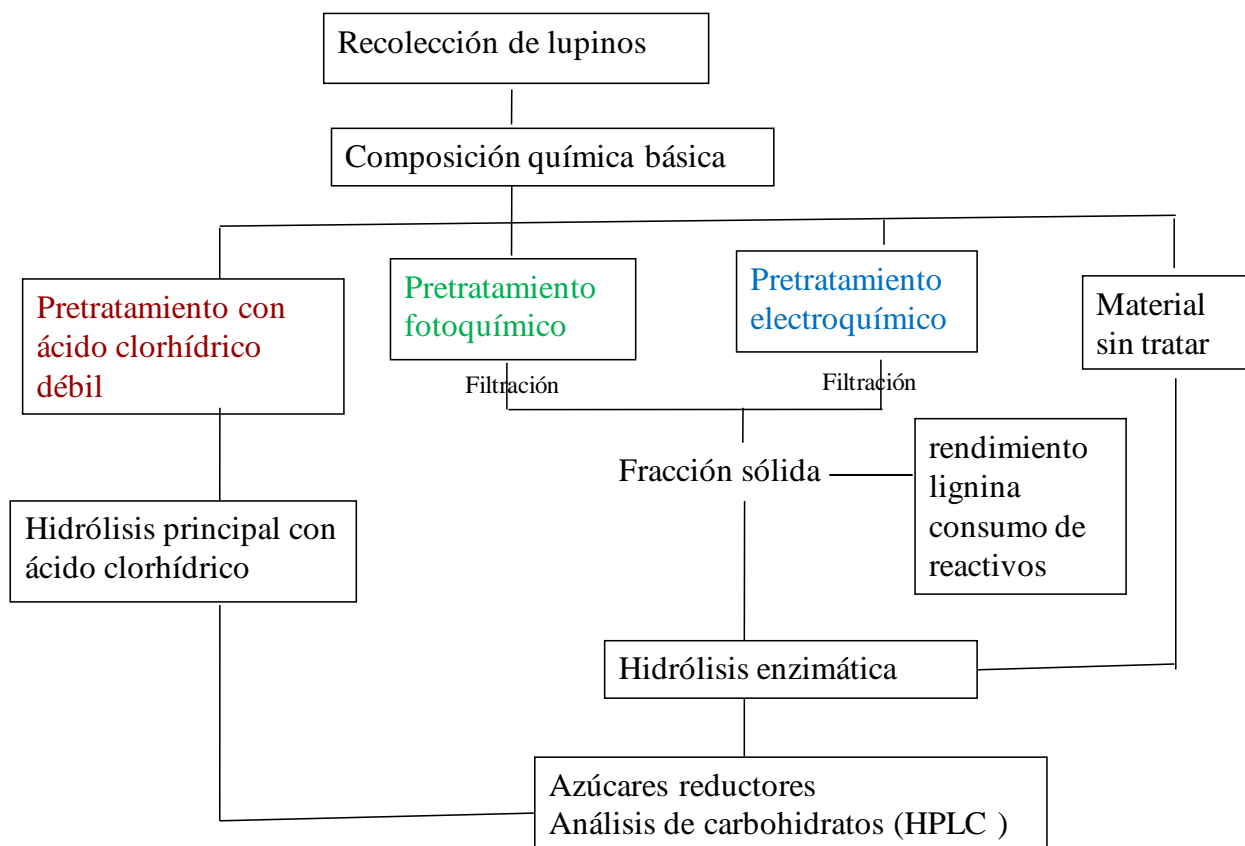


Fig. 14. Diagrama de flujo experimental propuesto para la extracción de azúcares a partir de *L. rotundiflorus*, resaltando los tres métodos empleados.

Como se ilustra en la Fig. 14, la secuencia experimental inició con la colecta del material y continuó con la caracterización de la biomasa, molienda y clasificación granulométrica de la harina. La parte central fue la aplicación de tres procesos de sacarificación: El primero con HCl concentrado, el segundo pretratamiento con luz UV (pretratamiento fotoquímico) más hidrólisis enzimática, y el tercer método aplicado fue pretratamiento con perácidos y polioxometalatos más hidrólisis enzimática. Se analizó rendimiento, lignina residual y consumo de reactivos en el

material residual de los pretratamientos, mientras que el rendimiento y caracterización de los azúcares fermentables se hicieron con los métodos de azúcares reductores por el método DNS y análisis de carbohidratos por HPLC, el cual se aplicó también en la caracterización la biomasa inicial.

5.2 Biomasa.

Se colectó material en estado de floración en la población de Atemajac de Brizuela, Jalisco, México. Se midió la altura promedio de las plantas recolectadas, así como la proporción de raíz, tallo, follaje, flor y semillas (Fig. 15), obteniendo las proporciones de raíz (12.0 %), tallo y ramas (57.0), hojas (29%), flor y semillas (2%)

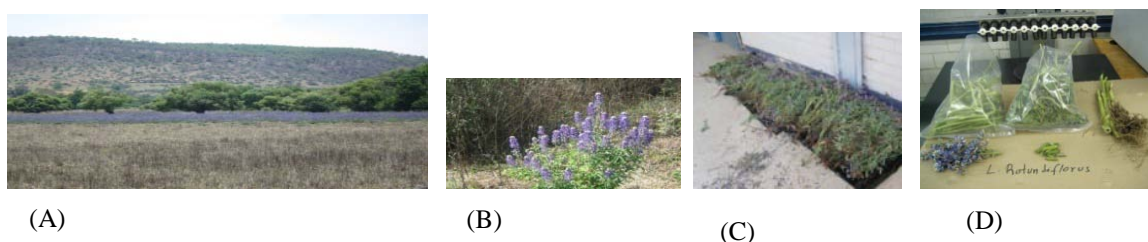


Fig. 15. Aspectos del procesamiento del *L. rotundiflorus* para la etapa experimental: (A) Etapa silvestre cerca de los bosques de pino y encino; (B) Planta colectada en estado de floración; (C) Plantas colectadas; (D) Fraccionación de la planta para estudiarla por secciones.

Cada parte de la planta fue molida por separado para efectuar la composición química y evaluar en cuál de estas partes se encuentra el mayor contenido de carbohidratos para su transformación en azúcares fermentables. Debido a que el menor contenido de carbohidratos se encontró en las hojas, estas se desecharon y se utilizó el resto de la planta, incluida la raíz, para su sacarificación.

5.3 Preparación y caracterización de la biomasa.

El material seco se pulverizó en un molino giratorio de martillo/cuchillo de laboratorio equipado con una placa perforada con porosidad de 0.5 mm ϕ (Fig. 16). Se determinó rendimiento y humedad (en estufa a 105 °C) del material molido. Las muestras molidas fueron guardadas en bolsas de plástico selladas en refrigeración a -4 °C para el estudio de sacarificación. Para la evaluación de la composición química, el material molido se tamizó (Tappi T 257 cm-85), separando el material que paso por la malla 40 (0,425 mm ϕ) y se retuvo en la malla 60 (0.25 mm

de ϕ), la cual se utilizó para evaluar el contenido de extraíbles (Tappi T 264 om-88), holocelulosa (Wise, 1946), lignina (T 222 0m-88), así como perfil de monosacáridos por HPLC.



Fig. 16. Molino Retsch GmbH 5657 HAAN con el que se efectuó la molienda del material.

Se obtuvo una composición de tamaños en la harina de 27.6% de partículas con $\phi = 0.25 \text{ mm}$, y 68.1% de partículas con $\phi \leq 0.25 \text{ mm}$.

5.4 Pruebas de control.

Antes de describir los 3 métodos de sacarificación, se describen las pruebas de control que se utilizaron en estos procesos: Evaluación de monosacáridos, Ensayo FPU y Azúcares reductores por el método DNS.

5.4.1 Evaluación de monosacáridos.

Los azúcares determinados fueron D-glucosa, D-xilosa, D-arabinosa, D-galactosa, y D-manosa utilizando un HPLC marca Varian modelo Vista 5500 (Fig. 17), equipado con un detector de índice de refracción, IR (modelo 350), Inyector Reodyne, columna polimérica marca Hamilton HC-75 Ca (305 x 78) a 80 °C y 0.6 mL/min de agua desionizada y desgasificada como fase móvil. Como estándar se utilizó monosacáridos comerciales a concentraciones de 50, 100 y 200 partes por millón (ppm). El procesamiento de los datos fue hecho con el software Star Chromatography Varian.



Fig. 17. Cromatógrafo Varian utilizado para el estudio de monosacáridos.

En un tubo de ensayo se colocó 0.3 g del material (biomasa finamente molida). Se añadió 3 mL de ácido sulfúrico frío (10-15 °C) al 72%, se mezcló bien, y se dejó reaccionar por una hora. Transcurrido ese tiempo, se transfirió a un matraz y se añadió 84 ml de agua, se llevó el matraz a una autoclave durante una hora a 15 psi de presión de vapor. Se enfrió y neutralizó a pH 5.5 con BaOH saturado (5.6 g/100 mL agua), con rigurosa agitación. Posteriormente la muestra se centrifugó, decantó, filtró en membrana millipore de nylon de 0.45 mm de \varnothing y se aforó a un volumen determinado (200 o 250 mL). Previó al análisis en HPLC, una alícuota de la muestra hidrolizada se trató con resinas catiónicas y aniónicas para eliminar los iones restantes, y cartuchos C₁₈ para eliminar el contenido de grasa (Método ASTM 1758-01 modificado, 2001). La concentración relativa de monosacáridos se basa en las áreas de las señales de los cromatogramas de las muestras problema, las cuales el software calcula al compararlas con las áreas los cromatogramas de los estándares. La concentración y tipo de los monosacáridos en el material original se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ respecto a biomasa inicial} = \frac{[\text{monosacárido, mg / mL}](V)100}{mK}$$

m = masa seca inicial, V = Volumen del hidrolizado, K = masa glucosa/masa anhidroglucosa = 180/162= 1.111 (Calculo en apéndice I)

La que expresa una relación de los monosacáridos respecto a la biomasa seca.

5.4.2 Prueba de papel filtro para sacarificación (Ensayo FPU) (Ghose, 1987 modificado).

Esta prueba se utilizó para verificar la concentración de la enzima celulasa en la muestra comercial Celluclast utilizada, dato necesario para calcular la carga enzimática en los procesos en los que se aplicó la digestión enzimática. El proceso requirió la construcción de la curva de calibración con glucosa estándar a diferentes concentraciones utilizada en la evaluación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (método DNS).

Sustrato: Tira de papel filtro whatman No. 1 1.0 x 6.0 cm (~ 50 mg)

1. Se añadió 1.0 mL de de buffer 0.05 N de ácido cítrico/citrato de sodio, pH 4.8, en un tubo de ensayo de al menos 25 ml.
2. Se añadió 0.5 mL de enzima diluida en el buffer. Se hicieron 2 diluciones de cada muestra de enzima investigada. Una dilución produjo un poco más de 2.0 mg de glucosa (expresados como azúcares reductores) mientras que la otra dilución produjo un poco menos de glucosa, bajo las condiciones de reacción. El objetivo fue producir entre 2.1 y 1.9 mg. de glucosa, respectivamente.
3. Se equilibró a 50 °C. Se incorporó la tira de papel filtro y se mezcló, asegurando una completa inmersión de la tira en el buffer.
4. Se incubó a 50 °C (En baño maría o estufa) por 60 min.
5. Después de la etapa de incubación, se retiraron las muestras y se enfrió para detener la reacción enzimática y se añadió inmediatamente 3.0 mL de reactivo DNS. Se mezcló y transfirió a una rejilla.
6. Se hirvió de forma vigorosa en un baño de agua por exactamente 5 min. Se hirvieron juntas: Ensayos, blanco de referencia y estándares de glucosa. Después de la ebullición, se enfrió en un baño de agua fría.
7. Se diluyeron todas las muestras (ensayos, blanco, y estándares) y se añadió 20 ml de agua destilada. Se mezcló completamente invirtiendo los tubos varias veces.
8. Cuando la “pulpa” sedimentó bien, por ejemplo después de 20 minutos, se midió el color formado contra el blanco a 540 nm.

Curva de calibración de glucosa:

0.5 mL de las diferentes concentraciones de los estándares de glucosa + 1.0 mL de buffer + 3.0 ml de DNS (La muestra se ebulló, diluyó, sedimentó y decantó o filtró, y se midió contra el blanco de referencia).

Nota: Se Prepararon 10 mL de solución base a una concentración de $2.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ con la cual se hicieron las diluciones de anhidroglucosa. Esta solución fue congelada y almacenada (se agitó manualmente después de descongelarse)

Estándares. Se hicieron diluciones a partir de la solución base (ver apéndice I para el cálculo de la curva de calibración).

Blanco de referencia:

1,5 mL de buffer + 3.0 mL DNS (5 min. ebullición, 20 mL H_2O). El blanco se usó para calibrar en cero (absorbancia cero) el espectrofotómetro.

Cálculo de FPU:

Se construyó una curva linear con los estándares de glucosa preparados a diferentes concentraciones ($\text{mg}/0.5 \text{ mL}$) y se graficaron contra A_{540} . Los datos graficados fueron cercanos a una línea recta, con el coeficiente de correlación muy cercano a uno. Se usó esta curva de calibración para determinar la cantidad de glucosa formada por cada muestra. Se estimó la concentración de enzimas que produjeron exactamente 2 mg de glucosa, usando para ello un gráfico construido con los valores de la glucosa producida (azúcares reductores) contra el logaritmo de la concentración de enzimas (apéndice I). Para graficar se utilizó una escala semilogarítmica).

Se Aplicó la fórmula:

$$FPU = \frac{0.37}{\text{Concentración de enzimas que produce 2.0 mg de glucosa}} = \text{Unidades/mL}$$

0.37 es derivado del factor de conversión de equivalentes químicos de 2.0 mg de glucosa/min a μmoles (0.1806), producidas durante el ensayo.

Nota: El término “concentración de enzima” se refiere a la proporción original de la solución de enzima presente en dilución de enzimas (mL de la solución original presentes en cada ml de la dilución).

5.4.3 Azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (Ghose 1987, modificado).

1. Preparación de reactivos necesarios en esta técnica.

A. reactivo DNS (Miller, 1959).

Se disolvió 10 g de DNS en aproximadamente 600 mL de agua a temperatura ambiente con agitación continua en un vaso de 2 L hasta que se disolvió completamente. A continuación se añadió gradualmente 10 g de sosa. Se añadió lentamente hasta disolución 200 g de tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle). Finalmente se añadieron 2 g de Fenol (granular) y 0.5 g de metabisulfito de sodio. Se aforó a 1 litro con agua destilada. Se guardó en frasco ámbar en refrigeración.

B. Buffer de Ácido cítrico/citrato de sodio 0.05 N.

Se mezcló una cantidad determinada de ácido cítrico 0.1 M y citrato de sodio 0.1 M para un buffer de pH deseado (Tabla 2).

Soluciones base:

ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O_2$) 0.1 M (21.011 g en 1 litro)

citrato de sodio ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O_2$) 0.1 M (29.41 g en 1 litro)

x mL de ácido cítrico + y mL de citrato de sodio, diluidos en un total de 100 mL

Tabla 2. Volúmenes de ácido cítrico 0.1M y citrato de sodio 0.1M para obtener un buffer de pH determinado.

Ácido cítrico (mL)	Citrato de sodio (mL)	pH
46.5	3.5	3.0
43.7	6.3	3.2
40.0	10.0	3.4
37.0	13.0	3.6
35.0	15.0	3.8
33.0	17.0	4.0
31.5	18.5	4.2
28.0	22.0	4.4
25.5	24.5	4.6
23.0	27.0	4.8
20.5	29.5	5.0
18.0	32.0	5.2
16.0	34.0	5.4
13.7	36.3	5.6
11.8	38.2	5.8
9.5	41.5	6.0
7.2	42.8	6.2

La exactitud de la tabla es entre ± 0.05 pH a 23 °C.

Se almacenó en refrigeración (+4 °C) por un máximo de 2 meses.

Nota: Para el caso particular de este trabajo el pH de 4.8 necesario para la hidrólisis enzimática se obtuvo con 20.5 mL de ácido cítrico + 29.5 ml de Citrato de sodio.

2. Se utilizó la curva de calibración con estándares de glucosa previamente descrita.
3. Procedimiento.

Se colocó 1 mL de la muestra problema en tubos de precipitados y añadieron 3 ml de buffer citrato/ácido cítrico (pH = 4.8) y 6 ml de reactivo DNS. De la misma manera se preparó el blanco con 4 ml de buffer con 6 ml de reactivo DNS, así como los estándares de glucosa de la curva de calibración, para lo cual se utilizó 1 mL de las diferentes concentraciones de los estándares añadiendo 3 ml de solución buffer y 6 ml de reactivo DNS. Se hirvió en agua por 5 minutos. Las muestras se enfriaron a la temperatura ambiente (Nota: el enfriamiento puede ser en agua fría). Se leyó de transmitancia (%) a 540 nm con el blanco como referencia para 100% de transmitancia. Se aplicó el mismo tratamiento a los estándares, blanco y muestras problema, lo cual fue un paso importante

para el buen resultado de este análisis. Para el cálculo del contenido de azúcares respecto al material original tratado, se aplicó la fórmula:

$$\% \text{Material hidrolizado vs biomasa} = \frac{[\text{Azúcares, mg / mL}](V)100}{mK}$$

m= masa seca inicial, 1 gbs

V = Volumen de hidrolizado

K= masa glucosa/masa anhidroglucosa = 180/162 = 1.111

(Apéndice IV- B y apéndice V-C)

5.5 Azúcares fermentables con HCl concentrado.

5.5.1 Preparación del HCl a 32% y 42.6% (Kirk, 1984).

El ácido clorhídrico es una solución de cloruro de hidrógeno, HCl, en agua. El máximo nivel de disolución es de 37% (en masa, g HCl/g solución), por lo que para obtener una concentración mayor, como 42.6% u otra equivalente, se necesitó burbujear HCl gas en la solución concentrada comercial al 37% (Fig. 18), mientras que para producir HCl al 32% u otra equivalente el HCl comercial concentrado se diluyó con agua desionizada.



Fig. 18. Preparación en el laboratorio de HCl al 42.6%.

En la figura 18 se presenta la producción de HCl gas por la reacción de 150 g de NaCl, contenida en un balón de 2 bocas, con 100 mL de H₂SO₄, el cual fue dosificado lentamente con una pera de decantación. La reacción generó presión, calor y HCl gas, el cual fue conducido a un matraz kitasato con 300 mL de HCl al 37%, en el seno del cual fue burbujeadado, hasta que se agotó la generación del HCl. El matraz kitasato estuvo provisto con una manguera que condujo el HCl no disuelto hacia un recipiente con solución alcalina, que permitió también que el sistema no se presurizara. La solución ácida final se tituló (apéndice III-A) y se guardó en refrigeración.

El procedimiento se llevó a cabo en campana con aeración y se utilizó equipo de seguridad por la corrosividad de los vapores y el HCl concentrado.

