



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

ESTUDO DO EFEITO DE COMPOSTOS
TENSIOACTIVOS NO AUMENTO DA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE PRÉ-TRATADOS.

ESTUDIO DEL EFECTO DE COMPUESTOS
TENSIOACTIVOS EN EL AUMENTO DE HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA DE BIOMASA PRE-TRATADA.

DANIEL PÉREZ ANTOLÍN

TRABAJO EFECTUADO CON LA ORIENTACIÓN DEL PROFESOR
NUNO CLÁUDIO DA ROCHA MESES PEDRO

JULIO 2012

Anexo 1

DECLARAÇÃO

Nome: DANIEL PÉREZ ANTOLÍN .

E-mail: daniperez25@gmail.com . Telefone: +34 680 511 180 .

Bilhete de Identidade: 71940909-Z .

Título do trabalho:

ESTUDO DO EFEITO DE COMPOSTOS TENSIOACTIVOS NO AUMENTO DA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PRÉ-TRATADOS .

ESTUDIO DEL EFECTO DE COMPUESTOS TENSIOACTIVOS EN EL AUMENTO DE
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA PRE-TRATADA .

Orientador(es): Nuno Cláudio da Rocha Meses Pedro .

Ano de conclusão: 2012 .

Designação do trabalho de fim de curso: _____ .

ENGENHARIA BIOLÓGICA E ALIMENTAR .

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTES TRABALHOS APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Instituto Politécnico de Castelo Branco, ___/___/_____

Assinatura: _____

Anexo 2

DECLARAÇÃO

Nome: DANIEL PÉREZ ANTOLÍN .

E-mail: daniperez25@gmail.com . Telefone: +34 680 511 180 .

Bilhete de Identidade: 71940909-Z .

Título do trabalho:

ESTUDO DO EFEITO DE COMPOSTOS TENSIOACTIVOS NO AUMENTO DA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PRÉ-TRATADOS .

ESTUDIO DEL EFECTO DE COMPUESTOS TENSIOACTIVOS EN EL AUMENTO DE
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA PRE-TRATADA .

Orientador(es): Nuno Cláudio da Rocha Meses Pedro .

Ano de conclusão: 2012 .

Designação do trabalho de fim de curso: _____ .

ENGENHARIA BIOLÓGICA E ALIMENTAR .

Declaro que concedo ao Instituto Politécnico de Castelo Branco e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, o meu trabalho, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo o Instituto Politécnico de Castelo Branco a arquivar mais de uma cópia do trabalho e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o trabalho entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos ao trabalho, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que o meu trabalho seja colocada no repositório do Instituto Politécnico de Castelo Branco com o seguinte estatuto (assinale um):

1. Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo no Instituto Politécnico de Castelo Branco durante o período de 1 ano, 2 anos ou 3 anos, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial.
3. Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo no Instituto Politécnico de Castelo Branco

Instituto Politécnico de Castelo Branco, ___/___/_____

Assinatura: _____

**ESTUDO DO EFEITO DE COMPOSTOS
TENSIOACTIVOS NO AUMENTO DA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE PRÉ-TRATADA.**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE COMPUESTOS
TENSIOACTIVOS EN EL AUMENTO DE HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA DE BIOMASA PRE-TRATADA.**

DANIEL PÉREZ ANTOLÍN

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenharia Biológica e Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Nuno Cláudio da Rocha Meses Pedro do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

*a toda minha família e amigos,
porque sem eles tivesse sido impossível chegar até onde cheguei*

Resumo.

Na produção de etanol celulósico é fundamental que na etapa de fermentação os microorganismos tenham à sua disposição açúcares simples. Para tal são necessárias duas etapas prévias que promovam a “desconstrução” da madeira nestes monómeros. Na primeira etapa o material lenho-celulósico é submetido a pré-tratamentos químicos que têm o objectivo de quebrar a estrutura organizada da madeira permitindo por essa acção que as enzimas hidrolíticas possam transformar a celulose e hemicelulose em hexoses e pentoses.

Neste trabalho de estágio pretende-se estudar o efeito da adição de compostos tensioactivos no aumento da conversão enzimática de materiais pré-tratados. Assim, testar-se-à a adição de polyethylene glycol 4000 (peg4000), polysorbate 20 (tween 20) e bovine serum albumine (bsa) no aumento da eficiência da hidrólise enzimática. Cada um destes compostos será testado em dois tipos de pré-tratados, o primeiro resultante dum pré-tratamento com ácido H_2SO_4 - 4,09% (w/w), 156°C, 102min, o segundo proveniente de um pré-tratamento com NaOH - 10%(w/v), 156°C,102min. No final pretendem-se analisar quais dos compostos gera maior incremento e se esse efeito se faz sentir da mesma forma nos dois pré-tratados analisados (ácido e alcalino).

Biomassa utilizada - resíduos das podas do olival com granulometria inferior a 0,5mm

Resumen.

En la producción de etanol celulósico, es esencial, en la etapa de fermentación que los microorganismos tengan a su disposición azúcares simples. Esto requiere dos pasos preliminares para promover la "desconstrucción" de la madera en estos monómeros. .

En el primer paso el material de madera celulósica se somete a pre-tratamientos químicos que están destinados a romper la estructura y así facilitar a las enzimas hidrolíticas la acción de conversión de celulosa y hemicelulosa en pentosas y hexosas.

En este trabajo se pretende evaluar el efecto de la adición de compuestos tensioactivos en el aumento de la conversión enzimática del material pretratado.

Así, se testara la adición de polietilenglicol 4000 (PEG4000), polisorbato 20 (Tween 20) y albúmina de suero bovino (BSA) para aumentar la eficiencia de la hidrólisis enzimática

Cada uno de estos compuestos será testado en dos tipos de pre-tratado, lo primero como resultado de un pre-tratamiento ácido H_2SO_4 - 4,09% (w / w), 156 ° C, 102min, el segundo de un pre-tratamiento alcalino con NaOH - 10% (w / v), 156 ° C, 102min.

Al final vamos a analizar cuáles de los compuestos conduce a un mayor incremento y se este efecto se siente de la misma manera en lo pre-tratado ácido e alcalino.

La biomasa utilizada - residuos de la poda del olivar, con un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm.

Abstract.

In the production of cellulosic ethanol, is essentially l in the fermentation step that microorganisms have available to simple sugars. This requires two preliminary steps to promote the "deconstruction" of wood in these monomers.

In the first step the wood cellulosic material is subjected to chemical pre-treatments are intended to break the structure and thus facilitate the action hydrolytic enzymes to convert cellulose and hemicellulose into pentoses and hexoses.

In this work was to assess the effect of addition of surfactants in enhancing the enzymatic conversion of pretreated materials.

Thus, it will test the addition of polyethylene glycol 4000 (PEG4000), polysorbate 20 (Tween 20) and bovine serum albumin (BSA) to increase the efficiency of enzymatic hydrolysis Each of these compounds will be tested in two types of pre-treated, first as a result of an acid pretreatment H_2SO_4 - 4.09% (w / w), 156 ° C, 102min, the second pre-treatment alkaline with NaOH - 10% (w / v), 156 ° C, 102min. At the end we will analyze which of the compounds leads to a further increase this effect and feel in the same manner as acid pretreated and alkaline.

The biomass used - waste of pruning the olive grove, with a particle size less than 0.5 mm

ÍNDICE

RESUMO/ RESUMEN/ ABSTRACT

	<i>Pág.</i>
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	8
2. ASPECTOS GENERALES.....	10
2.1. MARCO TEÓRICO.....	11
2.2. PRE- TRATAMIENTO.....	11
2.2.1. PRE-TRATAMIENTO ÁCIDO.....	12
2.2.2. PRE-TRATAMIENTO ALCALINO.....	13
2.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	13
2.4. APLICACIÓN DE COMPUESTOS TENSIOACTIVOS.....	16
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	17
3.1. MATERIAL UTILIZADO.....	19
4. RESULTADOS.....	22
5. CONCLUSIONES.....	29
6. BIBLIOGRAFIA.....	30

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Fig. 1 Estructura de la Celulosa.....	10
Fig. 2 Esquema de Pre tratamiento de la Biomasa.....	11
Fig. 3 Esquema de Estados de la Biomasa.....	11
Fig. 4 Esquema Acción del Pre tratamiento.....	12
Fig. 5 Esquema de Transformación de la Celulosa en Glucosa.....	14
Fig. 6 Esquema de Formación de Compuestos Inhibidores.....	15
Fig. 7 Esquema de Procedimiento Experimental.....	17
Fig. 8 Tabla de Material y Reactivos Químicos.....	19-21
Fig. 9 Tablas de Resultados.....	23-28

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Hoy en día el mundo en el que vivimos es completamente dependiente de los combustibles fósiles. Por otro lado, cada día contamos con una mayor escasez de estas fuentes de energía no renovables.