5.5.2 Hidrólisis (método Bergius-Rheinau modificado) (Kamm, 2006).

La hidrólisis con solución concentrada de HCl de la biomasa (obtención de azúcares fermentables) se realizó en 2 pasos. En el primero, la muestra se hidrolizó con HCl al 32% a una consistencia de 16.7 % (20 g de muestra con 100 mL de HCl) por 24 horas a 20 °C en matraces cerrados con agitación (Fig. 19). Después de esta etapa la muestra se diluyó con agua 10 veces, y se calentó por 30 minutos a ebullición, se filtró y se lavó 2 veces con 50 mL de agua. El filtrado y el lavado (con los azúcares hidrolizados) se concentraron en un rotavapor hasta que se formó un “caramelo” el cual fue tratado por destilación con etanol (4 veces con 100 mL) hasta que se eliminó totalmente el HCl. El residuo de la primera hidrólisis se sometió a una segunda etapa con 100 mL de HCl al 42.6% bajo las mismas condiciones que la primera etapa. El residuo sólido de ambas etapas se pesó, analizando el contenido de lignina y holocelulosa. Los azúcares obtenidos de esta forma fueron cuantificados evaluando el rendimiento por cada etapa y el contenido de monosacáridos, con lo cual se efectuó un balance de azúcares (Apéndice III B)



Fig. 19. Baño maría con agitación y temperatura controladas para efectuar la hidrólisis ácida de *L. rotundiflorus*.

5.6 Pretratamiento con UV en medio alcalino y digestión enzimática.

5.6.1 Fotoreactor Rayonet.

El pretratamiento fue hecho en un fotoreactor marca Rayonet modelo RPR-200 (the southern New England ultraviolet company, Brandford Connecticut U.S.A) (Fig. 20).



Fig. 20. Fotoreactor Rayonet, con lámparas intercambiables.

El fotoreactor consta de 16 lámparas de diferentes longitudes de onda ($\lambda=2537-5280$ Angstroms, Å), desmontables e intercambiables. Está diseñado para la fotólisis de compuestos heterocíclicos, entre otros. En particular, a $\lambda= 304$ nm, la intensidad generada es de 4×10^{17} fotones /mL/min, con potencia de 21 W e intensidad de 10.01 W/m^2 .

5.6.2 Pretratamiento con UV en medio alcalino (procedimiento).

Se utilizó un proceso aditivo para evaluar los efectos individuales por diferencia (Tabla 3)

Tabla 3. Pretratamiento aplicado a *L. rotundiflorus* en fotoreactor Rayonet.

Tratamiento
L ₃₀₄
S
L ₃₀₄ -S
C-L ₃₀₄ -S
C-L ₃₀₄ -S-E
C-L ₃₀₄ -S-E-C

La simbología utilizada es:

L₃₀₄ = solo luz UV a 304 nm de λ

L₃₀₄-S = luz en medio alcalino (S = NaOH disuelto en agua)

C-L₃₀₄-S = luz en medio alcalino y posterior congelamiento (C = Congelamiento)

C-L₃₀₄-S-E = luz en medio alcalino y posterior ebullición y congelamiento (E = Ebullición)

C-L₃₀₄-S-E-C = congelamiento previo más luz en medio alcalino y posterior ebullición y congelamiento.

Para llevar a cabo los pretratamientos se ubicó un vaso de vidrio con el material en suspensión al 1% de consistencia, utilizando un agitador mecánico (Fig. 21), con 30 horas de tratamiento. Otros factores utilizados fueron: 30 h de congelamiento del material húmedo a -4 °C, si el tratamiento lo requiere; 15% de NaOH; ebullición por 1 hora. Se midió el pH inicial (pHi) y el final (pHf) de la solución, mientras que el material pretratado fue filtrado y lavado con abundante agua, evaluando consumo de sosa en la fracción líquida, así como peso (rendimiento) y lignina por el método de Klason (Tappi T-222) en la fracción sólida.



(A)



(B)

Fig. 21. (A) muestra con agitación mecánica.
(B) fotoreactor trabajando.

5.6.3 Digestión enzimática.

El material pretratado fue posteriormente hidrolizado utilizando una mezcla de enzimas comerciales con: 18 FPU/g de celulasa (sigma celluclast 1.5L, 65 FPU/mL), 30 UI/g de celobiasa (sigma, novozym 188, β -glucosidase obtenida de *Aspergillus niger*, 250 UI/g), y 2.5 % en peso de xilanasa (sigma, β -xilanasa obtenida de *Trichoderma longibrachiatum*, 1 IU/mg) (apéndice IV A).

La hidrólisis enzimática fue hecha en frascos de vidrio tapados en un baño de temperatura controlada a 50 °C, 140 rpm, 2% de consistencia (2 gramos base seca en 50 mL de buffer de ácido cítrico/citrato de sodio) para un pH de 4.8, con 100 μ g/mL de cloruro de tetraciclina y 100 μ g/mL de cloramfenicol utilizados como antibióticos.

Las muestras fueron hidrolizadas a 6, 12, 24 y 48 h. La reacción fue detenida por inmersión en hielo o agua fría y posteriormente las muestras fueron analizadas para determinar su contenido de azúcares reductores por el método DNS (apéndice IV-B).

Se incluyó en la hidrólisis: Biomasa tratada bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura pero sin ningún pretratamiento (referencia); material irradiado con luz solar por 90 h (comparación); Papel Whatman No.1 como celulosa pura para medir la efectividad de la mezcla enzimática.

5.7 Pretratamiento con perácidos y polioxometalatos.

5.7.1 Preparación de la mezcla de perácidos. (Chang, 1993).

Fueron Colocados 68.02 mL (1 mol) de H₂O₂ al 50% en un matraz esmerilado de fondo plano inmerso en un baño de hielo, sobre una placa de agitación. Desde una perilla se añadieron 82.42 ml de ácido sulfúrico concentrado (1.5 moles) por goteo durante una hora con agitación y se dejó reaccionar 45 minutos. Se añadió lentamente de una sola vez 57.2 ml de ácido acético glacial (1 mol) y se dejó reaccionar durante 1 hora (Fig. 22). Se guardó en refrigeración y se tituló cada vez que fue usado.

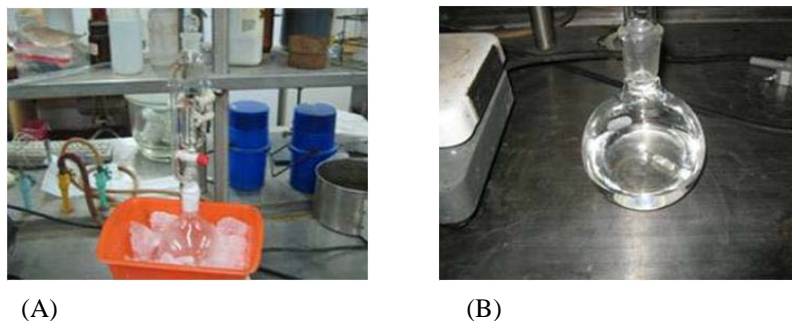


Fig. 22. (A) Reacción del H_2O_2 con el H_2SO_4 .
(B) Mezcla de perácidos obtenidos.

5.7.2 Titulación de perácidos (Pxa) (Oxígeno Activo, OA) (Greenspan, 1948).

Primero se tituló el H_2O_2 residual, para lo cual se colocaron en un vaso de precipitados con agitación: 75 mL de agua desionizada, 15 mL ácido sulfúrico al 10% (v/v) (ocasionando una solución al 5% de ácido), alrededor de 0.4 g de la muestra (se eligió una cantidad que gastara aproximadamente 40 mL de tiosulfato de sodio 0.1 N en la titulación), 3 gotas de indicador de ferroína (sulfato de 1,10 fenantrolina-hierro II), y se tituló con sulfato cérico amoniacal 0.1 N hasta desaparición del color ámbar del indicador. No se desechó y se anotó la lectura. A continuación se tituló el OA añadiendo 10 mL de yoduro de potasio al 10%, titulando el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0.1 N hasta color amarillo paja, agregando en este punto almidón como indicador lo que ocasionó que la solución adquiriera un tono azul. Se continuó la titulación hasta desaparición del color, lo cual permaneció al menos por 30 seg. Se anotó esta lectura y se aplicaron las fórmulas:

$$\% H_2O_2 = \frac{V_{\text{Sulfato cérico amoniacal}} \times N_{\text{Sulfato cérico}} \times 1.7}{\text{Peso especimen, g}}$$

$$\% \text{Oxígeno activo} = \frac{\text{ml tiosulfato} \times N_{\text{Tiosulfato}} \times 0.008 \times 100}{\text{Peso especimen, g}}$$

Nota: El sulfato cérico amoniacal ha sido recomendado para titular el peróxido de hidrógeno. Al añadir yoduro de potasio libera yodo valorable por medio de una solución estándar de tiosulfato de sodio (Apéndice V-A).

5.7.3 *Obtención de la sal de Keggin α -K₅[SiVW₁₁O₄₀] (Domaille, 1984).*

28.8 g (10 mMol) de ácido dodecatungstosilico H₄SiW₁₂O₄₀ (sigma-aldrich) fue disuelto en 25 ml de agua a 40 °C. Se añadió lentamente 7.2 g de NaHCO₃ hasta pH de 7.9. Se añadió gota a gota una solución de 3 g (18 mMol) de sulfato de vanadil (VOSO₄, sigma-aldrich) y entonces la solución fue calentada por 30 minutos a 60 °C. Se añadió lentamente 10 g de KCl manteniendo la temperatura a 60 °C por 15 minutos más. La solución se enfrió a 0 °C por 15 minutos y se obtuvieron por filtración 23 g de material cristalino negro. El material se recrystalizó para purificarlo una vez de 80 a 0 °C (el material fue disuelto en la menor cantidad de agua posible, se calentó a 80 °C y se enfrió a 0 °C), obteniendo un material fino cristalino (Fig. 23).

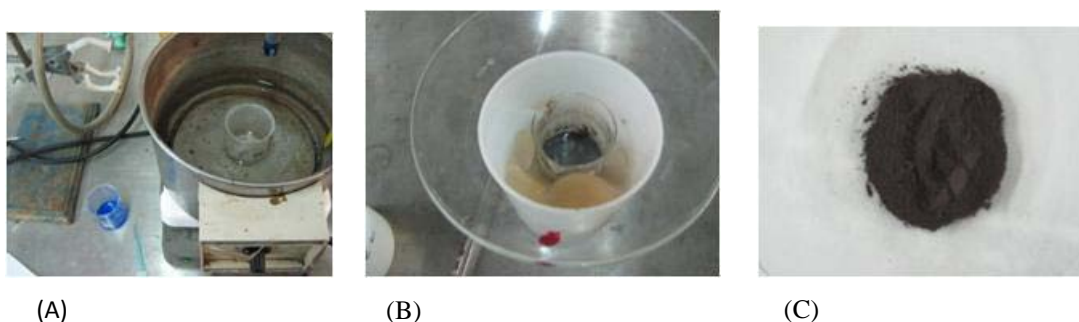


Fig. 23. (A) Disolución de H₄SiW₁₂O₄₀ a 40 °C; (B), (C) sal de Keggin.

5.7.4 *Pretratamiento con perácidos y sal de Keggin.*

Se aplicó un modelo experimental factorial 2⁴ con las variables: carga de mezcla de perácidos (Pxa) como % de Oxígeno activo (OA); Carga de polioxometalatos, en mMol; Temperatura en °C; Tiempo en min. Los azúcares reductores totales fue la variable de respuesta.

10 g de la muestra molida a 10% de consistencia (10 g de material seco en 100 g de mezcla sólido más líquido), fue tratada con la carga de reactivos calculada (ver ejemplo en el apéndice V-B), aplicando las condiciones de tiempo y temperatura especificadas en cada punto del diseño experimental. Se utilizaron reactores de acero inoxidable en baño de aceite de silicón, que permiten aplicar 4 tratamientos simultáneamente (Fig. 24).



Fig. 24. Baño de aceite de silicón en el que se efectuaron los pretratamientos con Pxa y POM's. El sistema está equipado con resistencias que calientan el baño y una flecha giratoria en la que se sujetan los microdigestores.

Después del pretratamiento se separó el residuo sólido del líquido. El residuo líquido, el cual contiene los azúcares hidrolizados fue neutralizado con sosa y filtrado en crisol Gooch de porosidad fina para la evaluación de azúcares reductores. El residuo sólido fue lavado para ser hidrolizado con enzimas (mismas condiciones que en el inciso C de Pretratamiento con UV y digestión enzimática), y filtrado en filtro Gooch de porosidad fina para la evaluación del contenido de azúcares reductores por el método DNS (Apéndice V-C)

5.8 Literatura citada

- American Society for Testing and Materials (ASTM) (2001). Annual book of ASTM, Philadelphia, PA. E 1758-01. Standard Test Method for Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography.
- Chang HM, Jameel H, Song J, Pan D, Amini B, Webster J R, Evans BA, (1993). Method of producing a mixed peracid oxidizing solution and methods for treating substrates therewith, US patent WO 94/06964.
- Domaille PJ, (1984). 1 - and 2-Dimensional Tungsten- 183 and Vanadium-51 NMR Characterization of Isopolymetalates and Heteropolymetalates. JACS 106: 7677-7687.
- Ghose TK, (1987). Measurement of cellulase activities. Pure Appl Chem 59:257-268.
- Greenspan FP, (1948). Analysis of aliphatic peracids. Anal. Chem. 20: 1061-1063
- Kamm B, Kamm M, Schmidt M, Starke I, and Kleinpeter E, (2006). Chemical and biochemical generation of carbohydrates from lignocellulose-feedstock (*Lupinus nootkatensis*)-quantification of glucose. *Chemosphere* 62: 97-105.
- Kirk-Othmer (1984). Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd Edition, Volume IV. Wiley Interscience, New York, 697-720.
- Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem 31: 426-428.
- Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) (2002). TAPPI Standards, Atlanta, Georgia, GA.

T-222 0m-88 Lignina de madera y pulpa insoluble en ácido

T-257 cm-85 Muestreo y preparación de madera para análisis

T-264 om-88 Preparación de madera para análisis químico

Wise LE, Murphy M, and D'Adieco A, (1946). Chlorite holocellulose, its fractionation and beating on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. Paper Trade J. 122(2), 35.

6. Capítulos

Los resultados de la investigación se presentan en los siguientes capítulos.

1. J. Jesús Vargas Radillo, Mario A. Ruiz-López, Ramón Rodríguez Macías, Lucía Barrientos Ramírez, Pedro M. García-López, and Fernando A. López-Dellamary Toral
Fermentable sugars from *Lupinus rotundiflorus* biomass by concentrated hydrochloric acid hydrolysis
Publicado en BioreSources (2011) 6(1):345-356
2. J. Jesús Vargas Radillo, Mario A. Ruiz-López, Ramón Rodríguez Macías, Lucía Barrientos Ramírez, Eduardo Salcedo Pérez, Fernando Navarro Arzate, Fernando A. López-.Dellamary Toral, Ricardo Manríquez González.
Fermentable sugars from *Lupinus rotundiflorus* by photolysis, freezing-defreezing and enzymatic hydrolysis
(Borrador preliminar para ser enviado a evaluación. Para su versión final consultar la literatura actualizada)
3. J. Jesús Vargas Radillo, Mario A. Ruiz-López, Ramón Rodríguez Macías, Lucía Barrientos Ramírez, Eduardo Salcedo Pérez, Fernando A. López-.Dellamary Toral, Ricardo Manríquez González.
Pretreatment of *Lupinus rotundiflorus* biomass using Peracids mix and Keggin salt to improve enzymatic digestion
(Borrador preliminar para ser enviado a evaluación. Para su versión final consultar la literatura actualizada)

FERMENTABLE SUGARS FROM *Lupinus rotundiflorus* BIOMASS BY CONCENTRATED HYDROCHLORIC ACID HYDROLYSIS

J. Jesús Vargas Radillo,^a Mario A. Ruiz-López,^b Ramón Rodríguez Macías,^b Lucía Barrientos Ramírez,^a Pedro M. García-López,^b and Fernando A. López-Dellamary Toral^{a*}

It is of general interest to produce fermentable carbohydrates from plant biomass. However, obtaining monosaccharides requires some effort, due to the intricate structure of the cell wall lignocellulosic complex. The aim of this study was to apply a simple two-stage hydrolysis process, using only concentrated hydrochloric acid, to generate fermentable carbohydrates from *L. rotundiflorus* biomass. First and second stage acid concentrations were 32% and 42.6%. Total monosaccharide yields with respect to dry matter after the first stage, second stage, and the overall process, were 27.5%, 21.0% and 48.4%, respectively. Xylose was the main first stage carbohydrate in the hydrolysate, followed by glucose, arabinose, and galactose. After the second stage only glucose and a small amount of xylose were detected. The polysaccharide hydrolysis was eased by overall low lignin content. Some advantages of this method were the use of a single hydrolyzing agent and that most of the polysaccharides were hydrolyzed in reasonably high yields. The acceptable yield, relative simplicity, the use of most of the biomass along with the wide availability, low cost of the chemicals, and the ample supply of lupines, would facilitate the scaling of these laboratory studies to pilot and industrial levels.

Keywords: *Lupinus*; *Carbohydrate*; *Hydrolysis*; *Morphology*; *Holocellulose*; *Fermentable*

Contact information: a: Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, Km 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México, código postal 45220; b: Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Km 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México, código postal 45220; *Corresponding author: fernando.dellamary@cucei.udg.mx

INTRODUCTION

Lignocellulosic biomass is an abundant, inexpensive and renewable resource, which can be utilized for the production of alcohols at a reasonable cost. Conversion of this biomass into alcohols is a difficult process due in part to the complexity of the plant's fiber cell wall. The cell wall is composed of cellulose (38-50%), hemicelluloses (17-32%), lignin (15-30%) as well as proteins, pectins, and extractives (Kamm et al. 2006; Moxley and Zhang 2007; Silverstein et al. 2007; Ritter 2008). Hydrolysis of lignocellulosic materials, especially the enzymatic hydrolysis, is affected by substrate characteristics such as mechanical properties, morphology, crystallinity, and chemical structure (Lee et al. 1982). Morphological analysis of the plant material may be of practical use in helping to predict the accessibility to hydrolysis of the polysaccharides

comprising the plant tissues, particularly that of fibers and parenchyma from which fermentable carbohydrates could be released. Thus, anatomical structural analysis of the material is of help in qualitatively predicting how easily the acid will penetrate these structures, by observing if the fibers are closely bound to each other, by the distribution of the fibers, by the ratio and distribution of parenchyma in relation to fibers, etc. It is assumed that parenchyma will be easier to hydrolyze, since it is made up of amorphous non-fibrous cellulose and hemicelluloses with little or no lignin, in contrast to fibers wherein cellulose is present within a lignocellulosic complex, in which lignin is very refractive to hydrolysis. Also, the cellulosic fibers have a clearly higher degree of crystallinity (Fengel and Wegener 1989), making them somewhat impervious to acid penetration. Both parenchyma and fibers have similar monosaccharide composition, as has been reported elsewhere (Jones et al. 1979).

For the reasons just described, pretreatment and hydrolysis of this raw material for subsequent fermentation by yeast are the main hurdles in the production of alcohols from lignocellulosic feedstocks (Sánchez and Cardona 2005). Pretreatment alters the lignocellulosic matrix, thus allowing the subsequent hydrolytic degradation of polysaccharides to monosaccharides (saccharification). These processes may be carried out by either biotechnological methods preceded by physical or physicochemical treatments, or by chemical methods with dilute acids at high temperature (Iranmahboob et al. 2002), concentrated acids at low temperatures (Pessoa et al. 1997), or a combination of both (Kamm et al. 2006). Mineral acid hydrolysis has been described at least since 1819 (Harris and Beglinger 1946). Acid hydrolysis may be divided into two general approaches (Bergius 1937; Ladisch 1979; Taherzazeh and Karimi 2007; Galbe and Zacchi 2002): A) Concentrated acid at low temperatures, and B) dilute acids at high temperatures, which can be performed with different acids, such as sulphurous, sulphuric, hydrochloric (Israilides et al. 1978; Goldstein et al. 1983), hydrofluoric, phosphoric (Israilides et al. 1978), nitric and formic, using low solids loadings (5-10% w/w) (Brennan et al. 1986; Converse et al. 1989) or high solids loadings (10-40% w/w) (Esteghlalian et al. 1997). There are several concentrated HCl processes. The earliest one was used in Germany from 1935 to 1948, where full scale plants were built; it is known as the Bergius-Rheinau process. This process uses one 41% HCl hydrolysis stage with a 3:1 acid:wood ratio. The modified Bergius process known as Udic-Rheinau, consists of three stages; a pre-hydrolysis with 35% HCl at 20°C, a main hydrolysis with 41% HCl, and a post-hydrolysis with dilute acid. Most of the acid is recovered by azeotropic distillation at 36 °C, and the residual acid is removed from the syrup by drying it in a hot air spray diffuser (Fengel 1984; Ladisch 1979). Nevertheless, an improved and efficient HCl recycling process is necessary to make the Bergius process competitive. Attaining this goal has stimulated a lot of research. Recently the Israeli company HCl CleanTech, has developed a proprietary HCl recovery process, recovering HCl in gaseous form directly from aqueous solutions by using an immiscible extractant, such as trilaurylamine-dinonylnaphtalene sulfonic acid in a hydrocarbons diluent having a boiling range starting at 210°C (Eyal and Baniel 2010), which makes the modified Bergius-Rheinau process economically attractive and “clean”. A pilot plant running this process was built at Southern Research Institute, North Carolina, U.S. and is working since June 2010. The plant takes in 1.25 tons per day of cellulosic feedstock. It is claimed that the

cost of the sugars produced is at least 17% lower than the cost of corn mill sugars and of similar quality (HCl Clean Tech 2010).

On the other hand the Fabaceae (Leguminosae) is a plant family amply distributed around the world and economically very important as a food source. The *Lupinus* genus belongs to this family and consists of around 300 species, with some 2000 synonymia (Gladstones 1998); it is widely distributed in the Americas and Mediterranean regions with *ca.* 80 native species described for Mexico (McVaugh 1987; Rzedowski and Rzedowski 2001). *L. rotundiflorus* is a wild lupine (sometimes spelled “lupin”) that grows in Mexico at altitudes of 1500 to 2000 m above sea level in the Pacific mountains and the western part of the volcanic axis, in pine and oak forest clearings, and near roadsides. It is an herbaceous plant; its branched basal crown consists of a small stem that underlines a cluster of many shoots. It is an available and fairly common wild species, easy to collect and with a potential to be established as a commercial crop (Ruiz et al. 2000). Elsewhere other lupines have been investigated and developed to be used as commercial crops. Thus, for example, Alaska-lupine today is grown in Iceland, where it was introduced in 1945, with yields (dry mass) *ca.* 7-8 ton/ha/year (Kamm 2006). Some of this production using the modified “Bergius/Rheinau” process is aimed at the biofuels and biorefinery (ethanol and lignin) markets. Also lupines are grown and processed extensively in Australia, Andean countries, and some European countries (Bañuelos et al. 2006). Although wild lupine species are widely distributed in Mexico, their utilization as animal feed or for human consumption is limited by their high alkaloid content without further processing. Production of fermentable sugars from this biomass can be an alternative use for this Mexican wild species. Therefore, the objective of this study was to evaluate the yield of fermentable soluble carbohydrates from *Lupinus rotundiflorus* biomass, choosing a proven and industrially successful 2-stage concentrated hydrochloric acid process, followed by a post-hydrolysis with diluted acid. This method is based on the modified Bergius process (Kamm 2006).

EXPERIMENTAL

The whole experimental procedure is schematized as shown in Fig. 25.

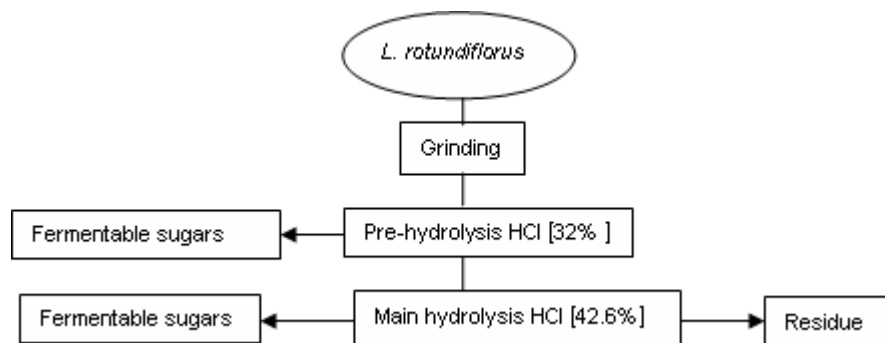


Fig. 25. Schematic presentation of the acid saccharification of *L. rotundiflorus*

Plant Collection and Sample Preparation

Whole plants of *L. rotundiflorus* were collected in the wild form during their flowering stage in October, 2008, at 2320 m above sea level in the vicinity of Atemajac de Brizuela, a town situated in western Mexico, 105 Km SW of Guadalajara, Jalisco. They were air dried and separated into stems, branches, roots, and leaves. Each part was then ground in a Wiley mill with 0.5 mm screen and stored in plastic bags at -4°C . Holocellulose (hemicelluloses and cellulose) (Wise et al. 1946), acid insoluble lignin (TAPPI T222), and extractives (TAPPI T264) content of each part were determined as described in the literature. Particularly, in the Wise procedure for the determination of holocellulose, each extractive-free ground sample is treated with one percent (1%; w/v) sodium chlorite followed by glacial acetic acid in a water bath at 70°C . The reaction is allowed to continue for 4 h, adding each hour acetic acid and sodium chlorite. The sample is filtered through a medium porosity filter glass previously weighed and is dried in a vacuum oven at 40°C until constant weight.

These analyses were carried out to evaluate which plant parts had a higher content of hydrolysable carbohydrates, hence making it possible to decide which parts would be desirable to process and which to discard. Thus the foliage was cast aside.

Anatomy

Transversal histological sections, 20 μm thick, were prepared from the basal stem using a Leica Microtome. Some of the sections were stained with safranin and astral blue. Both stained and non-stained sections were placed on microscope slides and fixed in euparal mounting medium (Burger and Richter 1991).

The maceration study was carried out according to Franklin (1937). Sections of external cortex, internal cortex, and xylem were placed in test tubes, then a mixture of glacial acetic acid and 30% hydrogen peroxide at a 1:2 (v/v) ratio was added and heated to 60°C until the tissue was soft. The softened tissues were removed, drained, and then stained and fixed in the same manner as the transversal sections. The histological observations were done using a Wild compound light microscope at 10X and 40X magnification. The length and diameter of 30 fibers were measured using a certified scale attached to the microscope ocular.

Acid Hydrolysis

All chemicals used were of reagent grade and the water was deionized. 20 g of ground plant material (o.d. basis) were hydrolyzed with 100 mL of 32% (w/w) hydrochloric acid in a 250 mL Erlenmeyer flask sealed with a rubber stopper for 24 h in an orbital shaker at 20°C . After this, the suspension was diluted tenfold with water, heated for 30 min at 100°C , filtered, and then washed twice with 50 mL of water. The combined filtrate and washings were concentrated to around 15 mL using a rotary evaporator ($T=40^{\circ}\text{C}$, $p=200$ mbar) until a thick syrup was formed, this evaporation eliminated most of the acid. The syrup was taken to near neutrality by removing the residual HCl by addition of ethanol (4x100 mL) with subsequent distillation to dryness, after which the residue was fully dried in an exsiccator. The solid residue from the first hydrolysis was digested likewise for 24 h at 20°C , using 100 mL of 42.6% (w/w) hydrochloric acid (produced by bubbling pure gaseous HCl into concentrated reagent

grade HCl) (Kirk 1984), filtered, and rinsed twice with 50 mL of water. The liquid portion was concentrated and dried as described above (Kamm et al. 2006). Sugars recovered from the liquid fractions of the first and second hydrolysis were weighed. The solid residues remaining in both stages of hydrolysis were dried at 40°C for 48 h, weighed, and analyzed to quantify lignin and holocellulose content. This procedure was carried out in duplicate.

The yield of fermentable sugars was evaluated by the difference in holocellulose content on each hydrolytic stage, and verified directly by the weight of the thick syrup (concentrated sugars), as a simple alternative to the DNS method (Miller 1959) commonly used in the evaluation of total reducing sugars.

Sugar Analysis

Monosaccharides were determined using a Varian HPLC (Vista 5500) equipped with a refractive index detector (Varian model 350), a polymeric Hamilton HC-75 Ca (305 x 7.8 mm) column at 80°C, and HPLC-grade water as the mobile phase (0.6 mL/min). Sugars were quantified using D-glucose, D-xylose, D-galactose, D-arabinose, and D-mannose as external standards. Chromatograms were processed using the Star Varian software.

Solid samples from untreated raw material were totally hydrolyzed with sulfuric acid (72% w/w), then neutralized with barium hydroxide (ASTM Method 1758-01), filtered through a 0.45 µm Millipore nylon membrane, and passed through cationic, anionic, and C₁₈ cartridges. In order to assay the relative amounts of different monosaccharides in the hydrolyzates (liquid filtrates), one milliliter of the concentrated (after rotary evaporation) first and second acid filtrates, was diluted to 1 L in water and then an aliquot filtered and passed through cartridges and HPLC analyzed as has been described above for the solid samples.

Sugars conversion as percentage of the theoretical glucose yield obtained from the equation for the hydrolysis process of cellulose to sugar



was calculated as follows (Mandela *et al.* 1976),

$$\text{glucan conversion efficiency} = \frac{\text{weight of glucose formed} \times \left(\frac{162}{180}\right)}{\text{dry weight of cellulose used}} \times 100 \quad (2)$$

where a factor of 162/180 was applied due to the difference in mass between the anhydroglucose ring and glucose. Similarly, a factor of 132/150 was applied due to the mass change in the hydrolysis of xylans to xylose.

The fermentable sugars yield was also calculated with respect to the input dry raw material, and as grams per 100 g raw material. This helps to give an idea about of the amount of fermentable sugars that could be obtained from the material (Sassner et al. 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

Anatomic Characteristics

All weight and percent compositions are given on an oven-dry basis. The plant percent weight composition was 12% roots, 57% stem and branches, 29% leaves, and 2% flowers and pods. Upon microscopic examination (Fig. 26) of a basal stem transversal section, the external cortex, internal cortex, and xylem of *L. rotundiflorus* contained fibers, some were gelatinous, with a density of 90 fiber/mm², xylem having the highest density. Fibers showed little lignification, with thick cell walls and sharp angular ends. The fiber's average length, diameter, and cell wall thickness were 1.1 mm, 19 μm, and 4.9 μm, respectively. The xylem's fibers were shorter than those of the external and internal cortex. *L. rotundiflorus* fibers were longer than those reported for *L. meridanus* or *L. eromonomos* (0.5 mm for the stem fibers and 0.78 mm for the root fibers) collected respectively in Venezuela at 3000 and 4200 m above sea level (Briceño 2000).

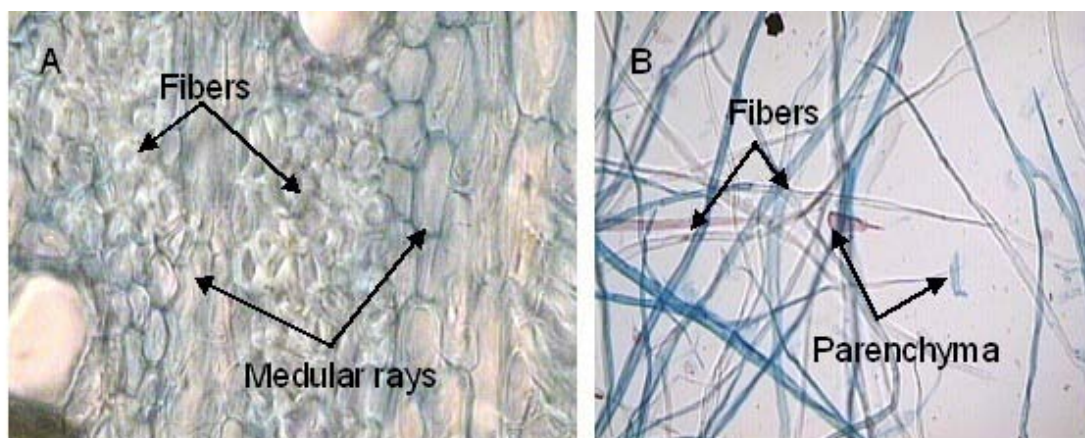


Fig. 26. Optical microscope micrographs of *L. rotundiflorus*:
A. Basal stem transversal section, 10X. B. Macerated material, 40X

Chemical Composition

The holocellulose content (Table 4) found in the stem, root, and branches was within the normal range (53-82%), although lignin content was lower than the 15 to 30% reported in common plant material (Ritter 2008). This difference could be due to the phenological stage of the plant at the time of collection. Leaves (petioles included) contained the lowest levels of holocellulose and lignin. Nevertheless, their lignin content (10.3%) was similar to those reported for the leaves of some leguminous plants such as soybean (10.7%) (Johnson et al. 2007).

Table 4 indicates the monosaccharide content of the four plant parts analyzed. In general, glucose was found in the highest relative concentration followed by xylose, galactose, arabinose, and mannose in that order. In contrast, leaves contained relatively higher concentrations of arabinose, galactose, and mannose in comparison with the other plant parts. The arabinose and mannose content was less than 7%, with roots having the lowest levels (0.4% and 0.5%).

Table 4. Chemical Composition and Monosaccharide Content of *L. rotundiflorus* Plant Parts (%)

Plant Part	Holocellulose	Lignin	Extractives	Ara ¹	Gal ¹	Glu ¹	Xyl ¹	Man ¹
Stem	72.2	14.0	15.4	4.0	13.0	61.2	20.7	1.1
Branches	65.6	13.2	25.6	3.2	12.3	63.8	19.6	1.1
Roots	69.7	11.7	19.4	0.4	12.5	61.4	25.2	0.5
Leaves	47.0	10.3	37.4	6.2	16.0	61.4	11.2	5.2

Ara=Arabinose; Gal=Galactose; Glu=Glucose; Xyl=Xylose; Man= Mannose

¹ Relative percent composition

Plant without foliage (Table 5), which was used for acid hydrolysis, contained 62.6% holocellulose, 15.8% lignin, and 22.6% extractives; while monosaccharide content was similar to that found in each plant part.

Table 5. General Chemical Composition and Monosaccharide Content in *L. rotundiflorus* Without Foliage and After Each of the Stages of HCl Hydrolysis (%)

	Holocellulose	Lignin	Extractives	Ara ¹	Gal ¹	Glu ¹	Xyl ¹	Man ¹
Whole plants without foliage	62.6	15.8	22.6	3.3	11.0	61.0	24.0	0.7
First step hydrolysis (32% HCl)	31.4 (s.f.)	14.8 (s.f.)	nd	14.8 (l.f.)	12.7 (l.f.)	22.5 (l.f.)	46.5 (l.f.)	tr
Second step hydrolysis (42.6% HCl)	8.0 (s.f.)	14.5 (s.f.)	nd	nd	nd	97.7 (l.f.)	2.3 (l.f.)	nd

Ara=Arabinose; Gal=Galactose; Glu=Glucose; Xyl=Xylose; Man= Mannose

s.f. = solid fraction; l.f. = liquid fraction

¹ Relative percent composition.

nd, not detected

tr, trace

Acid Hydrolysis

After the two-step hydrolysis only 8.0% of the original carbohydrates (62.6% holocellulose) remained (Table 5). The difference of 54.6 percent units (48.4 considering the hydrolysis factor) with respect to the original carbohydrates (Table 6) was conceived as hydrolyzed carbohydrates; 31.2 percent units (27.5) and 23.3 percent units (21.0) of the total available sugars were recovered in the first and second phase, respectively. These data are consistent with those obtained when the purified hydrolyzates (thick syrup) were weighed, assuming they are comprised only of hydrolyzed carbohydrates.

The insoluble residue (22.5%) contained 14.5% lignin and 8% undigested carbohydrates.

Table 6. Hydrolyzed Sugars Yield After the Different Saccharification Steps of *L. rotundiflorus* with HCl, Insoluble Residue and Lost (unrecovered) Material (%)

Sugars yield first hydrolysis	Sugars yield second hydrolysis	Sugars overall yield	Insoluble residue	Extractives	Total	Lost material ¹
27.5	21.0	48.4	22.5	22.6	87.7	12.3

Data are the average of two replicates

Insoluble residue = 14.5% lignin + 8.0% undigested carbohydrates

¹Lost material = 100 – %Total

Although the yield from *L. rotundiflorus* was lower than those that can be achieved from biomass sources such as starch (100%), it represents an important source of fermentable carbohydrates. The conversion of lupine biomass into fermentable sugars would not compete with materials such as starch that are destined for human or animal consumption.

Figure 27 depicts the changes in lignin and holocellulose content with respect to the total original weight of the plant material after each acid hydrolysis stage. As expected, there was a negligible change in the lignin content. Lignin is known to be refractory to acid hydrolysis. However, contrary to lignin, the holocellulose content decreased in proportion to the amount of fermentable sugars obtained in each acid hydrolysis step. Almost all of the hemicelluloses and of the extractives were solubilized by the acidic conditions used in the first stage.