Es por ello que se hace indispensable buscar fuentes de energías alternativas, pero intentando no alterar de una manera drásticas las máquinas y métodos de transformar esos combustibles fósiles en energía aprovechable.

Por lo tanto, sería lo ideal encontrar alternativas cuya similitud física y química con los combustibles actuales fuera grande, pero que a su vez, estos provinieran de fuentes renovables.

Es aquí donde nos encontramos con el concepto bio, los biocombustibles son aquellos combustibles producidos a partir de la biomasa y que son considerados, por tanto, una energía renovable. Se pueden presentar tanto en forma sólida (residuos vegetales, fracción biodegradable de los residuos urbanos o industriales) como líquida (bioalcoholes, biodiesel) y gaseosa (biogás, hidrógeno).

El objeto del presente informe, como ya se ha mencionado anteriormente, es analizar el efecto de la adición de sustratos en el aumento de la hidrólisis enzimática. Por lo tanto, lo que se busca es una mayor producción de azúcar para lógicamente después tener una mayor cantidad de alcohol.

Es por ello que nos centraremos ahora en una breve descripción del bioetanol.

El alcohol etílico o bioetanol es un producto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los productos vegetales, tales como cereales, remolacha, caña de azúcar o biomasa. Estos azúcares están combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa. Las plantas crecen gracias al proceso de fotosíntesis, en el que la luz del sol, el dióxido de carbono de la atmósfera, el agua y los nutrientes de la tierra forman moléculas orgánicas complejas como el azúcar, los hidratos de carbono y la celulosa, que se concentra en la parte fibrosa la planta.[1]

Actualmente, el bioetanol es el biocombustible con mayor producción mundial, del que se prevé que se elaboren más de 87.600 millones de litros durante el año 2012 en todo el mundo. [17]

Para su fabricación se pueden utilizar una gran cantidad de materias primas. Brasil produce bioetanol principalmente de caña de azúcar, EE.UU a partir del almidón del maíz, por resaltar los dos mayores productores mundiales, pero también se utiliza remolacha, cereal o residuos forestales.

Se está estudiando la posibilidad de cultivar árboles, con alto contenido de celulosa, con el único fin de producir etanol, como pueden ser el chopo o el sauce.

Igualmente el cultivo específico de algunas plantas con el fin de producir combustible podría ser una alternativa a las tierras sin cultivo, en el marco de la Política Agraria Común (PAC).

Otra alternativa a las cosechas dedicadas a fines energéticos, es el uso de residuos de procesos agrícolas, forestales o industriales, con alto contenido en biomasa. Estos residuos pueden ir desde la paja de cereal a las “limpias” forestales, pasando por los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) o las cáscaras de cereal o de arroz. Los residuos tienen la ventaja de su bajo coste, ya que son la parte no necesaria de otros productos o procesos, salvo cuando son utilizados en la alimentación del ganado.

La utilización del etanol como combustible ha pasado por varias etapas a través de los años.

En los orígenes de la industria automovilística fue el principal combustible: los motores de ciclo Otto se diseñaron en principio para utilizarlo, pero posteriormente con el desarrollo de la industria basada en el petróleo los fabricantes de motores se decantaron por esta segunda opción. Cuando se temió por la estabilidad de estos mercados en los años 20 y el posterior embargo petrolífero del año 1973 se volvió a invertir en el desarrollo de bioetanol. El primer país que asumió este reto fue Brasil que a partir de ese año comenzó a mezclar etanol y gasolina en la proporción de 22:78. En 1979 Brasil produjo los primeros automóviles que podían funcionar con alcohol hidratado (95% de etanol y 5% de agua), más tarde, en 1980 la mayor parte de los coches fabricados estaban diseñados para funcionar exclusivamente con etanol. [1]

Hasta los años 80 la principal motivación para la producción de etanol fue su uso como combustible alternativo para la automoción, y así disminuir la dependencia de las importaciones de crudo y minimizar el impacto que las fluctuaciones del mercado ocasionan en los precios. A partir de mediados de los 80, a esta motivación se ha unido las políticas de mejoras medioambientales, principalmente en lo relativo a emisiones gaseosas. El creciente interés que han generado en los últimos años los problemas derivados del cambio climático, producido por las emisiones de gases de “efecto invernadero”, ha hecho que se busquen combustibles más respetuosos con el medio ambiente. Al igual que en el caso del biodiesel, la combustión del bioetanol produce el mismo CO₂ que absorbió la planta durante su crecimiento, si se exceptúa el emitido debido a la actividad energética necesaria en el proceso de su producción, por lo que algunos autores dicen que el balance es cero, en cuanto a las emisiones de CO₂. [1]

El etanol se usa en mezclas con la gasolina en concentraciones del 5 o el 10%, E5 y E10 respectivamente, que no requieren modificaciones en los motores actuales. Un obstáculo importante es la legislación europea sobre la volatilidad de las gasolinas que fija la proporción de etanol en mezclas E5. Concentraciones más elevadas, autorizadas en Suecia y Estados Unidos, permitirían disponer de un vehículo flexible, con un depósito, motor y sistema de combustible único capaz de funcionar con gasolina y etanol, solos o mezclados en cualquier proporción [15]. La otra alternativa para su uso es en forma de aditivo de la gasolina como etil-tercbutil éter (ETBE). [1]

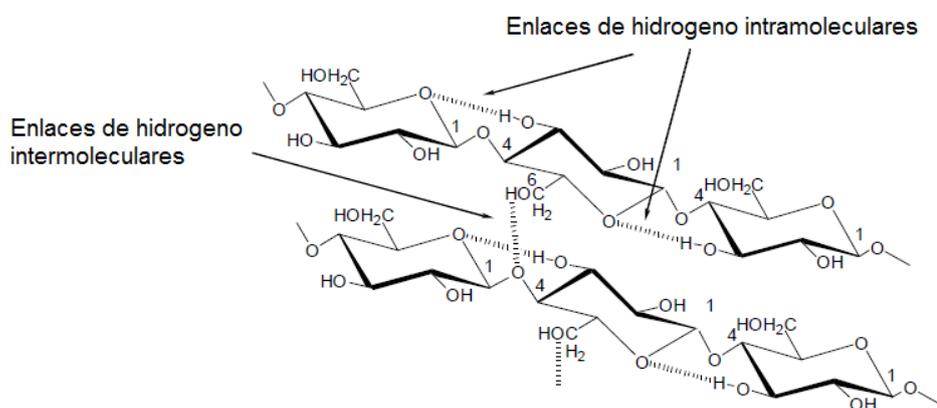
En nuestro caso de estudio, cabe destacar que la biomasa procede de la poda del olivar, por lo que se consigue un doble efecto ecológico, por un lado se trata de una fuente de energía renovable como es la biomasa la cual no sólo no genera CO₂ y otros gases de efecto invernadero, sino que los consume; y por otro lado, mediante la utilización de las podas del olivar para la obtención de bioetanol, se da utilidad a un producto de desecho agrícola que hasta día de hoy no tenía otra salida que ser incinerado directamente en el campo o bien en las casas y lugares controlados para la obtención de calor de forma directa.

Objetivos

- Llevar a cabo un estudio sobre el aumento de la hidrólisis de biomasa pre tratada mediante la adición de diferentes sustratos.
- Analizar cuál es el sustrato más conveniente para cada pre-tratamiento de la biomasa según los resultados obtenidos.

2. ASPECTOS GENERALES

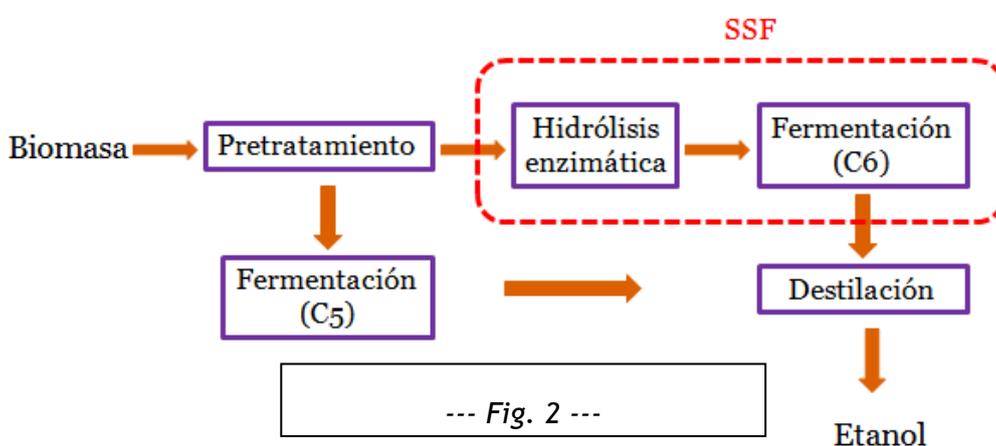
Las celulosas no pueden ser fermentadas directamente, es necesario convertirlas en azúcares más sencillos para su conversión en alcohol. La hidrólisis es un proceso químico que divide la molécula de celulosa por la acción de la molécula de agua. Las complejas estructuras de la celulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) son divididas en diferentes procesos para conseguir una solución azucarada, y eliminar productos de descomposición de los azúcares que pueden inhibir o, al menos, dificultar el proceso de fermentación.