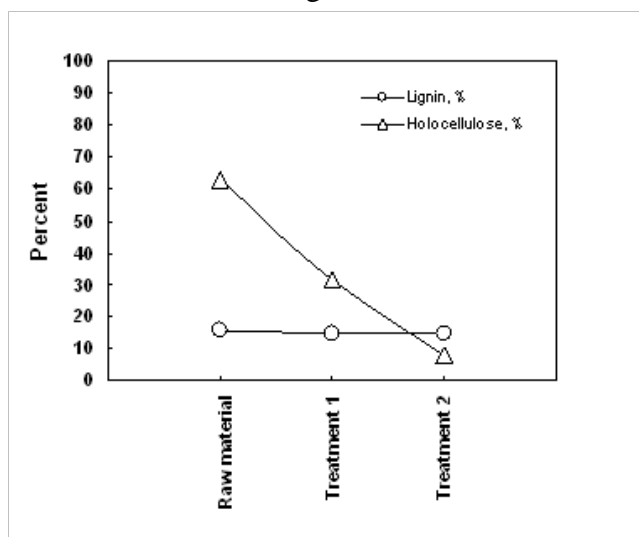


Fig. 27. Holocellulose (sugars) and lignin content variation in raw material (before hydrolysis) and in the insoluble residues after the two stage hydrolysis of *L. rotundiflorus* without leaves

Also shown in Table 5 are the initial content and the monosaccharides released during the first and second hydrolysis stages. The main carbohydrate present in the hydrolyzate after the first stage was xylose (46.5% relative composition), followed by glucose, arabinose, and galactose, while in the second phase glucose (97.7%) and xylose (2.3%) were the only two carbohydrates present.

The total hydrolysis process used in this study produced, per 100 g of dry matter, 26.8 g of glucose (70% glucan conversion efficiency), 13.2 g of xylose (88.1% conversion), and 7.6 g of other sugars such as arabinose and galactose (81% conversion). This is probably due to the fact that pentoses such as xylose and arabinose are easier to hydrolyze from polysaccharides in acidic media than are the hexoses glucose, galactose, and mannose (Moxley and Zhang 2007).

The results from this study are similar to those reported for *Lupinus nootkatensis* (Kamm et al. 2006). Using the same process they reported 55% yield in total fermentable carbohydrates, 30% in the first phase, and 25% in the second phase. Xylose was 60 to 80% of carbohydrates present in the first phase with only small quantities of arabinose, glucose, galactose, while in the second phase glucose was 80% of the carbohydrates, and only traces of xylose, mannose, and galactose were found.

Fermentation processes can be utilized to transform glucose and xylose into alcohols, i.e. ethanol and n-butanol, as well as other chemicals such as furfural. These compounds are or might be the basis for many industrial organic chemicals and substitutes of petrochemical products, including polymers, pharmaceutical, pesticides, dyes, etc.

CONCLUSIONS

Before and during the flowering stage *Lupinus rotundiflorus* fibers in the xylem as well as in the external and internal cortex contain little lignin. This facilitates the release of fermentable sugars by acid hydrolysis. Hydrolysis of plant materials released mainly xylose and glucose in the first step and mostly glucose in the second step. It is well known that xylose-based hemicelluloses are more prone to acid hydrolysis in comparison to glucose-based cellulose.

One advantage of this method is the use of a single hydrolyzing reagent in both stages to release fermentable sugars from the plant material. This is combined with the fact that *L. rotundiflorus* is a wild plant that may be easily grown even in poor soils and different climates. The acceptable yield and relative simplicity of this saccharification process, the use of most of the biomass, including roots, but excluding foliage, along with the wide availability, low cost of the chemicals, more efficient acid recovery and the ample supply of lupines, particularly after the development of commercial growing of *L. rotundiflorus*, would facilitate the scaling of these laboratory studies to pilot and industrial levels.

However, hydrochloric acid is a corrosive and dangerous chemical that requires special handling and recycling procedures. The use of enzymes is a well known alternative to acid hydrolysis in obtaining fermentable sugars; however their use may carry along some disadvantages as well, such as relative complexity of the process, as well as concerns about the availability and cost of suitable enzymes.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to express our thanks for the financial support received from the Science and Technology National Council (CONACYT) of Mexico, and from the BEMARENA Graduate Studies Program (Biosystems, Ecology, Natural Resources and Agricultural Management) of the Department of Botany/CUCBA, University of Guadalajara, Guadalajara, Mexico.

REFERENCES CITED

- American Society for Testing and Materials* (ASTM) (2001). *Annual Book of ASTM*, E 1758-01, Philadelphia, PA.
- Bañuelos, J., and Jiménez, S. (2006). “La importancia y el estado actual del género *Lupinus*,” in: *Lupinos del Occidente de México (Estudios biológico, bioquímico y toxicológico)*, Bañuelos, J., Ruiz, M. A., Soltero, R., and Castañeda, H. (eds.), Universidad de Guadalajara, Ediciones de la Noche, Guadalajara México, 13-33.
- Bergius, F. (1937) “The production of food-stuffs, alcohol and glucose from wood by means of the Bergius-Rheinau process,” *Current Science* 632-637.
- Brennan, A. H., Hoagland, W., and Schell, D. J. (1986). “High temperature acid hydrolysis of biomass using an engineering-scale plug flow reactor: Result of low solids testing,” *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 17, 53–70.
- Briceño, B., Azóca, A. R., Fariñas, M., and Rada, F. (2000). “Características anatómicas de dos especies de *Lupinus l.* de los Andes Venezolanos,” *Pittieria* 1(29 and 30), 21-33.
- Burger, L. M., and Richter, H. G. (1991). *Anatomia da Madeira*, Nobel Press, Brasil, 97-105.
- Converse, A. O., Kwartneg, I. K., Grethlein, H. E., and Ooshima, H. (1989). “Kinetics of thermochemical pretreatment of lignocellulosic materials,” *Appl. Biochem. Biotechnol.* 20/21, 63-78.
- Esteghlalian, A., Hashimoto, A. G., Fenske, J. J., and Penner, M. H. (1997). “Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass,” *Bioresour. Technol.* 59, 129-136.
- Eyal, A. and Baniel, A. (2010). “Process for the recovery of HCl from a dilute solution thereof,” US Pat. App. 20100093995.
- Franklin, G. (1937). “Permanent preparations of macerated wood fibres,” *Tropical Woods* 49, 21-22.
- Fengel, D., and Wegener G. (1984). “Utilization of wood and wood components for chemicals and energy,” in: *Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, Walter de Gruyter, Berlin, 526-566
- Fengel, D., and Wegener, G. (1989). “Cellulose,” in: *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, Walter de Gruyter, Berlin, 68-106.
- Galbe M. and Zacchi G. (2002). “A review of the production of ethanol from softwood,” *Appl Microbiol Biotechnol.* 59, 618-628.

- Gladstones, J. S. (1998). "Distribution, origin, taxonomy, history and importance," in: *Lupins as Crop Plants: Biology, Production and Utilization*, J. S. Gladstones, C. Atkins, and J. Hamblin (eds.), CAB International, UK.
- Goldstein, I. S., Pereira, H., Pittman, J. L., Strouse, B. A., and Scaringelli, F. P. (1983). "The hydrolysis of cellulose with superconcentrated hydrochloric acid," *Biotechnol. Bioeng.* 13, 17-25.
- Harris, E. E., and Beglinger, E. (1946). "Madison wood sugar process," *Ind. Eng. Chem.* 38, 890-895.
- HCL CleanTech (2007). www.hclcleantech.com, accessed December 1, 2010.
- Iranmahboob, J., Namied, F., and Monemi, S. B. (2002). "Optimizing acid-hydrolysis a critical step for production of ethanol from mixed wood chips," *Biomass Bioenergy* 22, 401-404.
- Israilides, C. J., Grant, G. A., and Han, Y. W. (1978). "Sugar level, fermentability, and acceptability of straw treated with different acids," *Appl. Environ. Microbiol.* 36 (1), 43-46.
- Jones, R. W., Krull, L. H., Blessin C. W., and Inglett G. E. (1979). "Neutral sugars of hemicellulose fractions of pith from stalks of selected plants," *Cereal Chem.* 56 (5), 441-442.
- Johnson, J. M.-F., Barbour, N. W., and Weyers S. L. (2007). "Chemical composition of crop biomass impacts its decomposition," *Soil Biol. Biochem.* 71(1), 155-162.
- Kamm, B., Kamm, M., Schmidt, M., Starke, I., and Kleinpeter, E. (2006). "Chemical and biochemical generation of carbohydrates from lignocellulose-feedstock (*Lupinus nootkatensis*)-quantification of glucose," *Chemosphere* 62, 97-105.
- Kirk-Othmer (1984). *Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd Edition, Volume IV. Wiley Interscience, New York, 697-720.
- Ladisich, M. R. (1979). "Fermentable sugars from cellulosic residues," *Process Biochemistry* 21-25.
- Lee, S. B., Ryu, D. D. Y., and Mandels, M. (1982). "Effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis," *Biotechnology Bioengineering* 24, 2137-2153.
- Mandels, M., Andreotti, R., and Roche, C. (1976). "Measurement of saccharifying cellulose," *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 6, 59-67.
- McVaugh, R. (1987). "A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico," in: *Flora novogaliciana. Vol. V. Leguminosae.*, The University of Michigan Press, Ann Arbor, MI, USA, 580-599.
- Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars," *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 5, 193-219.
- Moxley, G., and Zhang, Y.-H. P. (2007). "More accurate determination of acid-labile carbohydrate in lignocellulose by modified quantitative saccharification," *Energy & Fuels* 21, 3684-3688.
- Pessoa, A. J. R., Manchilha, I. M., and Sato, S. (1997). "Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse," *Braz. J. Chem. Eng.* 14, 104-164.
- Ritter, S. K. (2008). "Lignocellulose: A complex biomaterial," *Plant Biochemistry* 86(49), 15.

- Ruiz, M. J. J., Ruiz, M. A., and Zamora, J. F. (2000). "The genus *Lupinus*: Taxonomy and Distribution in Jalisco, Mexico," in: *Proceedings of the 9th International Lupin Conference*, Van Santen, E., Wink, M., Weissmann, S., and Roemer, P. (eds.), Klink/Muritz, Germany, 297-300.
- Rzedowski, G. C., and Rzedowski, J. (2001). "Conocimiento y uso de la biodiversidad," in: *Flora Fanerogámica del Valle de México*, 2a. ed., Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México, 298.
- Sassner, P., Martensson, C.-G., Galbe, M., and Zacchi, G. (2008). "Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated salix for the production of bioethanol," *Bioresource Technology* 99, 137-145.
- Sánchez, O. J., and Cardona, C. A. (2005). "Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas," *Interciencia* 30(11), 671-678.
- Silverstein, R. A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M. D., and Osborne, J. (2007). "A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks," *Bioresource Technol.* 98, 3000-3011.
- Taherzazeh, M. J. and Karimi, K. (2007). "Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review," *BioResources* (<http://www.bioresources.com>) 2(3), 472-499.
- Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) (2002). *TAPPI Standards*, Atlanta, Georgia, GA.
- Wise, L. E., Murphy, M., and D'Adieco, A. (1946). "Chlorite holocellulose, its fractionation and beating on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses," *Paper Trade J.* 122(2), 35.

Article submitted: October 17, 2010; Peer review completed: November 20, 2010;
Revised version received and accepted: December 8, 2010; Published: December 10, 2010.



Fermentable sugars from *Lupinus rotundiflorus* by photolysis, freezing-defreezing and enzymatic hydrolysis

J. Jesús Vargas Radillo^a, Mario A. Ruiz-López^{b*}, Ramón Rodríguez Macías^b, Lucía Barrientos Ramírez^a, Eduardo Salcedo Pérez^a, Fernando Navarro Arzate^a, Fernando A. López-Dellamary Toral^a, Ricardo Manríquez González^a

^a Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, Km 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México, código postal 45220

^b Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Km 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México, código postal 45220

Abstract

A photochemical pretreatment was applied over slurry grinding *Lupinus rotundiflorus* to enhance enzymatic hydrolysis. UV_B Light ($\lambda=304$ nm) emitted by lamps in a photochemical reactor Rayonet in alkali medium. Freezing, defreezing and heat were others factors used. After pretreatment, samples showed swelling and little delignification or no delignification. Light alone had not great effect over enzymatic hydrolysis, but this factor in joint to all other factors allowed 52% saccharification (83% hydrolysis rate of original sugars content). At equivalent experimental conditions samples treated with sunlight and UV lamps showed the same level of saccharification.

Keywords: Lignocelluloses, Saccharification, Hydrolysis, UV light, sunlight

1. Introduction

Lignocellulosic biomass is a complex microstructured material, composed of varying proportions of lignin and hemicelluloses forming an encapsulating matrix enclosing cellulose fibrils packed into bundles [1], making biomass sources difficult to deconstruct [2].

This recalcitrance is in addition due to the highly crystalline structure of cellulose embedded in such a matrix of polymers and its scarce pore volume. Different pretreatments are used to overcome this intractability, in order to decomplexify the cellulose from the matrix polymers, and to make it more accessible for enzymatic hydrolysis. Chemical (alkali, acid, etc.), physical (milling, high energy radiation, etc.), or biological (fungi or bacteria)

*Corresponding author: Tel.: +(33)37771192; Fax: +(33)36820643
E-mail addresses: mruiz@cucba.udg.mx

pretreatments or some combination of them, is required to disrupt the lignin-hemicelluloses-cellulose interaction [3]. One very common pretreatment is using soda or lime at “high concentration” (6-20%), low pressures and temperatures, which causes swelling of the complex as well as some degradation of lignin. High intensity gamma radiations have been used alone or combined with other pretreatments [4]. Photolysis in aqueous media causes photo-degradation of certain compounds, i. e. phenolics, through absorption of radiation which leads to electronic excitation, and the formation of free radicals, such as the hydroxyl OH^\bullet and $\text{O}_2^{\bullet-}$ that are able to degrade lignin in aqueous media [5]. In another investigation, a photochemical delignification treatment was applied to a Kraft softwood pulp at 45°C , containing 10% sodium hydroxide (w/w), 0.5 % Rose Bengal (w/w), by irradiation with UV light (300 nm and 400 W) for up to 22 h to maximize the effects. Each of the preceding variables resulted in increased delignification when applied and the maximum lignin removal was approximately 90% [6]. Nevertheless, treatment with light alone (even when an excess is used) has been ineffective, commonly slow, energy-intensive, and may be prohibitively expensive. Furthermore it also seemed to be strongly substrate-specific [7]. However research should be continued in this subject since UV irradiation has had nonetheless noticeable effects on lignin removal and degradation, furthermore sunlight, which provides energy for most living

processes, and thus biomass build-up, is the main source of inexpensive renewable energy at our disposal. Hence it is a desirable alternative in deconstructing lignocellulosic materials. Solar radiation mainly includes infrared (37.8%), visible (55.4%), and ultraviolet (6.8%). Ultraviolet radiation (UVR) is invisible sun energy in the wavelength range from 100 to 400 nanometers (nm), which is divided into UVA (320-400nm), UVB (280-320nm) of which only 5% reaches the planet's surface and UVC (100-280nm) that never reaches the earth. UVB is the fraction of sunlight with the right wave length to affect the cell-wall lignocellulosic complex. An energy balance of sunlight on a sunny day, determines that exposed materials would receive on average $1.5 - 3.0 \text{ W/m}^2$ of UVB light. A value of 2.5 W/m^2 of UVB irradiance near the equator under clear, sunny skies is reported [8].

Another natural important source for the biomass is water. Fundamental properties to cellulosic fibers is due to water. Drying of fibers can results in irreversible collapse and capillary shrinking, while on the other hand in the swelling with water and polar solvents that area and the crystallinity of cellulose is increased [9]. There are different states of water in cell wall matrix. Below the fiber saturation point (25-30% moisture), water at cellulose microfibrils level is named primary bound water [10], and the sorbed water located in porous structure is commonly classified as secondary bound water.

One also encounters the classification freezing and non-freezing water for the secondary and primary bound water, respectively [11]. Above the fiber saturation point, water fills the cell lumens (bulk water) until full saturation in the area of 60–70% moisture content [12]. Also, bulk water has a depressed freezing point and it is free water confined within pores and/or interacting with fibril surfaces. So cavitations, repeated freezing and defreezing, and heating at low temperatures of secondary bound water and bulk water could improve cell disruption and lysing [13]. Moreover, *L. rotundiflorus*, which is used as biomass for this study, is an legume herbaceous plant that grows in wild form in México, and as some lupines, it would be feasible establish industrial crops as has already occurs in some other regions (e. g. Australia, Iceland, Poland), for alternative industrial use of this plants to obtain several products such as alkaloids, proteins, lignin and carbohydrates for energy.

Thus the goal of this research was to evaluate the effect of the progressive application of artificial and natural UV light, combined with freezing and defreezing, heat and soda, on ground *L. rotundiflorus*, and then to analyze the sugar yields after enzymatic hydrolysis.

2. Experimental/materials and methods

2.1 Material

L. rotundiflorus was collected at 2320 meters above sea level in Atemajac de Brizuela, at 105 Km SW of Guadalajara, Mexico. The collected plant (stems, branches and roots, but not foliage

who was discarded due to low carbohydrate content), were air-dried and grounded by using mill (Willey), into particles of 0.25 mm, for the following experiments. Before to the experimental phase, a classical chemical analysis, Holocellulose [14], Lignin (Tappi T 264) and Extractives (Tappi T 222) was performed over the grinded raw material [15].

2.2 Pretreatment

Experimental sequence to determine the contribution of individual variables in the photolytic pretreatment, including Light UV at 304 nm (L_{304}), Soda (S), Pre-freezing (F1) and Post-freezing (F2) was implemented in additive form (Table 7). The time of light treatment and the load of sodium hydroxide were applied in a deliberately high form to maximize the effect the generation of delignification oxidizing species (free radicals) by the interaction of light and soda, and to enhance the significance of the light effect on the alkaline solution too. Experiments were done at a concentration of substrate of 1% (w/v). Samples of *L. rotundiflorus* were UV irradiated by using a Rayonet Photochemical Reactor (Southern New England Ultraviolet Co., Branford, CT) fitted with 16 UV lamps emitting a band spectrum centered at 304 nm. Covered 5 Lt flask placed in the center of photochemical reactor with mechanical stirring for 30 h was used for the reaction reaching 45 °C due to heat generated by the lamps. The light intensity of the Rayonet reactor was $1.04 \times 10^{-3} \text{ W.cm}^{-2}$ (21 Watts, 10.01 W/m^2). Sodium hydroxide (S) was added to the suspension for 15% (w/w) respect to the

substrate which gave a pH of approximately 11-12. Ground samples were hydrated for 24 h and frozen by 15 h at -4 °C at start (F1) and at the end (F2) of pretreatments. Also, the slurries were boiled (B) for 1 h. Similarly, a water suspension of the material was placed under the sun for 90 hours of effective sunlight, and was subsequently hydrolyzed and compared with the sample irradiated with UV light lamps. Yield and insoluble lignin of pretreated solids were evaluated, and then enzymatic hydrolyzed, whereas soda residual and pH were evaluated in the liquid fraction. It is known that Rayonet reactor provide a simulation for UV fraction sunlight (Muhammet et. al, 2008). Intensity of UV light frequency from Rayonet source at 304 nm is 3 times the intensity of UVB sunlight. Is why that applying the treatment time proportional to the intensity of each source (sunlight or lamps), its might expect similar effect on substrates since both energy sources. So the effect on biomass of sunlight it would be feasible to replicate in the laboratory with less time, under controlled conditions

2.3 Enzymatic hydrolysis.

Hydrolysis was performed in stoppered 100 ml flasks in a water bath at 50°C and 140 rpm for 48 h. Wet pretreated samples equivalent to 1 g of dry matter was placed in 50 ml of citric acid/sodium citrate buffer at pH 4.8 (2%, w/V) containing 100 µg/mL tetracycline hydrochloride and 100 µg/mL cloramfenicol (antibiotics used to avoid microbial contamination). Among the hydrolyzed

samples was included filter wathman paper no. 1 (cellulose pure) to measure the efficiency of the enzyme blend. A commercial cellulose mixture, Cellulase from *Trichoderma reesei* (celluclast 1.5L, sigma Co., St. Louis, MO, 65 FPU/mL), supplemented with cellobiase from *Aspergillus niger* (novozym 188, sigma, 250β-glucosidase IU/g), was used in the experiments. Xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* (sigma, β-xylanase IU/mg) was added to cellulose and cellobiase to hydrolyze the pentose fraction. Enzymatic hydrolysis was performed at cellulase activities of 18 FPU/g of dry matter (dm) supplemented with cellobiase (30 IU/g dm), and 2.5% (w/w) of xylanase. Thus in each flask 1.0 g dm pretreated material, 0.27 mL (0.33 g) celluclast, 0.05 g novozym 188, and 0.025 g of xylanase, in addition to the buffer and antibiotics described previously were added, under the specified conditions. Samples were withdrawn at 0, 6, 12, 24, 48 h, chilled on ice, filtered and the supernatant analyzed for fermentable sugar analysis by the dinitrosalicylic acid (DNS) method. Saccharification, which represent hydrolysis efficiency (whole fermentable sugars), was calculated using eq 1.

$$\text{Saccharification} = \frac{[\text{Reducing sugars}](V)(d)100}{m(1.1)}, \%$$

Where [Reducingsugars] is the concentration after enzymatic hydrolysis is the volume of the hydrolyzate (mL), d is dilution rate of hydrolyzate during DNS method analysis, m is the weight of dry initial biomass, 1.1 is the ratio mass

glucose/mass anhydroglucose (180/162), and % represent the sugar yield expressed in grams per 100 g of raw material. Similarly, a factor of 132/150 was applied due to the mass change in the hydrolysis of xylans to xylose.

2.4 Analytical methods

Klason lignin contents in raw material and pretreated material was made using standard tappi methods (Tappi T-222). Sodium Hydroxide consumption was evaluated by titrating a sample of the initial and residual liquid from pretreatment with hydrochloric acid solution standardized. The cellulase activity was measured with the Filter Paper Unit method (FPU) according to International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) procedure [16]. One unit (FPU) of enzyme activity is defined as the amount of enzyme which

released exactly 2 mg of glucose, while International Unit (IU) of enzyme activity is defined as $1 \mu\text{Mol min}^{-1}$ of substrate converted (reducing sugars as glucose) [16]. The estimation of total reducing sugar in the enzymatic hydrolysate of biomass was done by DNS method [17], using UV spectroscopy (unicam 550). It was used a calibration curve of multiple levels of glucose (0.2-2.0 g / ml, $R^2 = 0.997$)

3. Results and discussion

The two main components of the cell wall of *L. rotundiflorus* was 62.6% Holocellulose, 15.8% Lignin (22.4% without extractives) and 22.6% extractives.

3.1 Pretreatment

The six pretreatments (arrangements) in the Rayonet photoreactor and their response variables are presented in table 7.

Table 7

Pretreatments applied to *L. rotundiflorus* grounded in Rayonet reactor and their principals response variables.

Exp. number	Treatment	pHi	pHf	Consumed Soda, (%)	Yield (%)	Residual lignin (Units)
1	L ₃₀₄	6.8	7.3	---	76.3	20.2
2	S	13.3	11.7	0.0	65.5	20.2
3	L ₃₀₄ -S	12.7	10.9	0.0	67.0	19.4
4	F1-L ₃₀₄ -S	12.7	10.8	0.0	64.5	19.5
5	F1-L ₃₀₄ -S-B	12.9	10.8	0.0	64.7	19.1
6	F1-L ₃₀₄ -S-B-F2	12.6	11.4	5.0	63.6	20.1

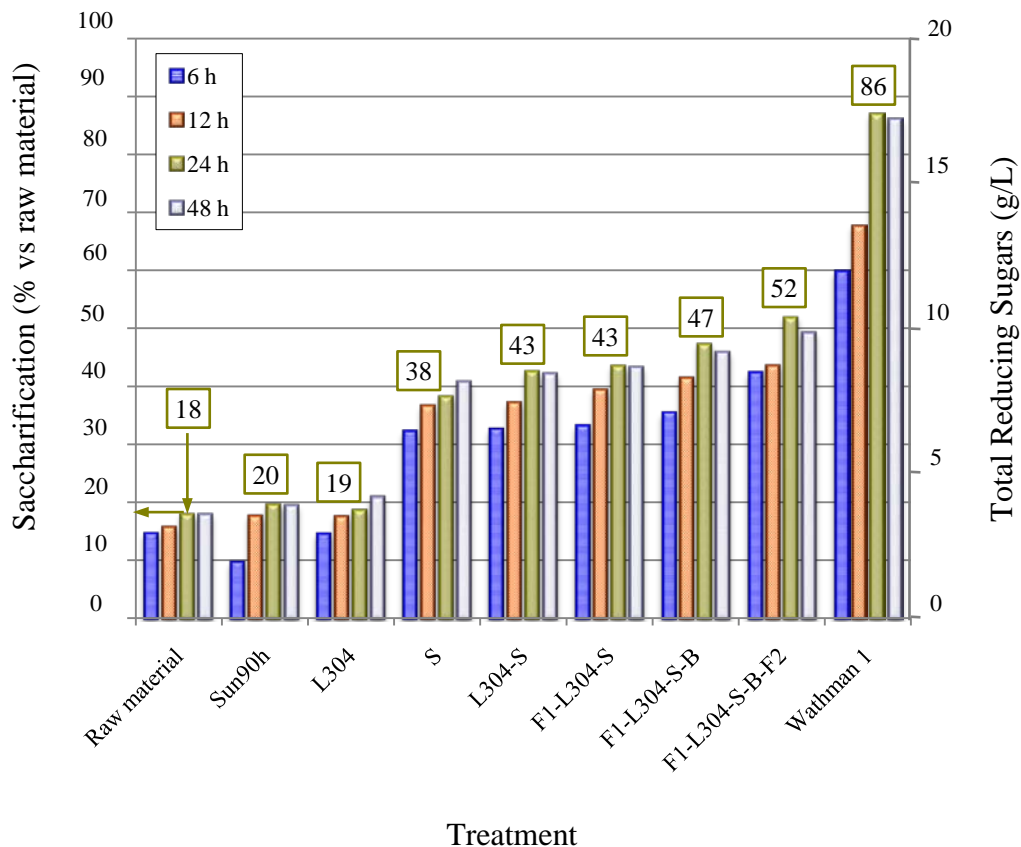
L304 = Light, 304 nm; S= Soda; L₃₀₄-S = Light-Soda; F1-L₃₀₄-S = Frozen-Light-Soda; F1-L₃₀₄-S-B=Frozen-Light-Soda-Boiling; F1-L₃₀₄-S-B-F2= Frozen-Light-Soda-Boiling-Frozen. Consistency:1%; Treatment Time: 30 h; Soda Charge: 15%, Frozen Time: 15 h;Boiling Time: 1 h

The pH of the slurries from pretreatment was around 7-12. The pulp slurry reached a state temperature of 45 °C for the intensity of light. The main effect of sodium hydroxide at low temperature and ambient pressure on lignocellulosic biomass was swelling, but the combination of light and soda, caused both, swelling and minor delignification in about one unit of Klason lignin, in some cases, or not delignification was detected in other ones. The yield after pretreatment step was expressed as a percent of the original dry weigh. Material loss was due to removal of extractives remove during pretreatment, fines loss, and

delignification in some cases, with average of 65.0 % for pretreatment in alkali, and 76.3% in pretreatment without alkali.

3.2 enzymatic hydrolysis

Fig. 28 shows the effect of the six pretreatments over digestibility (Saccharification). Raw material (treated under the same conditions of temperature, time and agitation or reference), Sun 90h (sample treated with sunlight for 90 h and 1% of consistency), and whatman 1 (cellulose pure), are also included as reference samples in this graphic.



L₃₀₄ = Light at 304 nm; S= Soda; L₃₀₄-S = Light-Soda; F1-L₃₀₄-S = Frozen-Light-Soda; F1-L₃₀₄-S-B=Frozen-Light-Soda-Boiling; F1-L₃₀₄-S-B-F2= Frozen-Light-Soda-Boiling-Frozen

Fig. 28. Effect of photolysis pretreatment on sugar concentrations present in the hydrolysate at different times of hydrolysis. Bars height represents the efficiency of the digestibility. Hydrolysates sugar concentration is read on the right axis, while saccharification is read on the left axis.

The digestibility response of the substrate depended of the photochemical variables. Amount of hydrolyzed material showed a direct dependence of variables and hydrolysis time. The hydrolysis was stabilized at 24 h and no greater gain was observed to 48 h. Reference (Raw material, fig. 1) had 18% respect to the original raw material in saccharification, whereas Light alone (L_{304}) caused a similar effect. Alkali dosage (S) was the most important factor on yield of reducing sugars, therefore it was the most important factor in pretreatment efficiency, here was a 20% gain by comparing saccharification soda pretreatment respect to the reference sample (S versus raw material) at 24 h of hydrolysis. But this high load of alkali (15%) at low temperature (45 °C) did not delignify (table 7), but it could disrupt the cell wall by dissolving hemicelluloses, swelling and decrease the crystallinity of cellulose [18], as well as disruption of the intermolecular bonding between xylan and other biomass components, such as lignin or other hemicellulosic components (decrease in the presence of ester linkages), resulting in increased porosity of the biomass, thereby increasing the internal surface of the lignocellulosic matrix. These effects led to an increase in enzymatic degradability, as the lignocellulosic matrix was more accessible for enzymes. Compared to the previous effect, UV light in alkali medium (L_{304} -S in the figure) caused an additional 5% of saccharification due at the created free radicals. The next variable added, Freezing in first time (F1 on the sequence F1- L_{304} -S), not caused additional saccharification gain, but in contrary, boiling combined with the other factors (B

on the sequence F1- L_{304} -S-B) resulted in gaining of 4%, and Freezing applied at the end (F2 on sequence F1- L_{304} -S-B-F2) caused an gain of 5% one regard previous treatment. Freezing could disrupt the cell wall by mechanical break by to increased cell's water volume effect of water absorption in the lumen (secondary water and lumen water or bulk water) due to frozen, and increasing the porosity of the amorphous region of cellulose, which increases water access to cellulose microfibrils of the crystalline structure of the cellulose, but the effect of freezing when it is applied in last part of treatment could be bigger due to the disruption of the cell wall by the variables effect previously applied. Boiling heat provided calorific energy and catalyzed the effect of swelling of the cell wall caused by soda [9]. Light UV alone had no significant effect but combined with the others factors a synergistic effect was achieved causing 52% (od raw material) in saccharification at 24 h of hydrolysis (83% hydrolysis of the original sugars content in raw material) when all variables were applied. The hydrolysis of paper filter (whatman 1) as cellulosic substrate, was for verify the effectiveness of enzymes because cellobiose significantly inhibit the effect of endoglucanases, cellobiohydrolases and β -glucosidase [19], and the increased of sugar concentrations caused performance enzymatic hydrolysis inhibition too [20]. In this case the effectiveness of the enzymatic complex was of 86%, therefore improving the combination of enzymes could be achieved most monosaccharide released by the pretreatment. Finally saccharification effect (reducing sugars) was measured from

two sources: Rayonet photoreactor (UV Light at 304 nm, 21 watts and 10.04 W/m²) and from sun in the environment (Irradiance 1.5 – 3.0 w/m² of UVB light at 280-320 nm). The effect of pretreatment with sunlight was similar to that obtained in the photochemical reactor. Even though into sunlight the UV portion of the spectral power distribution was quite low compared to the total energy in the spectral power distribution, virtually all visible and UV wavelengths of light are capable of initiating photochemical changes [21]. However although UV portion (295-400 nm) of sunlight have power (73 - 97 kcal/mole), for break the bonds of some carbon-oxygen moieties found in lignin (e.g. bond dissociation energy C–O is 89 Kcal/mol which is obtained with a wavelength of 321 nm) through the generation of free radicals by the absorption of photons, and middle lamella degradation [22], have not enough power for break the most of bonds in lignin. So that the UV light of this two sources (sunlight and Rayonet photoreactor) had not enough energy for significantly alter the cell wall or delignify the lignocellulosic materials for increased the hydrolysis rate significantly when acting alone, needed the participation of other contributing factors, as studied here. In addition, since the NaOH solution can be reused in this process, its economy and environmental impact may not be so critical [23].

4. Conclusions

The use of natural resources essential to life on earth, as sunlight and water to deconstruct the cell wall could be the most logical form and that common sense suggested. Water plays an important role in the fibers since it is the means of transport of enzymes into the system crystal fibers, but also to hydrate and keep lignocellulosic materials in this state prior to enzymatic hydrolysis, and can be utilized to alter the barrier inaccessible to the polysaccharides by freezing and defreezing of the water inside the fiber which would pave the way of enzymes toward cellulose. Also the sun, energy source that makes possible the life on earth providing energy radiation, should be used for this aim, since the fraction containing UV it would be feasible to be exploited for alter the cell wall of lignocelluloses in synergistically with other vectors used for the same purpose, without any cost. The use of soda or lime (which could to be recycling) at high concentrations, low temperature (45 °C) and adequate residence time, are cheap methods, which together with the grinding, moisturizing, not drying and freezing in jointly would let the saccharification of plant materials. Further research is needed through the use of modern technology to capture, store and convert sunlight to apply in the treatment of lignocellulosics to obtain bioenergy.

References

- [1] D. Fengel, G. Wegener, Walter de Gruyter, New York, 1984.
- [2] Stocker, *Angew M., Chem., Int. Ed.*, 47 (2008) 2–14.
- [3] C.I.Ishizawa, M.F.Davis, D.F.Schell and D.K.Johnson, *J. Agric. Food. Chem.*, 55 (2007) 2575-2581.
- [4] S. Mamar, A. Hadjadj, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 35 (1990) 451-455
- [5] E.Portjanskaja, S. Preis, *International journal of photoenergy*. ID 76730, doi:10.1155/2007/76730, (2007)
- [6] K.O. Hwang, L.A. Lucia, *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 168 (2004) 205-209.
- [7] Y.Zheng, Z. Pan, R. Zhang, *Int J Agric & Biol Eng.*, 2:3 (2009) 51-68.
- [8] J. Ball, *Bulletin of the Chicago Herpetological Society*, 30:4 (1995) 69-71.
- [9] U. Muhammet, M. Kahveci, T. Atilla, Y. Yusuf, *Macromol. Rapid Commun*, 29 (2008) 202–206.
- [10] J.F. Matthews, C.E. Skopec, P.E. Mason, P. Zuccato, R.W. Torget, J. Sugiyama, M.E. Himmel, J.W. Brady, *Carbohydr Res*, 341 (2006) 138–152.
- [11] I.D. Hartley, F.A. Kamke, H. Peemoeller, *Wood sci Technol* 26 (1992) 83–99.
- [12] C. Felby, L.G.Thygesen, J.B. Kristensen, H. Jorgensen, T. Elder, *Cellulose*, 15 (2008) 703-710.
- [13] M. Dohanyos, J. Zabranska, P. Jenicek. *Water Sci. Technol.*, 36 (1997) 333-340.
- [14] L.E. Wise, M. Murphy, A. D'Adieco, *Paper Trade J.*, 122:2 (1946) 35.
- [15] Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) (2000). TAPPI Standards, Atlanta, Georgia, GA.
- [16] T.K. Ghose, *Pure Appl Chem*, 59 (1987) 257-268.
- [17] G.L. Miller, *Anal. Chem*, 31 (1959) 426-428.
- [18] B. Xiao, X.F. Sun and R.C. Sun, *Polym Eng Sci* 74 (2001) 307-319.
- [19] R.M.F. Bezerra, A.A. Dias, *Appl Biochem Biotechnol*, 126 (2005) 49-59.
- [20] D.B. Hodge, M.N. Karim, D.J. Schell, J.D. McMillan, *Bioresour Technol*, 99 (2008) 8940-8948.
- [21] USDA Forest Service Forest Products Laboratory, (2000), Madison, Wisconsin, www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf2003/fpl03a.pdf
- [22] S. Williams, *Handbook of wood chemistry and wood composites*, ed Roger M. Rowell, Taylor & Francis (2005).
- [23] K. Mirahmad, M. M. Kabir, A. Jeihanipour, K. Karimi, M. J. Taherzadeh, *bioresources* 5:2 (2010) 928-938.



Pretreatment of *Lupinus rotundiflorus* biomass using a peracids mixture and Keggin salt to improve enzymatic digestion

J. Jesús Vargas Radillo^{a*}, Mario A. Ruiz-López^b, Ramón Rodríguez Macías^b, Lucía Barrientos Ramírez^a, Eduardo Salcedo Pérez^a, Fernando A. López-Dellamary Toral^a, Ricardo Manríquez González^a.

^a Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, Km 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México, código postal 45220

^b Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Km 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México, código postal 45220

ARTICLE INFO

Article history:

Received XXX 2012

Received in revised form XXXX 2012

Accepted XXXX 2012

Available online XXXX 2012

Keywords:

Peracids

Polyoxometalates

Fermentable sugars

Lignocellulosic

Pretreatments

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is an abundant source of fermentable monosaccharides which access is possible by altering the rigid cell wall through pretreatment and enzymatic digestion. *Lupinus rotundiflorus* was pretreated with a peracid mix composed of permonosulfuric and peracetic acid, using polioxometalato (Pom) α -K₅ [AlSiW₁₁O₄₀] as catalyst, using a 2⁴ experimental factorial design to evaluate its impact over the effectiveness of enzymatic hydrolysis, being 92% hydrolysis of the initial content of carbohydrates the best result. Catalyst Pom's activity in strongly acid media was not positive over the percentage of fermentable sugars, delignification and protection of carbohydrates degradation.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved

1. Introduction

The lignocellulosic (LC) biomass represents the largest renewable reservoir of potentially fermentable carbohydrates on earth. The barrier to the production and recovery of valuable materials (sugars among others) from lignocellulosic, is the structure of lignocelluloses which has evolved to resist degradation due to cross linking between the polysaccharides and the lignin via ester and ether linkages (Xiao et al., 2007).