--- Fig. 1 ---

2.1. MARCO TEÓRICO

La conversión de la biomasa lignocelulósica a etanol se realiza en varias etapas; la primera es el pre tratamiento, que tiene como objetivo desagregar la matriz vegetal, solubilizar total o parcialmente la lignina, hidrolizar la hemicelulosa y reducir la cristalinidad de la celulosa. La segunda etapa es la hidrólisis de la celulosa, dando lugar a la recuperación de glucosa; la tercera es la fermentación de los monosacáridos vía enzimática y la última es la destilación del etanol producido. En la figura se esquematizan las etapas del proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.



2.2. PRE-TRATAMIENTO

El objetivo del pre tratamiento es alterar la biomasa para aumentar la producción de monosacáridos en la hidrólisis enzimática y minimizar la formación de compuestos inhibidores de la fermentación provenientes de la degradación de los carbohidratos y la lignina. El éxito del pre tratamiento se mide en función de la degradación de la lignina y la hemicelulosa como un indicador de la disociación de la matriz celulosa-lignina, la disminución de la cristalinidad y el aumento de la porosidad de la celulosa. La mayoría de los pre tratamientos no logran cumplir todos los objetivos simultáneamente.



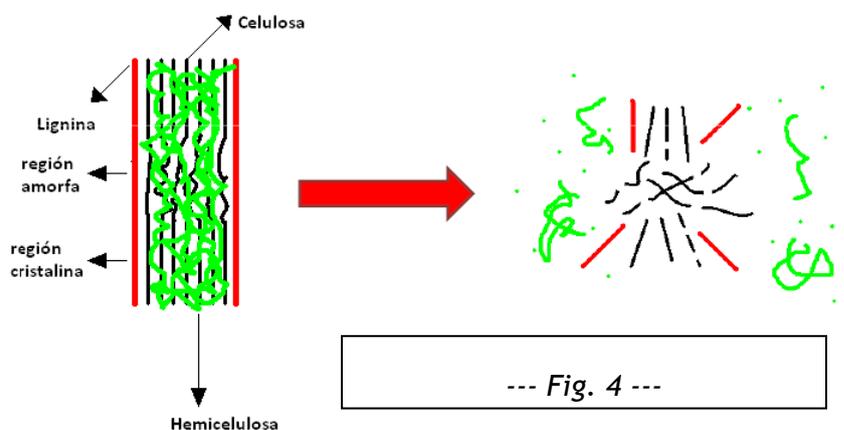
Para retirar la hemicelulosa se pueden usar soluciones ácidas que diluyen la hemicelulosa, como soluciones diluidas de ácidos inorgánicos o agua a temperaturas mayores a los 180 °C, donde el agua

actúa como un ácido débil y además recibe los hidrogeniones de los ácidos orgánicos contenidos en la hemicelulosa que incrementan la acidez de la solución. En particular, la hidrólisis de la hemicelulosa tiene la ventaja de producir hexosas y pentosas listas para la fermentación.

La lignina es mucho más difícil de transformar debido a los enlaces éter que la conforman, pero puede ser levemente degradada cuando se somete a calentamiento a temperaturas entre 130 y 160 °C, donde alcanza el punto de transición vítrea, o puede ser parcialmente hidrolizada en medio ácido.

La disminución de la cristalinidad de la celulosa se logra por rompimiento de los puentes de hidrogeno existentes en ésta, ya sea por calentamiento o por acción de compuestos con presencia de puentes de hidrógeno, como los ácidos inorgánicos (H_2SO_4 , HCl , o H_3PO_4) y líquidos iónicos como el cloruro de 1-butil-3-metillimidazol.

Durante el pre tratamiento se debe valorar sus beneficios frente a los costos de su aplicación y sus consecuencias en etapas posteriores del proceso, teniendo en cuenta el tipo de biomasa que se emplea.



2.2.1. PRE-TRATAMIENTO ÁCIDO

El pre tratamiento con ácido sulfúrico diluido ha sido ampliamente estudiado. La reacción se realiza colocando en contacto la biomasa con la solución de ácido a temperaturas entre 150 y 220 °C por periodos de tiempo entre 1 y 160 min.

La presencia del ácido provoca la degradación de la hemicelulosa y la ruptura de las fibras celulósicas mejorando el rendimiento de la hidrólisis de celulosa a glucosa. La desventaja de este pre tratamiento es la producción de inhibidores como 5-HMF y furfural, los cuales deben ser removidos antes de la etapa de hidrólisis enzimática, por lo que es necesario realizar lavados al material sólido pre tratado, asumiendo la pérdida de monosacáridos obtenidos durante el pre tratamiento que son solubles en el agua de lavado. [3]

El pre tratamiento ácido llevado a cabo fue con ácido sulfúrico diluido a una temperatura de 156°C durante 102 minutos.

2.2.2. PRE-TRATAMIENTO ALCALINO

El uso de este pre tratamiento depende del contenido de lignina en el material. El mecanismo de la hidrólisis alcalina se basa en la saponificación de los enlaces de ester que atraviesan los xilanos en la hemicelulosa y otras componentes como la lignina y otra hemicelulosa. Así, el tratamiento con NaOH diluido aumenta el área superficial y disminuye el grado de polimerización y cristalinidad por la remoción de los enlaces entre la lignina y los carbohidratos. [4]

El pre tratamiento alcalino ha sido reflejado en menor medida en la bibliografía, debido principalmente a que mediante esta técnica se consiguen resultados bastante inferiores al pre tratamiento con ácido.

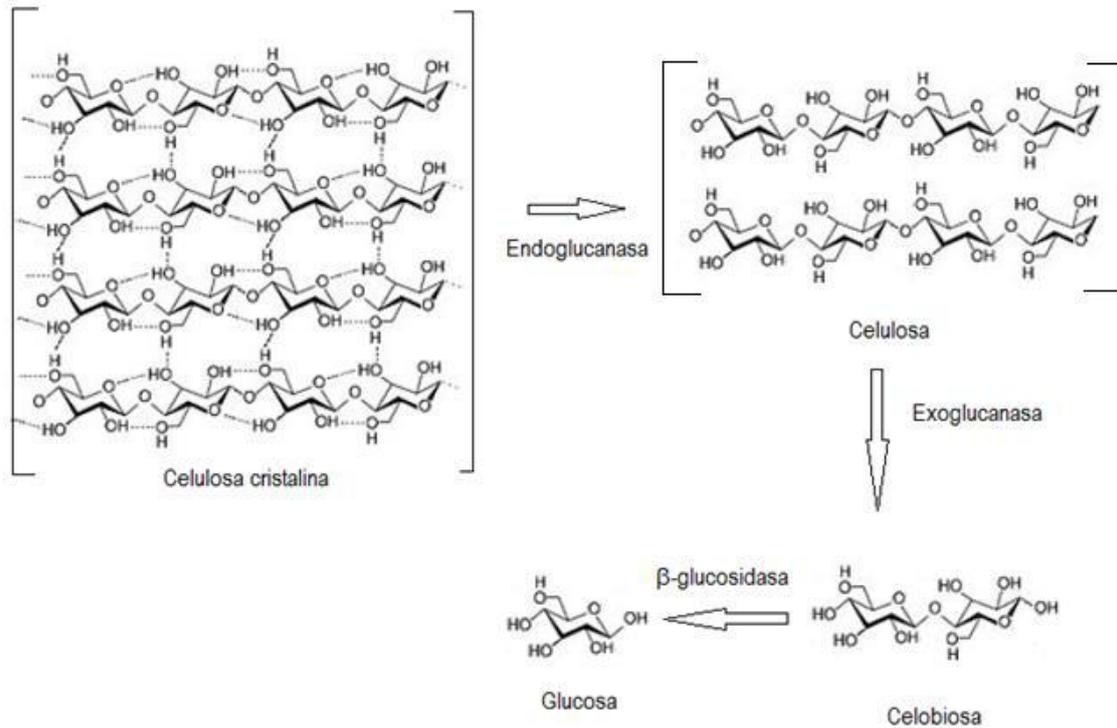
Como principal ventaja presenta que el acceso al NaOH es muy fácil y a bajo costo.