The main goal of any pretreatment is to alter structural and compositional impediments to hydrolysis and subsequent degradation processes in order to enhance digestibility, improve the rate of enzyme hydrolysis and increase yields of intended products (Mosier et al., 2005; Hendriks and Zeeman, 2009). Dilute-acid hydrolysis is probably the most commonly applied method among the chemical pretreatment (Taherzadeh and Karimi, 2008). Finding the optimal conditions of temperature, reagent load and time is important to reduce the formation of inhibitory products that will reduce the efficiency of the fermentation step (Lloyd and Wyman, 2005). So, pretreatment temperatures of 160–220 °C and short reactor residence times for short up to a few minutes

*Corresponding author at : Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, Km 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México, código postal 45220
E-mail addresses: jvargasr@dmcp.cucei.udg.mx

(e.g. 5 min), result in both higher soluble xylose recovery yields Hemicelluloses→xylose (75-95% yield) and enzymatic cellulose digestibility since is increased cellulose digestibility of pretreated residues (Cellulose→glucan→glucose) (Chen et al., 2007). One of the major drawback of acid pretreatments is the formation of inhibitors such as carboxylic acids, furans and phenolic compounds (Larsson et al. 1999) and the relatively low sugar yields, with high temperature and/or high pressure (Eggeman and Elander, 2005). So, development of a lignocellulose pretreatment featuring modest reaction conditions and high yield is desired. To this end a lot of acids have been tested, how TFA, HNO₃, H₃PO₄, CH₃COOH, etc.) (Marzioletti et al. 2008). For this purpose, peracids are an attractive option. Peracids or PAA (peracetic, pernitric, performic, permonosulfuric) contains a perhydroxyl group (-OOH) in place of hydroxyl group of its parent acid. This compounds, which are generated by mixing acids and hydrogen peroxide, act as a strong oxidizing agent as both, selective delignifying and bleaching agents even under mild conditions (Springer, 1990). Peroxyacid solution (Pxa) is a mixture of Permonosulfuric acid (H₂SO₅, Caro's acid or Px) and Peracetic acid (CH₃COOOH, or Pa). The behavior is strongly dependent on reaction conditions. So, a rise on peracid concentration of promotes an increase in delignification, but also a decrease in the selectivity. Also, peracids are broke down under alkaline pH, whereas at acidic pH are stable (Allison and McGrouther, 1995). However high temperatures and strongly acid conditions (e.g. pH <1) promote greater decomposition of the hydrogen peroxide into hydroxyl radicals, and lead to poor selectivity, and decomposition of permonosulfuric in sulfate radical anion, SO⁴⁻, main species responsible for the degradation of cellulose (Thompson, 1981). High reaction times

generally results in a greater delignification and further degradation of carbohydrates (Brasileiro, 2001). Due to this low selectivity in acid medium, was included a catalyst that would allow the action of peracids preferentially on lignin. Had been tested a lot of delignified agents, among them Polyoxometales, POMs or heteropolyanions (HPA-n), which are polymeric inorganic structures with high ionic weight of 1000-10000 (Pope, 1983), are stable in acidic media, have very high water soluble, are thermal stability in the solid state, and have powerful oxidizing properties (Weinstock et al., 1997). The first characterized and the best known of these is the Keggin heteropolyanion (Keggin, 1933), like structures as tungstosilicic anion [SiW₁₂O₄₀]⁴⁻. Substitution of metal ions from the Keggin structure by transition metals, e.g., V⁵⁺, Co²⁺, Zn²⁺, W⁶⁺, No⁵⁺, Ta⁵⁺, etc. (Pope, 1983), make them more active for delignification. So, in vanadotungstosilicic anion, [SiVW₁₁O₄₀]⁴⁻, vanadium is incorporated into Keggin structure. Oxidative delignification with polyoxometalates has been made based on the anaerobic process in which are used as oxidative delignification agents at high load, and a second based on an aerobic process in which polyoxometalates are used as catalysts at little load (Bujanovic, 2010).

Our goal is to test an dilute acid pretreatment process, using Peroxyacids mix solution as oxidant and monosubstituted Keggin-type POM salt α -pentapotassium vanadoundecatungstosilicate, α -K₅[SiVW₁₁O₄₀] or POM blues as catalyst, with lower temperature and reagents loading that dilute sulfuric acid pretreatment, in order to disturb lignocellulosic cell wall through traditional removal of hemicelluloses in acidic media, but also by delignification through to generation of free radical and lignin oxidants from peracids, in order for increasing the rate of enzymatic saccharification cellulose and hemicellulose into fermentable sugars of *Lupinus rotundiflorus*.

2. Methods

2.1 Biomass

Lupine (*L. rotundiflorus*) was collected in November of 2008 in Atemaj de Brizuela (Jalisco, Mexico). The raw material was dried on the environment. Stem, branches and root, which are the fractions with the major content of cellulose were ground in AEG laboratory cutting mill, equipped with a sieve with an equivalent pore size of 0.5 mm. After that the milled material was classified by the retention in different mesh. Fine particles were obtained with $\emptyset \leq 0,25 \text{ mm}$, and was then stored in sealed plastic bags at $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ by pretreatments and enzymatic digestion. The content of holocellulose, lignin and extractives was determined according to Tappi methods (Tappi 2002).

2.2 Preparation of mixed peracids (Pxa) and POM

Pxa was prepared by adding from dropping funnel 82.4 mL (1.5 mole) of sulfuric acid ($\delta = 1.84 \text{ g/mL}$, 98 wt %) over 68.02 mL (1 mole) of hydrogen peroxide (50%) during 45 minutes, in ice bath. After that, add at once 257.2 mL (1 mole) glacial acetic acid ($\delta = 1.049 \text{ g/mL}$) and left to react one hour. Also, the addition of one mole of acetic acid to the Caro's acid mixture increased the conversion of peroxide to peracids to a 94% level (Geng et al., 1993). At the end, a sample of the mixture was removed to determine its residual hydrogen peroxide and its active oxygen (AO) content as peracid (H_2SO_5 and CH_3COOOH). The analysis of peracid solution was done based upon the use of standard ceric sulfate, at first analyzing the sample for hydrogen peroxide by titration with

ceric sulfate 0.1 M. Potassium iodide was then added to the titrated sample and the active oxygen content of the sample was measured by titrating the iodine releases (the potassium iodide reacts with peroxyacids to liberate iodine) with sodium thiosulfate 0.1N (Greenspan and MacKellar, 1948). The Pxa used in this study had 5.6 % (w/w) of AO (0.728 mole) for 73% conversion peroxide to peracids:

$$\text{conversion} = (\text{mole AO} / \text{initial mole H}_2\text{O}_2) \times 100, \%$$

The Polyoxometalate $\alpha\text{-K}_5[\text{SiVW}_{11}\text{O}_{40}]$ salt used in experiments was prepared according to literature procedure (Domaille, 1984), from commercial sigma-aldrich dodecatungstosilic acid ($\text{H}_4\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}$) and vanadyl sulfate (VOSO_4). In reduced form, this POM absorbs strongly visible light and forms a dark purple solution when is dissolved in water.

2.3 Pretreatment

The main factors of experimental procedure were adjust to the 2^4 factorial design (Table 8). The peracids, POM or peracids/POM mixture was added to 10 g of the milled material at solid concentration of 10% (w/w), and then pretreated in a stainless steel digester in silicon oil bath. After pretreatments slurries were filtrated. Solid residues were washed by water applying vacuum and then enzymatic hydrolyzed, while the filtrate was measured in volume and pH, to then be neutralized with citric acid and sodium citrate. Total reducing sugar (monosaccharide) concentration of the filtrate and enzymatically hydrolyzed biomass were analyzed by spectrophotometer (Unicam 550) using the dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1959).

2.4 Enzymatic hydrolysis

The residue biomass after pretreatments were hydrolyzed by a synergetic mix of commercial (sigma-aldrich) cellulases from *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5L, sigma Co., St. Louis, MO, 65 FPU/mL), cellobiase from *Aspergillus niger* (novozym 188, Sigma, 250 β -glucosidase IU/g) and xylanase (β -xylanase) from *Trichoderma longibrachiatum*, at a solid loading of 2% and 50 °C for 48 h in a water bath shaker. The enzyme loadings were cellulases 18 FPU/g dry biomass, β -glucosidase 30 IU/g dry biomass, and 2.5% (w/w) of xylanase. Sodium citrate/citric acid buffer was used in the mixture to maintain the pH at 4.8 and 100 μ g/mL tetracycline hydrochloride and 100 μ g/mL cloramfenicol was used to avoid microbial contamination. At the end of digestion samples were chilled on ice, filtered and the filtrate analyzed for DNS fermentable sugar analysis.

3. Results and discussion

The *L. rotundiflorus* chemical composition expressed as percent of dry material is 62.6% holocellulose, 15.8 lignin and 22.6% extractives. This information was used in the sugar yield calculation. On the other hand, fermentable sugars by pretreatment enzymatic hydrolysis and total yield is presented (Table 8). Highest fermentable sugars yields (treatments 4, 7 and 8) are obtained at 150 °C and 1.5% (w/w) Pxa expressed as AO, it being Experiment 7 that which presents higher yield of fermentable sugars (56.1% respect to od material). In this treatments are remarkable the value in “sugars pretreatment” relating to content of monosaccharide in the liquid fraction of pretreatment due to carbohydrates degradation.

Table 8
Experimental conditions of treatments (2⁴ factorial design), and fermentable sugars yield (w/w) od raw material.

Exp. No.	Peracids Pxa % AO	Polioxo-metalates mMol/L	Tem °C	Time min	pH _i	pH _f	Sugars pretreatment yield (%)	Sugars enzymatic hydrolysis (%)	Total sugars yield (%)
1	1.5	0	50	180	1.50	1.40	2.80	19.05	21.85
2	0	0	50	30	7.93	5.45	1.63	18.38	20.01
3	1.5	0	50	30	1.63	1.63	2.16	17.28	19.45
4	1.5	0	150	30	4.1	4.69	13.71	33.78	47.50
5	0	0	150	30	7.85	5.35	1.79	17.45	19.23
6	0.75	0.9	100	105	1.56	1.73	4.49	18.52	23.01
7	1.5	1.8	150	180	1.52	1.46	19.58	36.52	56.10
8	1.5	0	150	180	1.6	1.5	15.74	35.45	51.19
9	1.5	1.8	50	30	1.56	1.56	2.28	14.04	16.32
10	0	0	150	180	7.89	4.53	4.25	30.76	35.01
11	0	1.8	150	30	5.65	5.21	2.18	19.47	21.66
12	0	1.8	50	180	5.80	5.53	3.18	15.97	19.14
13	0.75	0.9	100	105	1.56	1.80	5.33	18.99	24.32
14	0	0	50	180	8.0	5.33	3.89	19.17	23.06
15	1.5	1.8	50	180	1.45	1.46	3.50	14.22	17.73
16	0	1.8	150	180	4.10	4.69	4.27	31.82	36.09
17	0	1.8	50	30	3.88	3.88	3.41	17.71	21.12
18	1.5	1.8	150	30	1.35	1.46	13.52	28.74	42.25

The effect of the factors over fermentable sugars is shown in figure 29. In part A, is plotted the response of saccharification respect to the charge of peracids at different experimental conditions, in which we see that the saccharification yield raise in direct proportion to the raising of peracids load. In part B we see the effect of Pom's. here not seen a definite trend, so on the one hand in similar

experimental conditions, there is a positive effect on sugars yield as in experiment 7 with 56.1% of yield and POM charge versus experiment 8 with 51.2% without POM, while on the other side, negative effect over yield is observed, so 19.4% without POM (E3) and 16.3% whit POM is obtained (E9). Finally, time and temperature cause direct effect over amount of fermentable sugars (C, D in Fig. 29).

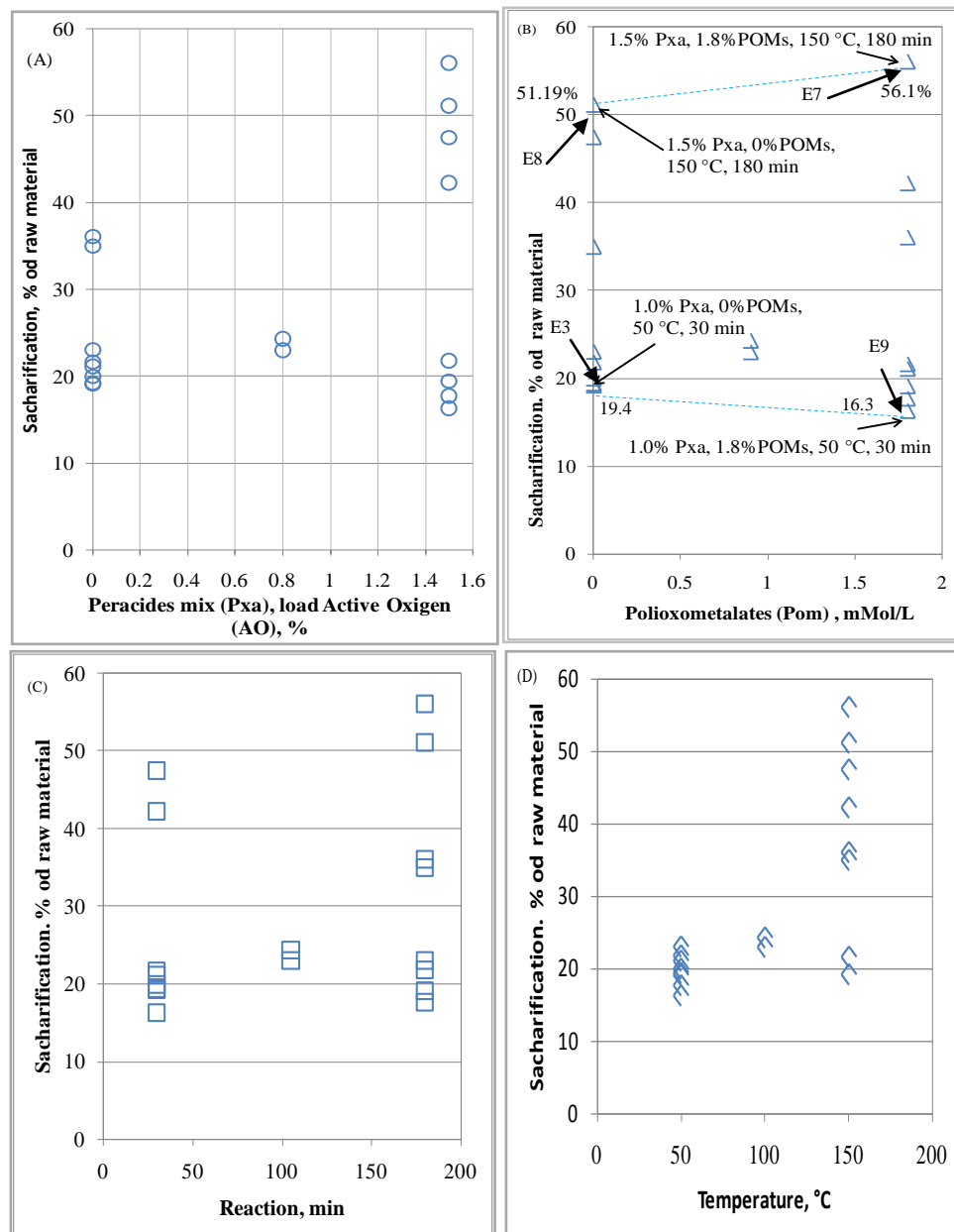


Fig. 29. Plot chart of saccharification versus peracids mix (Pxa), % AO; polioxometalates (Pom) load, mMol/L; time, min; temperature, °C

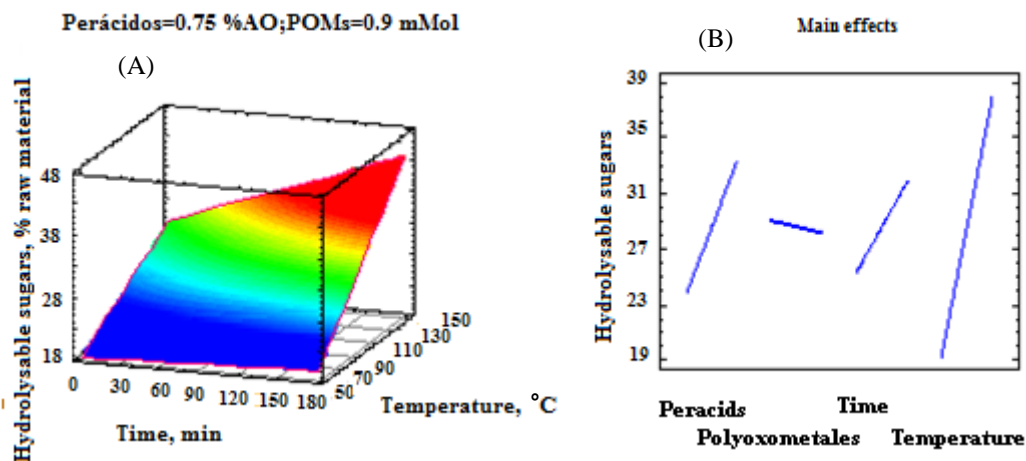


Fig. 30. (A) Response surface, (B) main effects of *L. rotundiflorus* digestion

Analysis of factor effects was performed using Stat graphics software. Results are shown in fig. 30 In part A is shown the combinant effect of time and temperature under mean conditions of Pxa and Pom's charge. We see that the bigger effect of temperature respect to time, and the increase of the combined effect of both factors with the temperature raising. In part B is shown the individual factors effect. Temperature ($P = 0.00$ of ANOVA analysis), peracids mix ($P = 0.0015$) and Time ($P = 0.011$) had the smallest value of P , and they was the most significant. Changing the value of this factors improving glucose yield after enzymatic hydrolysis. Instead polyoxometalate (Keggin salt) load did not affect glucose yield ($P = 0.67$). Based on these results was made a number of extra pre-treatment to the experimental design, to prove different conditions in temperature, Pxa Charge and time, but without the Keggin salt, which had no positive effect to increase the yield in sugar, getting in the best treatment 57.9% yield sugars, which means a yield of 92% of the initial content of carbohydrates in the raw material, using 0.5% of Pxa, temperature of 190 °C and time 20 minutes. Though theoretically the addition of Keggin salt (named HPA-n) to the peracid treatment serves as activator or catalyst to increase

the selectivity of mix peracids delignification probably due to generation of a potent oxidant *In situ* (Suchy and Argyropoulos, 2002) peracid-complexe, responsible for the peracids activation. However the system is sometimes inefficient, especially when POM is used in catalytic amounts (less than 2 mMol dm^{-3}), due to several potential causes. First, pH strongly acid ($\text{pH} < 2$), as was in a lot of our treatments, makes more likely the dissociation of HPA: $\text{HPA}_{-1} \rightarrow \text{VO}_2^+ + \text{HPA}_{-(N-1)}$, and although vanadil cation VO_2^+ is an oxidant agent (Evtuguin, 1998) at this pH leading to the oxidative degradation of polysaccharides. Also, this ions are not oxidized by O_2 , H_2O_2 (Kozhevnikov, 1998) or peracids, which means that they cannot be recycled (Bujanovic et al., 2010), so the POM concentration tends to decrease, which could be resolved in a less acidic media as HPA decomposition is slower, but unfortunately, pH increasing leads to negative charge in the fiber due to the lower ionic strength in suspension, called Donnan effect (Evtuguin and Pascoal, 1997), so that repulsion forces could occur with oxidizing complex as Pom's are anions that have a very high negative charge, leading to low level of delignification because oxidizing agent

need to get into contact with lignin molecules in the fiber wall for the oxidation reactions to take place (Ruuttunen and Vuorinen, 2004). In experiments of this study, with $\text{pH} < 2$ (table 8) could have occurred heteropolyanion dissociation plus the slower catalytic activity, while alone POM was applied, lesser acidic media, low ionic strength environment causes negative charge on the fiber and no interaction with the catalyst, so in both cases POM catalyst effect in pretreatment is ineffective. It is therefore advisable find the right conditions for optimal HPA-n dissociation, either by addition of polar organic solvent by arise pH, for example 40-50% ethanol into the system, which improves delignification selectivity due to the less HPA-n decomposition, or increasing the ionic strength of the solution by addition of KCl or the cationic polyelectrolyte Polybrene, that lead to high potassium concentrations (Bujanovic, 2010), would allow greater contact between the peracid-heteropolyanion and lignocellulosic.

References

- Allison, R.W., McGrouther, K.G., 1995. Improved Oxygen Delignification with Interstage Peroxymonosulfuric Acid Treatment. *TAPPI J.* 78(10), 134.
- Brasileiro L.B., Colodette J.L., Piló-Veloso D. 2001. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. *Quim. Nova* 24 (6), 819-829.
- Bujanovic, B., Ralph, S., Reiner, R., Hirth K., Atalla, R., 2010. Polyoxometalates in oxidative delignification of chemical pulps: Effect on lignin (Review). *Materials* 3, 1888-1903.
- Chen, Y., R.R. Sharma-Shivappa, 2007. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 142(3), 276-290.
- Domaille, P.J., 1984. 1 - and 2-Dimensional Tungsten-183 and Vanadium-51 NMR Characterization of Isopolymetalates and Heteropolymetalates. *JACS* 106, 7677-7687.
- Eckert, R.C. 1982. Delignification and Bleaching Process and Solution for Lignocellulosic Pulp with Peroxide in the Presence of Metal Additives. Canadian patent 1,129,161.1.
- Eggeman, T., Elander, R. T., 2005. Process and Economic Analysis of Pretreatment Technologies. *Bioresource Technology* 96(18), 2019-2025.
- Emmel, A., Mathias, A.L., Wypych, F., Ramos, L.P., 2003. Fractionation of Eucalyptus grandis chips by dilute acid-catalysed steam explosion. *Bioresource Technol.* 86, 105-115.
- Evtuguin, D.V., Pascoal N., C., 1997. New Polyoxometalate Promoted Method of Oxygen Delignification. *Holzforschung* 51(4), 338-342.
- Evtuguin, D.V., Pascoal N.C., de Jesus J.D., 1998. Bleaching of Kraft pulp by oxygen in the presence of polyoxometalates. *J. Pulp Paper Sci.* 24, 133-140.
- Geng, Z.P., Chang, H-M., Jameel, H., Evans B, Amini, B. and Webster, J.R., 1993. Mixed Peracids: Manufacture and Use as Non-Chlorine Delignification and Bleaching Agents, *Tappi Pulping Conference Proceedings*, 353-357.

4. Conclusions

The results presented in this work showed modest results for a biomimetic catalytic process where Pom's were used in conjunction with Pxa. In some pretreatments trials slight synergistic effect in the concomitant use of POM and peracids mix (Pxa) was seen. The emphasis should be finding a redox catalyst, more stable at slightly acidic pH resistant to dissociation, that selectively can oxidize phenolic lignin structures, and can rapidly deoxidized with O_2 or H_2O_2 . A multitude of Pom's has been tested during recent years as catalyzing agents but the inefficient reoxidation has frequently caused problems (Weinstock et al., 1997). So the fermentable sugars rate were low. It would be advantageous to carry out pretreatments at neutral or alkaline conditions, taking care to preserve the proper ionic environment for heteropolyacids intimately interact with the substrate, where most of the phenolic lignin residues are dissociated. Furthermore, at acidic conditions lignin is not too reactive.

- Keggin, 1933. Structure of the molecule of 12-phosphotungstic acid. *Nature* 131, 908–909.
- Kozhevnikov, I.V., 1998. Catalysis by heteropolyacids and multicomponent polyoxometalates in liquid-phase reactions. *Chem. Rev.* 98, 171-198.
- Larsson, S, Palmqvist, E, Hahn-Hägerdal, B, Tengborg, C, Stenberg, K, Zacchi, G, Nilvebrant, N-O, 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb Technol* 24,151–159.
- Marzalletti, T., Olarte, M. B. V., Sievers, C., 2008. Dilute acid hydrolysis of Loblolly pine, A comprehensive approach. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 47, 7131-7140.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31,426-428.
- Mosier, N. S., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. Ladisch, M.R., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.* 96, 673–686.
- Pope, M.T., *Heteropoly and Isopoly Oxometalates*, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K., 1983.
- Ruuttunen, K., Vuorinen, T., 2004. Donnan Effect and Distribution of the $[\text{SiV}^{\text{IV}}\text{W}_{11}\text{O}_{40}]^{6-}$ Anion in Pulp Suspension. *Journal of Pulp and Paper Science*, 30(1), 9-14.
- Springer, E.L., 1990. Delignification of Aspen Wood Using Hydrogen Peroxide and Peroxymonosulfate. *Tappi J.*, 73(1), 175-178.
- Suchy, M., Argyropoulos, 2001. Catalysis and activation of oxygen and peroxide delignification of chemical pulps: a review. *TAPPI JOURNAL* 1(2),1-18.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621-1651; DOI:10.3390/ijms9091621.
- Technical Association of the Pulp and Paper Industry, TAPPI, 2002. *TAPPI Standards*, Atlanta, Georgia, GA.
- Thompson, R.C., 1981. Reduction of peroxomonosulfate by oxovanadium (IV) in acidic solution. Role of the sulfate radical anion. *Inorg. Chem.*, 1981, 20 (11), pp 3745–3748.
- Weistock, I.A., Atalla, R.H., Reiner, R.S., Moen, M.A., Hammel, K.E., Houtman, C.J., Hill, C.L, Harrup, M.K. 1997. A new environmentally benign technology for transforming wood pulp into paper. *Engineering polyoxometalates as catalysts for multiple processes. J. Mol. Catal. A: Chem.* 116 (1-2), 59.
- Xiao C, Bolton R, Pan W.L., 2007. Lignin from rice straw Kraft pulping: Effects on soil aggregation and chemical properties. *Bioresour. Technol.* 98(7), 1482-1488. doi:10.1016/j.biortech.2005.11.014.

Conclusiones Generales

1. Es importante conocer, preservar y transformar la riqueza vegetal de nuestra zona geográfica. El estudio de los recursos vegetales de la región centro-occidente (Jalisco), presenta oportunidades diversas para su transformación y aprovechamiento, debido a la diversidad biológica encontrada en sus ecoregiones, sistemas montañosos, cuencas hidráulicas, contando con zonas protegidas, reservas y parques nacionales que se traduce en la gran diversidad en flora y fauna, con cerca de 5000 especies vegetales, de los cuales alrededor de 400 crecen exclusivamente en esta zona, que van desde pastos hasta leguminosas, con 12 especies de lupinos nativos.

2. Se debe fomentar y proponer alternativas de aprovechamiento integral de las plantas en general, y de los lupinos en particular, Diferentes especies de lupinos se desarrollan de forma silvestre exclusivamente en esta zona, bajo condiciones ambientales diversas. Los lupinos han sido objeto de estudio en muchas partes, cubriendo estas investigaciones diferentes aspectos tales como: alimentación, aprovechando el contenido proteico de sus semillas; uso de su follaje como forraje; caracterización y aplicación de los alcaloides de sus semillas. La biomasa residual, la cual contiene carbohidratos y lignina, no es aprovechada. Particularmente son atractivos las especies con mayor desarrollo en biomasa y facilidad de propagación, como es el caso de *L. rotundiflorus*, el cual se caracteriza por su gran follaje y sistema radicular, teniendo el mayor contenido de carbohidratos en su tallo, ramas y raíz, y por su facilidad de propagación (indehiscente) desarrollándose cerca de los sistemas montañosos, en los claros de los bosques y a los lados de los caminos.

3. El aislamiento y transformación de los lignocelulósicos, como los lupinos, puede cubrir la necesidad de combustibles y productos útiles diversos sin contaminar el medio ambiente. Los lignocelulósicos son más atractivos para su aprovechamiento que el almidón y la sacarosa, debido a su abundancia, a que no se destinan a la alimentación y a que muchos de estos recursos son deshechos, obteniendo en ambos casos combustibles y otro tipo de productos útiles, cuyo consumo no contamina el medio ambiente. Sin embargo, para hacer esta sacarificación competitiva es preciso encontrar un método óptimo.

4. No se ha encontrado un pretratamiento óptimo para la transformación enzimática de los carbohidratos lignocelulósicos. Aunque existe un amplio volumen de investigación al respecto, con pretratamientos relativamente exitosos con ácido sulfúrico diluido, explosión de

vapor y organosolv, entre otros, para la digestión enzimática y posterior transformación de los azúcares fermentables, estos procesos no compiten aún en rendimiento y economía con la fermentación del almidón y jugos azucarados, debido al alto consumo de energía, degradación de carbohidratos, o generación de inhibidores.

5. Se obtuvieron rendimientos aceptables de azúcares fermentables con los tratamientos utilizados en este proyecto. Se utilizaron tres procesos de sacarificación, en los cuales el rendimiento en azúcares fermentables fue satisfactorio desde 48 hasta 59% del contenido inicial de 62.6% en carbohidratos de *L. rotundiflorus*. Se cuantificó el efecto de la luz UV artificial y de la luz solar y se probaron métodos naturales como el congelamiento y descongelamiento de biomasa vegetal, así como sistemas químicos oxidantes de la lignina no reportados en la literatura. Aunque los rendimientos fueron aceptables, los factores no tradicionales propuestos no tuvieron un efecto significativo en la obtención de azúcares fermentables: En el pretratamiento con luz UV en medio alcalino para la acción enzimática, el efecto de la luz artificial y solar sobre la lignina fue muy inferior al compararlo con el del medio alcalino (método tradicional); En el pretratamiento con mezcla de perácidos y sal de Keggin, no se logró disminuir la temperatura y tiempo utilizados en el pretratamiento tradicional con ácido diluido, y la sal de Keggin no actuó como catalizador de la deslignificación.

6. La energía para liberar los carbohidratos y lignina de la pared celular de los vegetales puede ser de origen natural, como la luz solar. Los pretratamientos podrían ser eficientes y económicos si se aprovechan los medios que la naturaleza proporciona. Aunque este tipo de energía, la solar, la cual es el origen de la mayoría de los tipos de energía alterna, es gratuita y abundante, el reto es focalizarla sobre la lignina, lo que permitiría transformar y consumir los carbohidratos y lignina de forma sustentable y natural. Probar sensitizadores para orientar la luz sobre la lignina o copiar y adaptar los mecanismos enzimáticos naturales de deslignificación son algunas de las alternativas de los investigadores para la solución de esta problemática.

Apéndices

Apéndice I. Evaluación de Unidades de Papel Filtro (FPU).

Las diluciones de los estándares para la curva de calibración (Tabla 9) fueron hechas partir de una solución base de 2.0 mg de glucosa/mL en buffer de Citrato de sodio/ácido cítrico, pH 4.8.

Tabla 9. Estándares de glucosa a diferentes concentraciones.

Buffer de citrato/ácido cítrico (ml)	Volumen solución patrón (2 mg/ml)	Dilución (Vtotal /Vpatron)	Concentración (mg/0.5 mL)
4.5	0.5	1:10	0.2
4.5	1.0	1:5.5	0.4
2.8	1.2	1:3.3	0.6
2.4	1.6	1:2.5	0.8
2.0	2.0	1:2	1.0
1.6	2.4	1:1.7	1.2
1.2	2.8	1:1.4	1.4
0.0	5.0	1:1	2.0

Con las concentraciones (mg/0.5 mL) y las absorbancias de cada una de ellas se construye la curva estándar (Fig. 31).

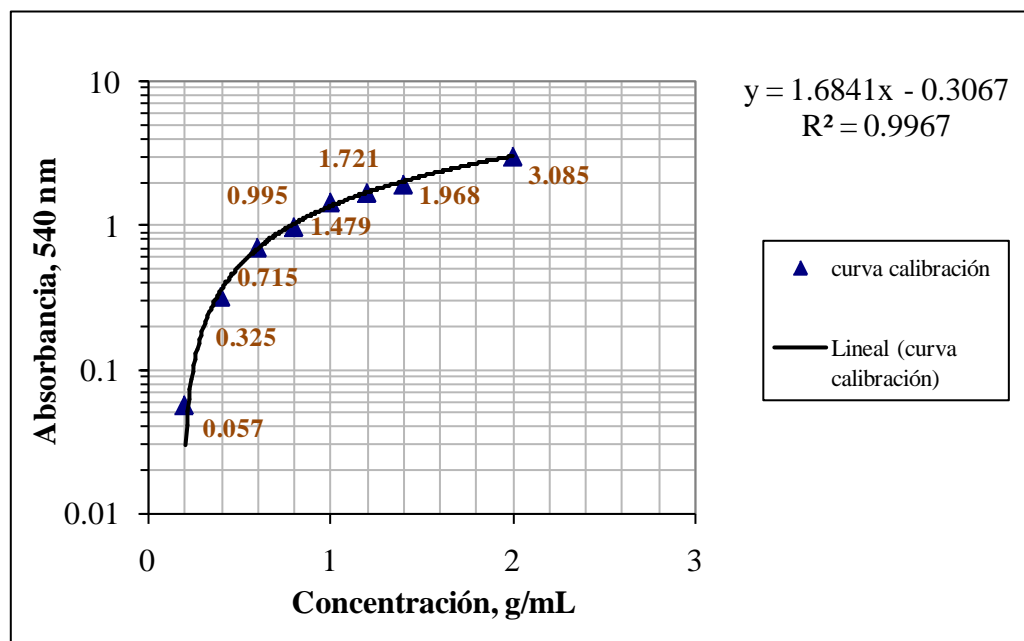


Fig. 31. Curva de calibración para azúcares reductores.

Por medio de la cual se determinó la concentración de las muestras de enzima a diferentes concentraciones, Tabla 10.

Tabla 10. Concentración de glucosa (como azúcares reductores) de las enzimas diluidas, necesarias en la prueba de evaluación de las unidades de papel filtro (FPU) de la celulasa comercial celluclast.

Dilución	A ₅₄₀ nm	Glucosa (ml/0.5 mL)
1:100	1,467	2,48
1:200	1,657	2,83
1:300	1,031	1,67

Con los datos de la tabla 10, Se encontró la concentración de enzima que produjeron exactamente 2.0 mg de glucosa, a través del gráfico construido (Fig. 32).

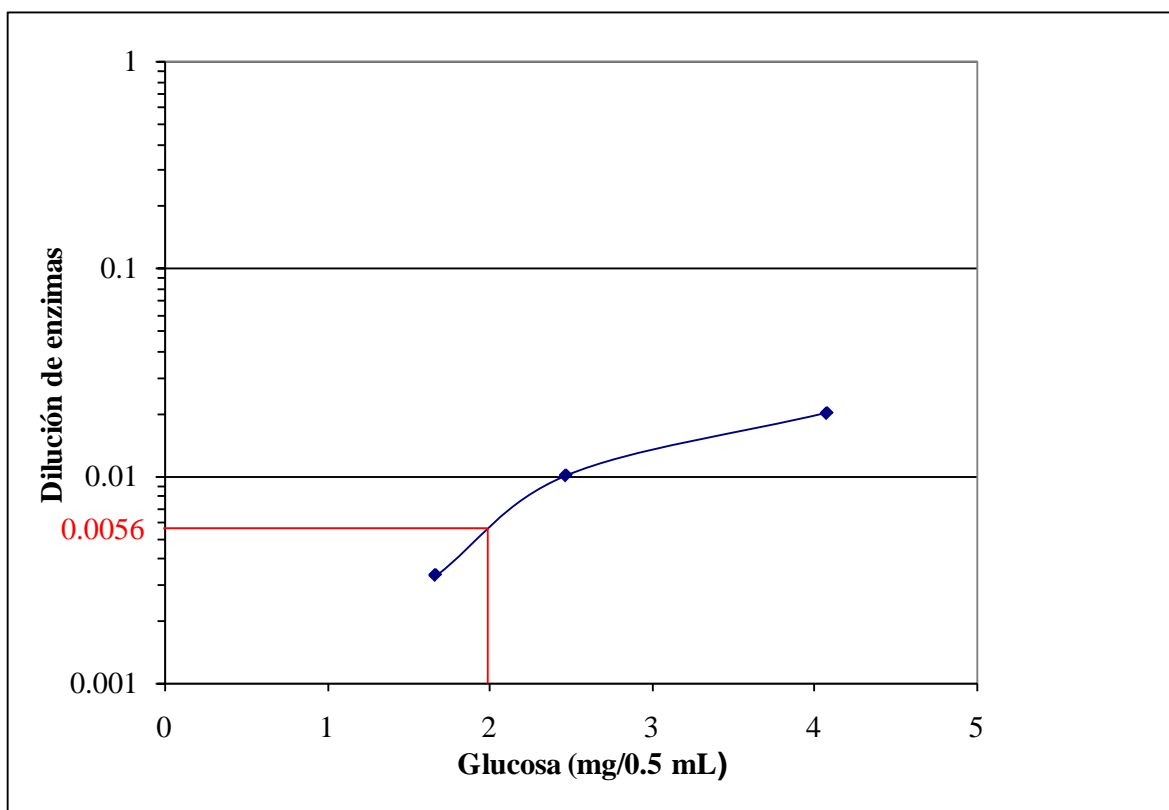


Fig. 32. Concentración de enzima para producir 2.0 mg/mL de glucosa.

El dato de dilución que generó 2.0 mg de glucosa se utilizó para el cálculo de FPU.

$$\text{FPU} = 0,37/0,0056 = 66.07$$

Apéndice II: Contenido de Monosacáridos de *L. rotundiflorus*.

A. Estándares de monosacáridos de 100 ppm.

Se disolvieron 0.1 g de cada estándar en 100 mL de agua desionizada (1000 ppm). Se tomaron 10 mL de cada estándar preparado de esta forma en un matraz y se aforaron con agua desionizada a 100 mL.

B. Cálculo de los carbohidratos en la mezcla problema.

En la tabla 11 se muestra el resultado del análisis por HPLC de la biomasa de *L. rotundiflorus*, en ppm (mg/L), así como las áreas bajo la curva de las señales. En la Fig. 33 se presenta el cromatograma.

Tabla 11. Datos obtenidos del cromatograma HPLC al analizar *L. rotundiflorus*.