El pre tratamiento básico llevado a cabo fue con hidróxido sódico diluido a una temperatura de 120°C durante 100 minutos.

2.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En la hidrólisis enzimática se produce la ruptura de las cadenas poliméricas de la celulosa y la hemicelulosa, que previamente han sido modificadas estructuralmente en el pre tratamiento. A partir de la celulosa se obtiene glucosa, mientras que a partir de la hemicelulosa se obtienen diferentes monosacáridos, tales como xilosa, glucosa, arabinosa, galactosa y manosa, entre otros.

La hidrólisis enzimática es realizada por enzimas de alta especificidad, como las celulasas y xilanasas producidas a partir de hongos y bacterias. Las celulasas son una mezcla de enzimas de al menos tres grupos: 1) las endoglucanasas, las cuales atacan regiones de celulosa de baja cristalinidad descomponiendo los enlaces $\beta(1-4)$ y creando finales de cadena; 2) las exoglucanasas, las cuales degradan la celulosa cristalina y amorfa para producir celobiosa y 3) las β -glucosidasas, que hidrolizan la celobiosa y oligosacáridos menores para producir glucosa y así evitar su efecto inhibitorio por acumulación en el medio de reacción. [3]



--- Fig. 5 ---

Los principales factores que afectan la eficiencia de la hidrólisis enzimática son: el sustrato, la actividad de la celulasa y las condiciones de reacción. [3]

La susceptibilidad de las celulasas al sustrato celulósico depende de las características de éste, incluyendo el contenido de lignina y hemicelulosa, la porosidad, la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa. El contenido de lignina es determinante en el rendimiento de la hidrólisis, debido a que bloquea el acceso de las celulasas por impedimento estérico causado por los enlaces lignina - carbohidratos y por la naturaleza hidrofóbica de la lignina que rechaza la acción hidrofílica de las enzimas. Por lo tanto la degradación de la lignina es determinante en el rendimiento de la hidrólisis enzimática, comparado con la hidrólisis de la hemicelulosa. [3]

La actividad de las celulasas se ve afectada por la presencia en menor proporción de celobiosa y glucosa. Entre los métodos implementados para reducir la inhibición están: el aumento de la concentración de enzimas, la adición de β-glucosidasas en la hidrólisis y la remoción de glucosa por hidrólisis y fermentación simultánea (SSF). [3]

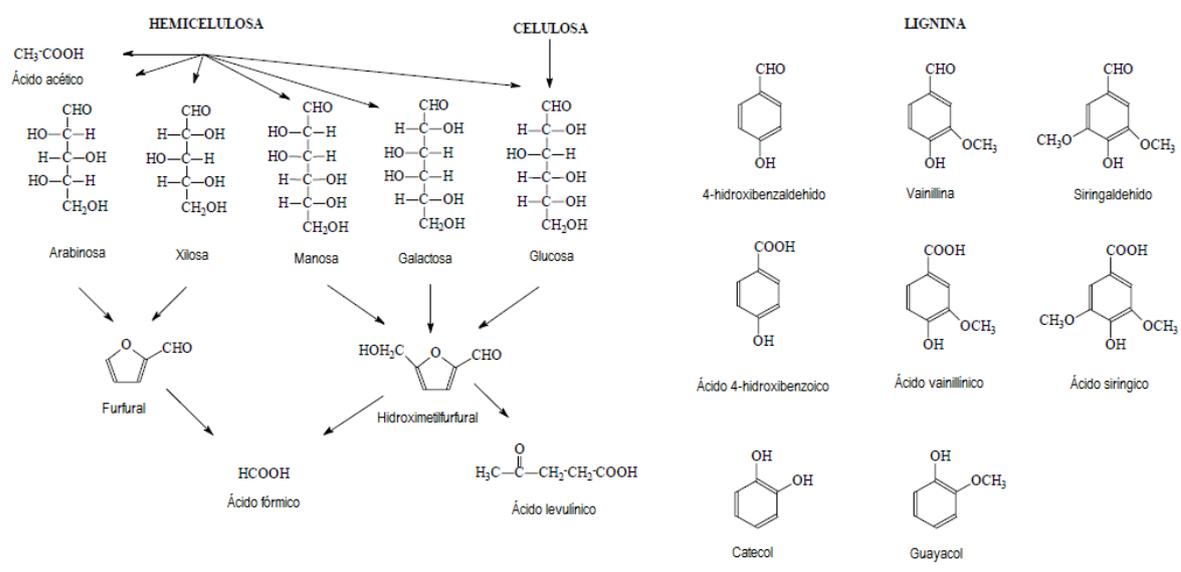
En el proceso de producción de etanol lignocelulósico no solo se obtienen azúcares provenientes de la hidrólisis y solubilización de la celulosa y hemicelulosa, sino que, debido a las altas temperaturas y condiciones en las que se desarrollan estos procedimientos, se producen una serie de compuestos que pueden actuar como inhibidores potenciales de la fermentación. La naturaleza y concentración de estos compuestos depende del tipo de biomasa, del pre tratamiento utilizado, las condiciones de proceso y la utilización o no de catalizadores ácidos. [3]

Los compuestos inhibidores son producidos por la degradación de los monosacáridos obtenidos en la hidrólisis de la hemicelulosa y el fraccionamiento de la lignina durante el pre tratamiento, se pueden clasificar en tres grupos: derivados del furano, ácidos alifáticos de baja masa molecular y derivados fenólicos.[3]

Los derivados del furano son producto de la degradación de la hemicelulosa y celulosa durante el pre tratamiento a altas temperaturas y tiempos de residencia prolongados. El furfural es formado por la degradación de las pentosas xilosa y arabinosa, mientras que el 5-hidroximetilfurfural (HMF) es obtenido por la degradación de las hexosas glucosa, manosa y galactosa.

Dentro de los ácidos alifáticos que se pueden encontrar el ácido fórmico y levulínico, resultantes de la subsecuente degradación del furfural en HMF, respectivamente. Adicionalmente se puede encontrar ácido acético procedente de la hidrólisis de los grupos acetil presentes en la hemicelulosa.

El fraccionamiento de lignina durante el pre tratamiento da lugar a la formación de los derivados fenólicos, tales como el ácido 4-hidroxibenzoico, un compuesto abundante en biomásas de alto contenido de lignina, el siringaldehído y el ácido sirínico, procedente de la degradación de la unidad siringilo, la vainillina y el ácido vainillínico originados por la degradación de las unidades guayacilo de la lignina. En la Figura 6 se esquematiza la formación de los compuestos que inhiben la fermentación de los azúcares fermentables.



--- Fig. 6 ---

Entre los efectos producidos por el furfural y el 5-HMF sobre los microorganismos de fermentación de los azúcares, se encuentran la reducción de la tasa de crecimiento de los microorganismos y la disminución de la productividad volumétrica de etanol. [3]

2.4. APLICACIÓN DE COMPUESTOS TENSIOACTIVOS

El interés de los compuestos tensioactivos radica en su carácter anfifílico: es decir, en la presencia en una misma molécula de dos o más grupos con propiedades antagónicas respecto de un mismo disolvente. Todas las sustancias anfifílicas tienen una estructura molecular común que tiene dos partes: un grupo polar que contiene heteroátomos como O, S, P ó N que se encuentran en grupos alcohol, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida, etc., y un grupo apolar o poco polar que es en general un grupo hidrocarbonado de tipo alquil o alquil benceno, y que puede contener eventualmente átomos de halógeno u oxígeno.