Peak No.	Peak name	Results (ppm)	Ret. time (min)	Area (count)	Relative content
1	Arabinose	26.7046976	6.311	114213.013	3.3
2	Galactose	89.0156586	7.735	380710.044	11
3	Glucose	493.632289	8.781	2111210.24	61
4	Xylose	194.215982	10.943	830640.096	24
5	Mannose	5.66463282	13.054	24227.0028	0.7
TOTAL		809.23326		3461000.4	

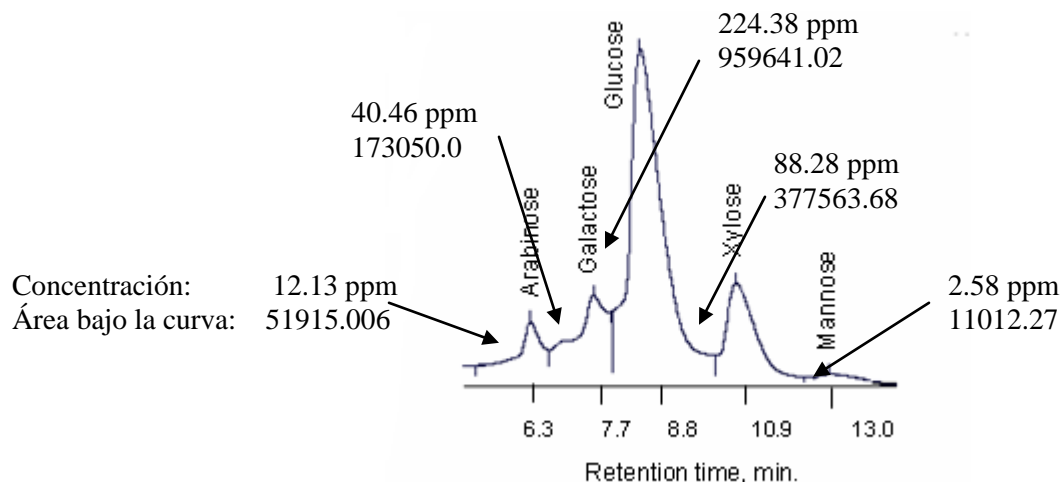


Fig. 33. Cromatograma del análisis HPLC de la planta de *L. rotundiflorus*.

El contenido relativo (de cada uno respecto al total), se calculó de la siguiente manera: A) considerando el contenido en ppm; B) Considerando el área bajo la curva de cada uno de los monosacáridos, respecto al valor total. Ejemplo:

A) Considerando la concentración $\% \text{ Glucosa} = \left(\frac{224.378}{367.83} \right) \times 100 = 61.0$

B) Considerando el área $\% \text{ Glucosa} = \left(\frac{2111210.24}{3461000} \right) \times 100 = 61.00$

Obteniendo los siguientes resultados (Tabla 12).

Tabla 12. Contenido relativo de monosacáridos en biomasa de *L. rotundiflorus*.

MONOSACARIDO	RELATIVO
Arabinosa	3.3
Galactosa	11
Glucosa	61
Xilosa	24
Manosa	0.7

El contenido de monosacáridos relativo a la biomasa se obtuvo con la fórmula:

$$\text{Monosacáridos respecto a biomasa inicial} = \frac{[\text{monosacárido, mg / L}](V)100}{mK}, \%$$

m = masa seca inicial, V = Volumen del hidrolizado, K = masa glucosa/masa anhidroglucosa = 180/162= 1.111

m= 0.300 g = 300 mg; V= 0.25 L

Por ejemplo, en el caso de la glucosa (493.63 mg/L), se obtuvo:

$$\% \text{ glucosa vs mp} = \frac{493.63 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0.25 \text{L} \times 100}{300 \text{ mg} \times 1.111} = 37.02$$

Generándose los datos mostrados en la tabla 13

Tabla 13. Contenido de monosacáridos como porcentaje de la biomasa original.

MONOSACARIDO	% vs BIOMASA
Arabinosa	2.003052624
Galactosa	6.676842079
Glucosa	37.02612426
Xilosa	14.56765545
Manosa	0.42488995
TOTAL	60.69856436

El total representa el contenido de azúcares en el material original (60% de carbohidratos respecto a la masa seca inicial).

Apéndice III. Hidrólisis con HCl concentrado.

A. Valoración del HCl con una concentración mayor al 37%.

5 mL de HCl preparado por burbujeo con HCl gas, se titularon con sosa 1N y anaranjado de metilo como indicador, gastando 69.9 ml. Se calculó la concentración en masa del HCl valorado (PM =36.6 g), de la siguiente manera.

$$\text{Concentración HCl} = \frac{69.9}{5} = 13.99 \frac{\text{EQ}}{\text{L}} \times 36.46 \frac{\text{g}}{\text{EQ}} = 510 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

La concentración obtenida es masa/volumen (m/v), por lo que para expresarse en g/g se considera la densidad de la solución (obtenida por valoración o en tablas de propiedades físicas y químicas de soluciones de HCl a diferentes concentraciones), $\delta = 1.198 \frac{mg}{mL} = 1198 \frac{g}{L}$.

La concentración en masa fue:

$$\text{Concentración HCl en peso} = \frac{1 L}{1198g} \times 510 \frac{g}{L} = 0,42 = 42\%$$

B. Balance de azúcares producidos.

En la tabla 14 se presentan los resultados obtenidos en las dos etapas de hidrólisis ácida.

Tabla14. Rendimiento de azúcares y porcentaje relativo de monosacáridos en los 2 pasos de sacarificación de *L. rotundiflorus* con HCl.

	Monosacáridos					
	Rendimiento de azúcares%	Arabinosa	Galactosa	Glucosa	Xilosa	Manosa
Primera hidrólisis (32% HCl)	25.3	14.2	8.9	16.8	60.0	tr
Segunda hidrólisis (42.6 % HCl)	22.4	nd	nd	97.7	2.3	nd

Tr = trazas
nd = No detectado

Para obtener el rendimiento de cada monosacárido se consideró el rendimiento en azúcares y el contenido relativo de monosacáridos, como se ejemplifica a continuación.

Primera hidrólisis:

$$\begin{aligned} \text{Glucosa} &= 100 \times 0.253 \times 0.168 = 4.25 \text{ g} \\ \text{Xilosa} &= 100 \times 0.253 \times 0.60 = 15.18 \text{ g} \\ \text{Resto de azúcares} &= 25.3 - (4.25 + 15.18) = 5.87 \end{aligned}$$

Segunda hidrólisis:

$$\begin{aligned} \text{Glucosa} &= 100 \times 0.224 \times 0.977 = 26.14 \text{ g} \\ \text{Xilosa} &= 100 \times 0.224 \times 0.023 = 0.5152 \end{aligned}$$

Por 100 g se obtuvo: $4.25 + 21.89 = 61.14 \text{ g de glucosa}$
 $15.18 + 0.51 = 15.59 \text{ g de xilosa}$
 $5.87 \text{ del resto de azúcares}$

Apéndice IV. Evaluación de azúcares reductores con el pretratamiento con UV en medio alcalino e hidrólisis enzimática.

Tabla 15. Azúcares reductores de la biomasa de *L. rotundiflorus* tratada con UV a diferentes condiciones e hidrolizada enzimáticamente.

Tratamiento	Absorbancia, 540 nm	Azúcares reductores, mg/mL	Hidrolizado, g	Residual,g
6 Horas				
Biomasa	0.42	0.432	0.190	0.810
L ₃₀₀	0.414	0.428	0.189	0.811
Sosa	1.285	0.945	0.417	0.583
L ₃₀₀ -Sosa	1.302	0.955	0.420	0.579
L ₃₀₀ -Sosa-C	1.331	0.972	0.429	0.571
L ₃₀₀ -Sosa-E-C	1.439	1.037	0.457	0.543
C-L ₃₀₀ -S-E-C	1.783	1.241	0.547	0.453
Papel Filtro	1.977	1.356	0.598	0.402
Sol, 100 h	0.477	4.653	0.205	0.795
12 horas				
Biomasa	0.472	4.624	0.204	0.796
L ₃₀₀	0.566	5.182	0.229	0.771
Sosa	1.5	10.728	0.473	0.527
L ₃₀₀ -Sosa	1.525	10.876	0.480	0.520
L ₃₀₀ -Sosa-C	1.635	11.530	0.509	0.491
L ₃₀₀ -Sosa-E-C	1.736	12.129	0.535	0.465
C-L ₃₀₀ -S-E-C	1.84	12.747	0.562	0.438
Papel Filtro	2.276	15.336	0.676	0.324
Sol, 100 h	0.568	5.188	0.229	0.771
24 horas				
Biomasa	0.583	5.830	0.233	0.767
L ₃₀₀	0.617	5.485	0.242	0.758
Sosa	1.581	11.209	0.494	0.506
L ₃₀₀ -Sosa	1.793	12.468	0.550	0.450
L ₃₀₀ -Sosa-C	1.841	12.753	0.562	0.438
L ₃₀₀ -Sosa-E-C	2.025	13.845	0.611	0.389
C-L ₃₀₀ -S-E-C	2.252	15.193	0.670	0.330
Papel Filtro	3.011	19.700	0.869	0.131
Sol, 100 h	0.662	5.782	0.255	0.755
48 horas				
Biomasa	0.582	5.820	0.233	0.767
L ₃₀₀	0.727	6.138	0.271	0.729
Sosa	1.706	11.951	0.527	0.473
L ₃₀₀ -Sosa	1.774	12.355	0.545	0.455
L ₃₀₀ -Sosa-C	1.83	12.687	0.560	0.440
L ₃₀₀ -Sosa-E-C	1.957	13.442	0.593	0.407
C-L ₃₀₀ -S-E-C	2.123	14.427	0.636	0.364
Papel Filtro	3.005	19.665	0.867	0.133
Sol, 100 h	0.661	5.746	0.253	0.747



Dato

utilizado

para

desarrollar

El ejemplo

A. Preparación de mezcla de enzimas.

La mezcla de enzimas para la hidrólisis del material pretratado se preparó de la siguiente manera:

Se consideró la siguiente carga y concentración:

18 FPU/g de Celulasa cuya concentración es de 66 FPU/mL

30 UI/g de Celobiasa, cuya concentración es de 250 UI/mL

2.5 % de xilanasa

Cálculos:

$$Celulasas = \frac{18 \cancel{FPU}}{g \text{ biomasa}} \times \frac{1 \text{ mL celulasa}}{66 \cancel{FPU}} = 0.27 \frac{mL}{g \text{ biomasa}}$$

$$Celobiasas = \frac{30 \cancel{UI}}{g \text{ biomasa}} \times \frac{1 \text{ mL celobiasa}}{250 \cancel{UI}} = 0.059 \frac{mL}{g \text{ biomasa}}$$

$$Xilanasa = 1g \text{ biomasa} \times 0.025 = 0.025 g$$

Para tratar un gramo de biomasa se mezclaron 0.27 mL de celulasas, 0.059 mL de celobiasas y 0.025 g de xilanasas.

B. Evaluación de azúcares reductores.

En la tabla 15 se presentan los datos de azúcares reductores (método DNS). Considerar el tratamiento señalado en la tabla (L₃₀₀-Sosa-E-C), cuyo dato de absorbancia es de 2.025. Este valor permitió calcular la concentración de AR, ya sea utilizando la curva de calibración (Fig. 34), o aplicando la ecuación que se muestra en la propia grafica de calibración $y = 1.684x + 0.3067$ donde x es el dato de concentración mientras que y es el dato de absorbancia.

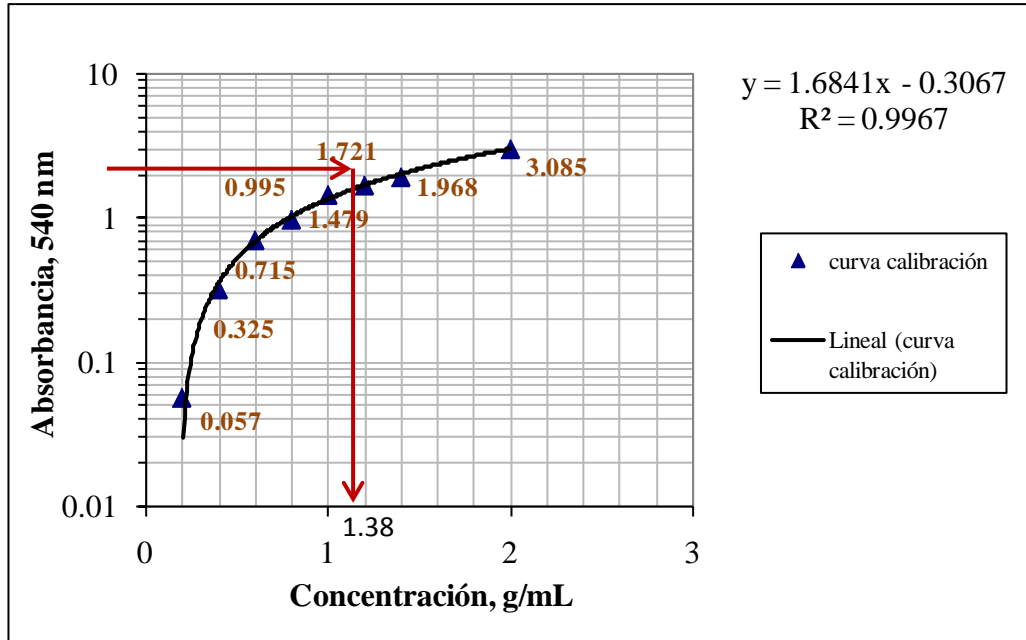


Fig. 34. Obtención de la concentración de la muestra problema utilizando el dato de azúcares reductores y la curva de calibración.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia} + 0.3067}{1.684} = \frac{2.025 + 0.3067}{1.684} = 1.3846$$

Debido a que el material hidrolizado fue diluido diez veces (1:10, para que las lecturas fueran en la zona de la curva de calibración), la concentración en AR obtenida fue multiplicada por diez (columna 3 de la Tabla 15), por lo que la concentración de azúcares reductores fue de 13.846 g/mL. En la cuarta columna se muestra la cantidad total de material hidrolizado, considerando que se hidrolizó 1 g de material pretratado en 49 mL de buffer (1% consistencia). Se aplicó la fórmula:

$$\% \text{ material hidrolizado} = \frac{[\text{Azúcares reductores, mg / mL}](V)100}{mK}$$

V= 49 mL; m= 1g = 1000 mg; K =1.111

$$\text{material hidrolizado} = \frac{13.846 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 49 \text{ mL} \times 100}{1000 \text{ mg} \times 1.111} = 61.07 \%$$

Considerando que se trató 1 g base seca, el material hidrolizado fue de 0.61 g, mientras que el material residual fue de $1 - 0.61 = 0.39$ g, cuyos valores se expresan en la columna 5 de la tabla. Significa que el 61% del material pretratado sin extraíbles (en el pretratamiento los extraíbles son eliminados) fue hidrolizado lo que representa el 75.5% ($\frac{61.07}{80.87}$) del contenido de carbohidratos de la biomasa (la biomasa libre de extraíbles tiene 80.87 % de carbohidratos). Para referirlo al material original, se consideró el contenido de extraíbles (22.4%), con lo cual el material hidrolizado bajo este concepto fue de 47.2% (61.07×0.774).

Apéndice V. Pretratamiento con Pxa y POMs más digestión enzimática.

A. titulación de mezcla de perácidos.

En la titulación de la mezcla de perácidos utilizada en los pretratamiento, se pesó 0.24 g de la solución por valorar, y se gastaron 13.9 ml de sulfato cérico 0,1 N en la titulación de H₂O₂ y 32.6 mL de tiosulfato de sodio 0,1 N en la titulación de Oxígeno Activo (OA). La concentración de H₂O₂ y de OA fue la siguiente:

$$a) H_2O_2 = \frac{13.9 \times 0.1 \times 1.7}{0.24} = 3.23\%$$

$$b) OA = \frac{32.6 \times 0.0979 \times 0.008 \times 100}{0.4} = 6.38\%$$

Los resultados se organizan en la Tabla 16

Tabla 16. Contenido de H₂O₂ y OA de la mezcla de perácidos, Pxa.

	%	g	moles	Composición en la mezcla
H ₂ O ₂	3.23	6.64	0.195	19.5% (residual)
OA	6.38	13.26	0.83	83%

La conversión del peróxido de Hidrógeno a perácidos fue de (0.83 moles/1 mol inicial) x 100 = 83%

B. Cálculo de la carga de reactivos para los pretratamientos con Pxa y POMs.

Las condiciones del tratamiento 7 de la Tabla 8 (página 74) fueron: Pxa = 1.5% como OA, POM (α -K₅[SiVW₁₁O₄₀]) = 1.8% mMol, T = 150 °C, t = 180 min, con 10% de consistencia (10 g de sólidos y 90 mL de líquido) y 10 gbs (gramos base seca) de material. La valoración de la mezcla de perácidos indicó una concentración de 6.38 % como Oxígeno Activo y el PM de la sal α -K₅[AlSiW₁₁O₄₀] es de 3120 g/Mol. Con estos datos, la carga de reactivos se efectuó de la siguiente manera:

$$Carga\ de\ Pxa = 10 \times 0.015 = 0.15\ g$$

$$Volumen\ de\ Pxa = 0.15\ g \times \frac{100\ mL}{6.38\ g} = 2.3\ mL$$

$$Carga\ de\ POM = 1.8 \frac{mMol}{L} \times \frac{3.12\ g}{mMol} \times \frac{90\ mL}{1000\ mL} = 0.505\ g$$

$$Agua\ necesaria = 90\ mL - 2.3\ mL = 88\ mL$$

En un matraz con 88 mL de agua se añadieron 10 g de muestra base seca, 2.3 mL de mezcla de perácidos y 0.505 g de POM, para aplicar las condiciones de temperatura y tiempo requeridos.

C. Azúcares reductores.

Considerar el tratamiento con 0.5% Pxa, 190 °C y 20 minutos. En la tabla 17 se expresan los resultados obtenidos en la evaluación de azúcares reductores por el método DNS.

Tabla 17. Azúcares reductores obtenidos con el método DNS, en el pretratamiento Pxa-POMs y digestión enzimática de *L. rotundiflorus*.

ETAPA	Lectura 540nm	Concentración de Azúcares reductores mg/mL	Concentración AR con la dilución 1:10	Hidrolizado vs 1 g biomasa
Pretratamiento	0.341	0.22	2.208	0.22
Hidrólisis enzimática	1.47	1.05	10.53	0.36

Con los datos de lectura a 540 nm y la curva de calibración (Fig. 31 página 80), se obtuvieron los azúcares reductores. Este valor fue multiplicado por 10 debido al factor de dilución utilizado (columna 4 de la tabla 17). El material hidrolizado (columna 5) se calculó aplicando la formula:

$$\% \text{ material hidrolizado} = \frac{[Azucars\ reductores, mg / mL](V)100}{mK}$$

Con m = 1 g, Azúcares reductores = 10.53 mg/mL, V =49, K = 1.111

$$material\ hidrolizado = \frac{10.53 \frac{mg}{mL} \times 49\ mL \times 100}{1000\ mg \times 1.111} = 46.44\%$$

Para expresar el resultado respecto a la biomasa original (la cual contenía 22.4% de extraíbles) se multiplicó por 0.776, obteniendo un valor de 36% de azúcares fermentables ó 0.36 al tomar como base 1 gramo de material seco.

De forma similar se obtuvo el dato de azúcares fermentables para el pretratamiento (en este caso, el valor de azúcares fermentables es directo a la biomasa original), por lo que el rendimiento total en azúcares fermentables fue $36 + 22 = 58\%$.