En concreto, los compuestos tensioactivos o surfactantes sobre los cuales se ha desarrollado el estudio son 3, PEG, BSA y TWEEN-20

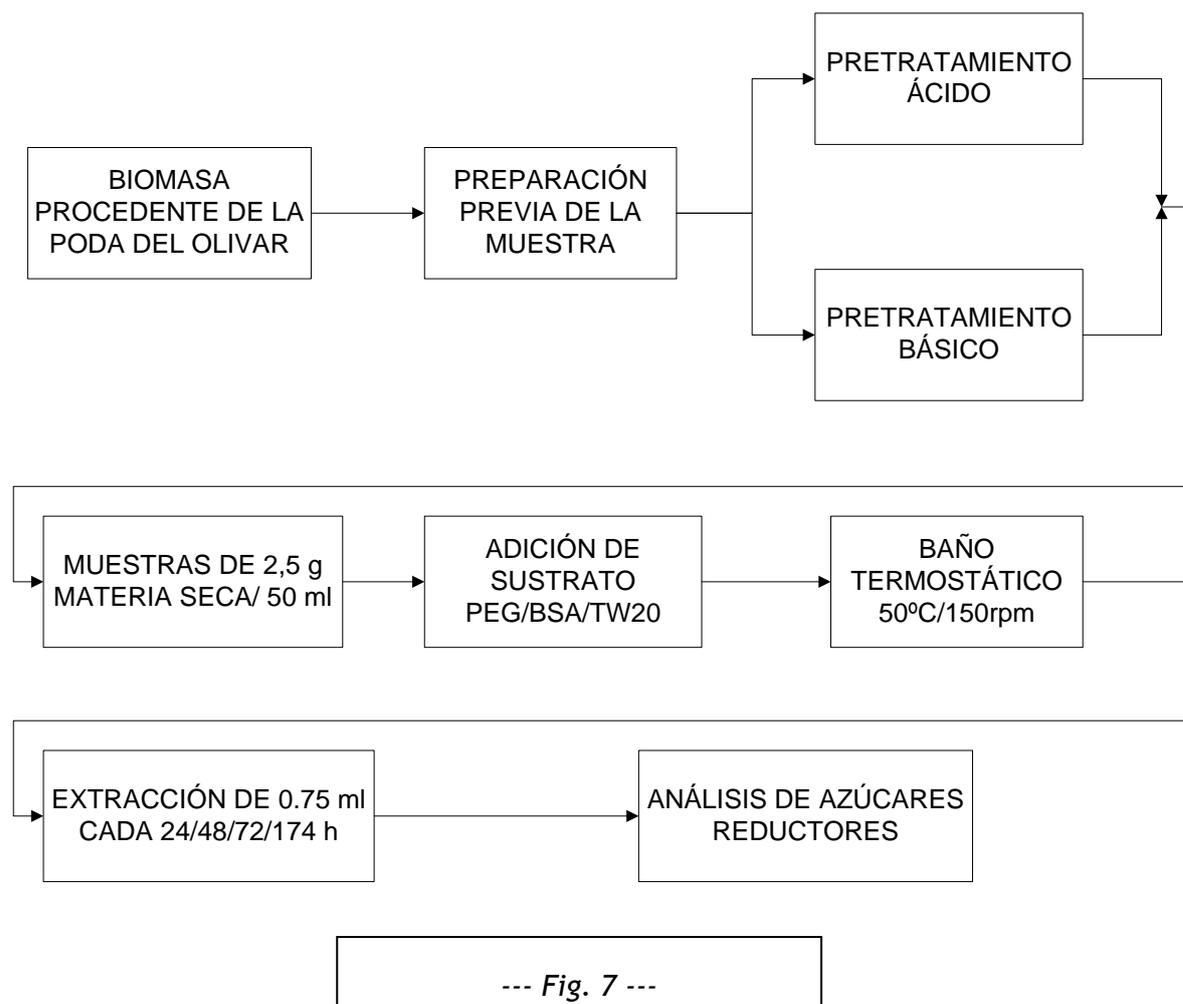
El polietilén-glicol (PEG) es un poliéter ampliamente empleado en la industria. Su nombre generalmente aparece asociado a un número que hace referencia a la masa molecular del polímero; por ejemplo, un PEG con $n=80$ poseerá una masa molecular media de unos 3500 Da, por lo que se llamará PEG 3500. Su estructura química puede representarse como $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$.

La albúmina de suero bovino o ASB (más conocida por sus siglas en inglés, BSA), es una proteína extraída del suero bovino que es ampliamente usada en muchos procedimientos bioquímicos.

El polisorbato 20 o Monooleato de Polioxietileno Sorbitan conocido comercialmente como Tween 20, es un surfactante polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea usado como detergente y emulsionante en numerosas aplicaciones domésticas, científicas y farmacológicas.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

El procedimiento experimental llevado a cabo en el presente proyecto se muestra de manera esquematizada en la siguiente figura, explicándose de manera detallada cada uno de los pasos a continuación.



PREPARACIÓN PREVIA DE LA MUESTRA.- La biomasa empleada se obtiene de la poda de los olivares de la zona, y llega al laboratorio en forma de astillas y trozos de madera de diferentes tamaños. En primer lugar estos trozos de madera se introducen en el molino para triturarlos y conseguir un serrín fino pero con diferente gramaje. A continuación se debe tamizar el serrín obtenido para asegurarse de que la granulometría del mismo no supere los 0,5mm.

PRETRATAMIENTO ÁCIDO/BÁSICO.- Una vez obtenido el serrín adecuado se lleva a cabo el pre tratamiento ácido o básico según proceda. Para ello se introduce el serrín en un biorreactor con una disolución ácida o básica, (H_2SO_4 - 4,09% (w/w), 156°C, 102 minutos / NaOH - 5% (w/w), 120°C, 100min). Tras lavar los biorreactores para recuperar toda la materia sólida, se lleva a un vaso de precipitados grande para conseguir un pH de 4,8. A continuación se filtra a vacío para retirar la mayor parte de líquido posible y diferentes inhibidores y se analiza el grado de humedad resultante de la biomasa. Por último se envasa en sacos de plástico para su posterior análisis en el laboratorio.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.- Los ensayos se llevan a cabo en frascos herméticos de 50ml cada uno. Se emplean 16 frascos en cada turno de análisis, correspondiendo 12 frascos a la adición de 0%/10%/20%/30% de sustrato en cada muestra respectivamente, y estando estos frascos por triplicado para tener certeza de los resultados en el posterior análisis. Los 4 frascos restantes hasta llegar a 16 corresponden a los controles de sustrato para cada uno de los porcentajes añadidos.

En primer lugar se adiciona la biomasa, 2,5g de materia seca en cada frasco, y como la biomasa resultante del pre tratamiento ácido/básico contiene diferentes grados de humedad se deben hacer cálculos para añadir los 2,5g de materia seca. El volumen de biomasa húmeda ronda los 12,5ml, pero siempre dependiendo del grado de humedad. A continuación se añade el sustrato correspondiente PEG/BSA/TWEEN20, y la cantidad estimada para el 0%/10%/20%/30% según corresponda. Posteriormente, se hace la operación de restar a los 50ml de cada frasco la cantidad de 1ml de enzima, la cantidad correspondiente a la biomasa añadida, y la cantidad correspondiente al sustrato añadido, siempre en volumen, y este resultado, es la cantidad de tampón citrato que se debe añadir a cada frasco. Por último se adiciona 1ml de la mezcla de enzimas que se ha preparado previamente a todos los frascos excepto a los correspondientes al control sustrato.

Una vez que todos los frascos estén bien cerrados se colocan en el baño termostático (50°C/150r.p.m.) y se anota la hora, para posteriormente extraer muestras cada (24/48/72/174) h.

EXTRACCIÓN DE EPPENDORFS®.- cuando se cumple el tiempo establecido se deben retirar 0,75ml de muestra de cada uno de los frascos, para ello se marcan pertinentemente cada uno de los eppendorfs® a emplear y se llenan con la cantidad indicada. A continuación se llevan a la centrifugadora (10^4 r.p.m./10') y posteriormente se extrae de cada uno de ellos la cantidad establecida para cada tubo de ensayo, dependiendo de la dilución que se deba emplear dependiendo de la muestra con la que se esté trabajando.

ANÁLISIS DE AZÚCARES REDUCTORES.- para llevar a cabo este análisis se precisa de tantos tubos de ensayo como muestras se quiera analizar y siete tubos mas para llevar a cabo la recta de

calibración. Dependiendo de la muestra a analizar (24/48/72/174 h), se deberá realizar una dilución diferente, y para ello se colocarán entre 25 y 100 µl de muestra una vez centrifugados, se deberá añadir tampón citrato hasta llegar a la cantidad de 1000 µl y 3 ml de DNS. A continuación se agita cada tubo en el vortex y se introduce en el equipo de cocción durante 5'exactos. Tras extraer los tubos, se sumergen en un baño de agua helada y se añade 5 ml de agua destilada a cada tubo para posteriormente volver a agitar cada tubo de nuevo en el vortex.

El último paso es analizar cada muestra en el espectrofotómetro, para ello se selecciona previamente la longitud de onda de 540nm y definiendo previamente el blanco, a continuación se va llenando la cubeta del análisis con cada una de la muestras, yendo siempre de disoluciones menores a mayores.

Con los resultados obtenidos se obtienen las tablas y gráficas que posteriormente se muestran en la presente memoria.

3.1. MATERIAL UTILIZADO

<u>PRODUCTO/EQUIPO PRINCIPAL</u>	<u>SUBPRODUCTO/COMPONENTES</u>
Biomasa Pre Tratada	Biomasa proveniente de la poda del olivar 
Biorreactor	
	Tamices

--- Fig. 8 ---

	H2SO4 - 4,09% (w/w)
	NaOH - 5% (w/w)
	Molino
Tampón Citrato	Ácido Cítrico
	Citrato De Sodio
Dns	Ácido Dinitrosalicílico
	Tartrato De Sodio-Potásico
	Hidróxido De Sodio
	Azida
Sustratos	PEG (Polyetilenglicol 4000)
	Tween 20 (Polisorbato 20)
	BSA (Albúmina De Suero Bovino)
Enzimas	Celulasa
	Beta
	Xilasa
Glucosa	Contenedores de 1000g. de glucosa anhidra para laboratorio. P.M. 180,15. Riqueza > 98%

Espectrofotómetro



Baño Termostático



<p>Equipo De Cocción</p>	
<p>Material Diverso De Laboratorio</p>	<p>EPPENDORFS®, Matrices, vasos de precipitados, tubos de ensayo, micro pipetas....</p>

4. RESULTADOS

Los resultados expresados a continuación son fruto de largas semanas de trabajo en el laboratorio de bioquímica de la Escuela Agraria del Instituto Politécnico de Castelo Branco.

En ellos se reflejan los datos obtenidos para cada ciclo de ensayos, habiéndose realizado un total de 6; 3 ensayos con pre tratamiento ácido y 3 con pre tratamiento básico. Cada uno de los ensayos dentro de cada pre tratamiento hace referencia a cada uno de los 3 surfactantes utilizados, PEG, BSA y TWEEN-20.

Cada uno de los 6 ciclos de ensayos hace referencia a un total de 16 muestras analizadas, 12 muestras referentes a los 4 estados de adición de surfactante (0%, 10%, 20% y 30%), las cuales están por triplicado para asegurar la veracidad de los resultado, y las 4 muestras restantes que hacen referencia a los controles de sustrato para cada uno de los valores añadidos de surfactante.

En las siguientes tablas se muestran dichos resultados de manera ordenada juntamente los 3 pre tratamientos ácidos por un lado y los 3 básicos por otro.

En las filas de dichas tablas puede observarse el tipo y la cantidad de surfactante añadido, mientras que en las columnas podemos observar el tiempo de muestra, así como los valores de absorvancia obtenidos y su conversión a miligramos de azúcar de cada una de las muestras.

En la tabla inferior tenemos recopilados los mg de azúcares obtenidos de cada muestra y su conversión a tanto por ciento referida a la cantidad total máxima de azúcar presente en la muestra analizada.

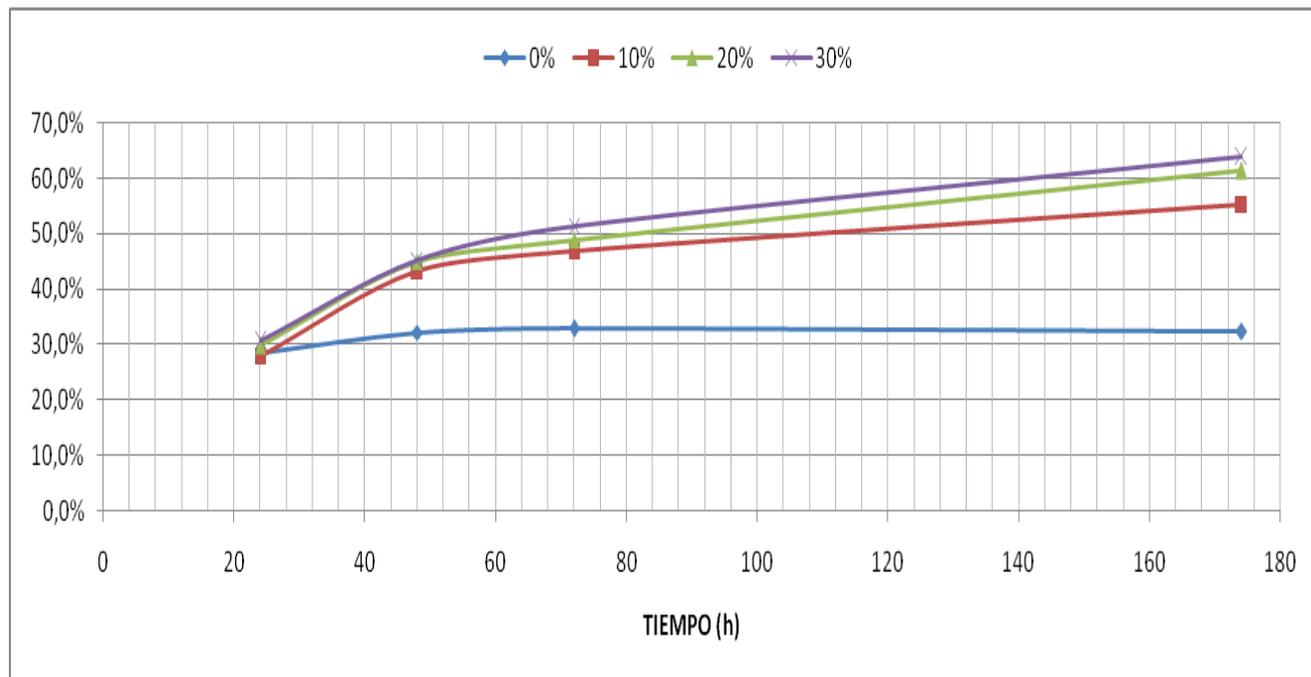
A continuación, estos datos están recopilados en una gráfica para hacer más fácil su comprensión e interpretación. En abscisas tenemos reflejado el tiempo del experimento, mientras que en ordenadas tenemos la tasa de conversión de azúcares expresada en tanto por ciento.

PRETRATAMIENTO ÁCIDO

--- Fig. 9 ---

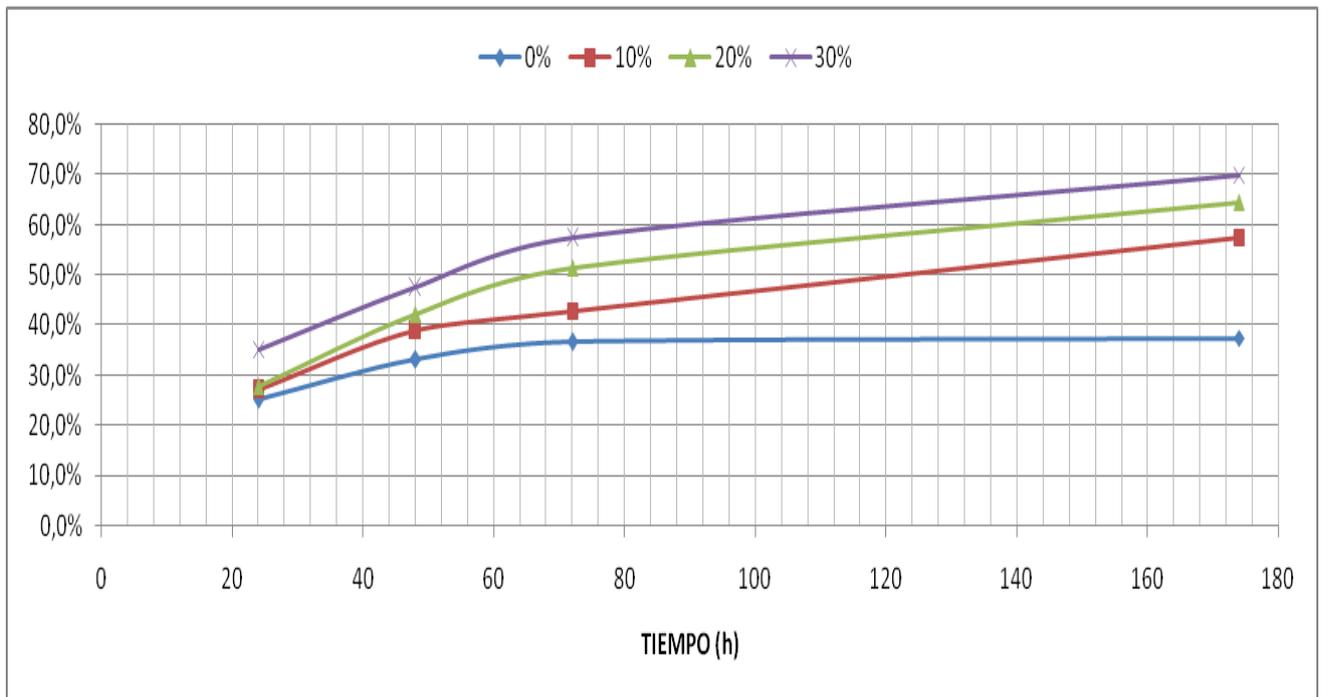
		24 horas		24 horas		48 horas		48 horas		72 horas		72 horas		174 horas		174 horas		
		Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares
		540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L
0% PEG	11	0,498	371,8		0,687	562,2		0,676	553,5		0,877	713,0						
	11	0,625	461,2		0,552	455,0		0,618	507,4		0,891	724,1						
	11	0,630	464,8	381,9	0,620	509,0	430,7	0,597	490,8	440,7	0,825	671,7	432,8					
	CS01	0,042	50,7		0,077	78,1		0,075	76,5		0,319	270,1						
10% PEG	21	0,616	454,9		0,660	643,6		0,474	707,0		0,551	799,3						
	21	0,557	413,4		0,646	630,6		0,521	772,3		0,565	818,5						
	21	0,600	443,6	375,0	0,651	635,2	581,8	0,481	716,7	629,2	0,561	813,0	741,1					
	CS02	0,054	59,1		0,024	54,7		0,039	102,8		0,018	69,2						
20% PEG	31	0,624	460,5		0,677	659,3		0,533	789,0		0,632	910,3						
	31	0,625	461,2		0,659	642,6		0,513	761,2		0,619	892,5						
	31	0,624	460,5	398,9	0,701	681,5	603,7	0,503	747,3	656,0	0,605	873,3	822,8					
	CS03	0,058	61,9		0,027	57,5		0,044	109,8		0,018	69,2						
30% PEG	41	0,693	509,1		0,711	690,8		0,545	805,6		0,651	936,3						
	41	0,596	440,8		0,698	678,8		0,595	875,1		0,640	921,3						
	41	0,650	478,8	410,2	0,705	685,2	607,1	0,555	819,5	688,9	0,708	1014,4	855,3					
	CS04	0,062	64,8		0,049	77,8		0,069	144,5		0,042	102,1						

Açúcares em 2500mg		mg de açúcar/2500mg de biomassa				Taxa de Conversão de açúcares				
		24	48	72	174	24	48	72	174	
1341,47	0% PEG	11	381,9	430,7	440,7	432,8	28,5%	32,1%	32,9%	32,3%
	10% PEG	21	375,0	581,8	629,2	741,1	28,0%	43,4%	46,9%	55,2%
	20% PEG	31	398,9	603,7	656,0	822,8	29,7%	45,0%	48,9%	61,3%
	30% PEG	41	410,2	607,1	688,9	855,3	30,6%	45,3%	51,4%	63,8%



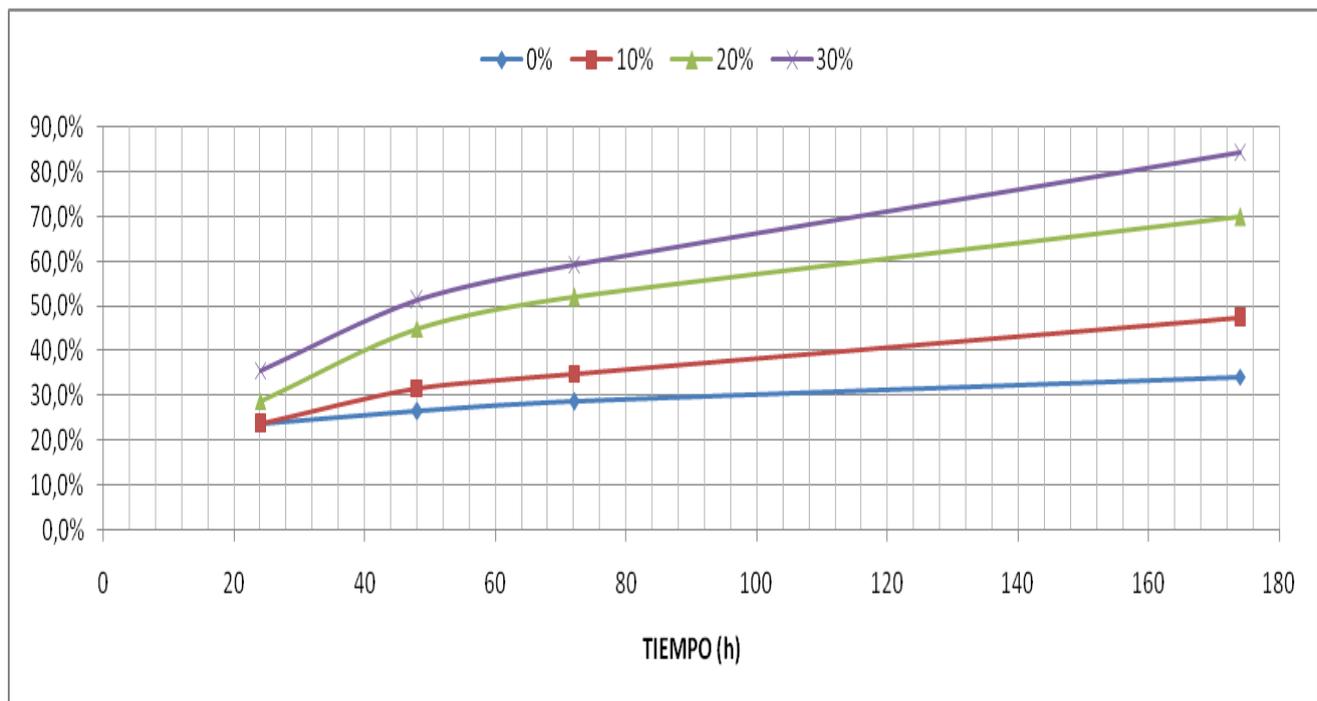
		24 horas		24 horas	48 horas		48 horas	72 horas		72 horas	174 horas		174 horas
		Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares
		540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L
0% BSA	11	0,701	497,9		0,319	550,4		0,477	791,0		0,482	799,0	
	11	0,709	503,4		0,317	547,2		0,467	775,2		0,512	846,6	
	11	0,713	506,2	338,0	0,367	625,4	444,3	0,472	783,1	492,1	0,497	822,8	503,2
	CS01	0,221	164,5		0,050	130,0		0,162	291,0		0,180	319,6	
10% BSA	21	0,815	577,0		0,464	776,9		0,590	970,4		0,708	1157,7	
	21	0,856	605,5		0,424	714,4		0,553	911,7		0,690	1129,1	
	21	0,955	674,3	363,5	0,427	719,1	520,8	0,572	941,8	574,1	0,699	1143,4	773,0
	CS02	0,312	227,7		0,105	216,0		0,210	367,2		0,212	370,4	
20% BSA	31	0,802	568,0		0,467	781,6		0,612	1005,3		0,712	1164,1	
	31	0,852	602,7		0,494	823,8		0,619	1016,4		0,760	1240,3	
	31	0,768	544,4	375,0	0,404	683,2	567,2	0,616	1011,7	689,9	0,736	1202,2	866,7
	CS03	0,287	210,4		0,092	195,7		0,181	321,2		0,190	335,5	
30% BSA	41	0,911	643,7		0,429	722,2		0,613	1006,9		0,691	1130,7	
	41	0,835	590,9		0,456	764,4		0,654	1072,0		0,748	1221,2	
	41	0,884	625,0	472,2	0,470	786,3	637,0	0,634	1040,3	769,3	0,720	1176,8	939,2
	CS04	0,193	145,1		0,044	120,7		0,149	270,4		0,128	237,1	

Açúcares em 2500mg		mg de açúcar/2500mg de biomassa				Taxa de Conversão de açúcares				
		24	48	72	174	24	48	72	174	
1341,47	0% BSA	11	338,0	444,3	492,1	503,2	25,2%	33,1%	36,7%	37,5%
	10% BSA	21	363,5	520,8	574,1	773,0	27,1%	38,8%	42,8%	57,6%
	20% BSA	31	375,0	567,2	689,9	866,7	28,0%	42,3%	51,4%	64,6%
	30% BSA	41	472,2	637,0	769,3	939,2	35,2%	47,5%	57,3%	70,0%



		24 horas		24 horas		48 horas		48 horas		72 horas		72 horas		174 horas		174 horas	
		Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	
		540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	
0% TW20	11	0,547	390,9		0,243	431,6		0,383	641,8		0,395	660,9					
	11	0,711	504,8		0,280	489,4		0,364	611,7		0,413	689,5					
	11	0,794	562,5	320,1	0,336	576,9	355,2	0,371	622,8	383,6	0,422	703,7	458,7				
	CS01	0,223	165,9		0,059	144,1		0,131	241,8		0,121	226,0					
10% TW20	21	0,657	467,3		0,309	534,7		0,406	678,3		0,550	906,9					
	21	0,701	497,9		0,356	608,2		0,415	692,6		0,482	799,0					
	21	0,715	507,6	317,4	0,361	616,0	425,0	0,394	659,3	469,8	0,489	810,1	634,9				
	CS02	0,222	165,2		0,070	161,3		0,109	206,9		0,107	203,7					
20% TW20	31	0,714	506,9		0,406	686,3		0,575	946,6		0,725	1184,7					
	31	1,036	730,5		0,518	861,3		0,582	957,7		0,689	1127,6					
	31	1,046	737,5	387,5	0,550	911,3	603,6	0,561	924,4	697,9	0,702	1148,2	938,6				
	CS03	0,317	231,2		0,105	216,0		0,133	245,0		0,114	214,9					
30% TW20	41	1,088	766,6		0,572	945,7		0,608	999,0		0,845	1375,2					
	41	0,982	693,0		0,555	919,1		0,677	1108,5		0,864	1405,3					
	41	1,038	731,9	477,1	0,558	923,8	687,0	0,643	1054,5	796,3	0,799	1302,2	1133,3				
	CS04	0,348	252,7		0,122	242,5		0,141	257,7		0,122	227,6					

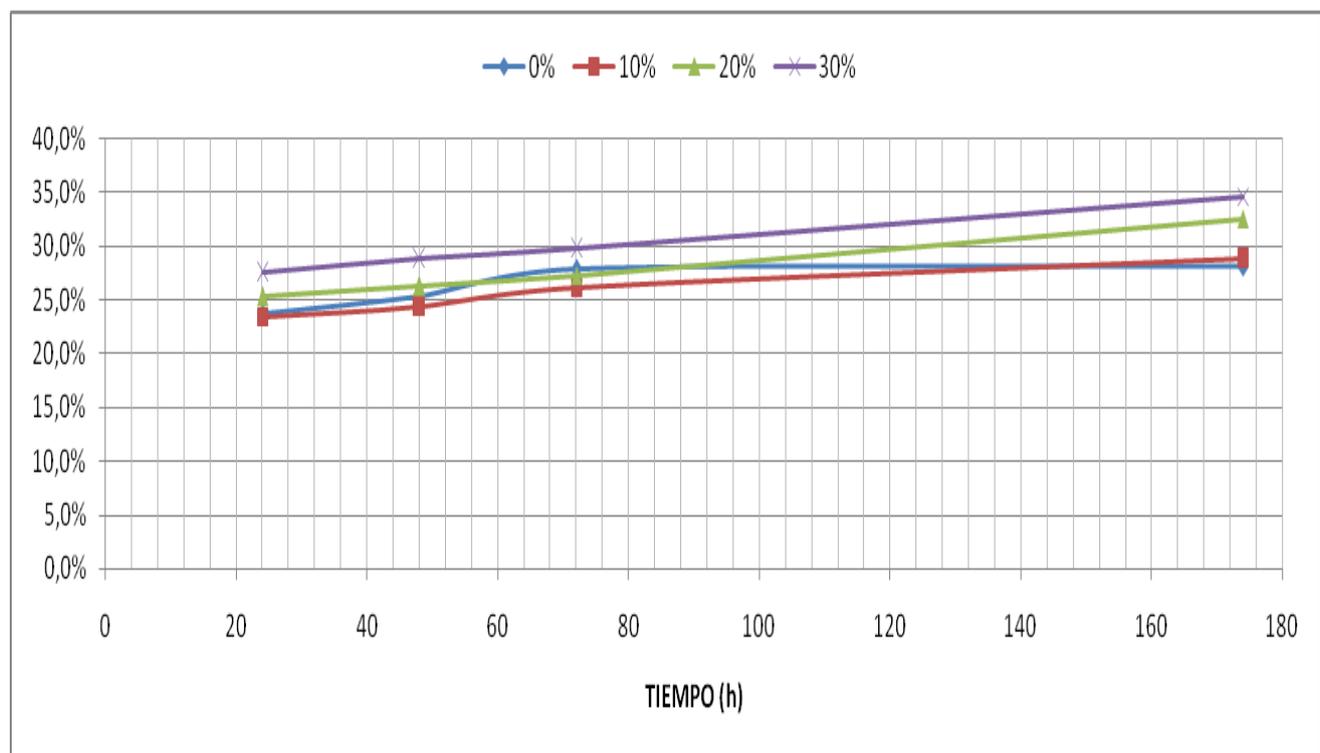
Açúcares em 2500mg		mg de açúcar/2500mg de biomassa				Taxa de Conversão de açúcares				
		24	48	72	174	24	48	72	174	
1341,47	0% TW20	11	320,1	355,2	383,6	458,7	23,9%	26,5%	28,6%	34,2%
	10% TW20	21	317,4	425,0	469,8	634,9	23,7%	31,7%	35,0%	47,3%
	20% TW20	31	387,5	603,6	697,9	938,6	28,9%	45,0%	52,0%	70,0%
	30% TW20	41	477,1	687,0	796,3	1133,3	35,6%	51,2%	59,4%	84,5%



PRETRATAMIENTO BÁSICO

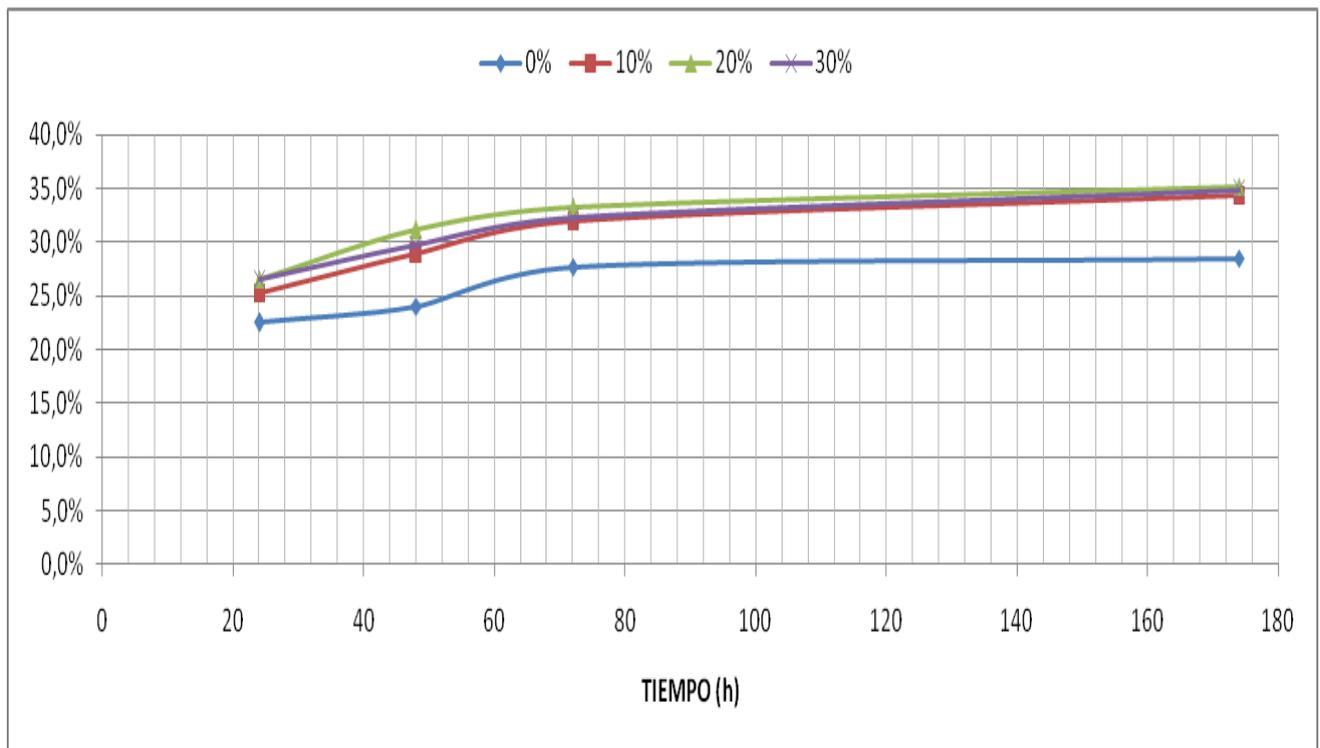
		24 horas		24 horas		48 horas		48 horas		72 horas		72 horas		174 horas		174 horas		
		Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares
		540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L
0% PEG	11	0,526	368,7		0,533	373,3		0,499	467,9		0,437	417,8						
	11	0,528	370,0		0,581	404,9		0,440	416,1		0,402	385,8						
	11	0,517	362,8	317,5	0,548	383,2	340,1	0,416	395,1	373,4	0,482	458,8	376,6					
	CS01	0,041	49,6		0,037	47,0		0,026	53,0		0,028	44,2						
10% PEG	21	0,534	373,9		0,585	407,5		0,481	452,1		0,425	406,8						
	21	0,564	393,7		0,559	390,4		0,413	392,5		0,441	421,4						
	21	0,549	383,8	315,1	0,570	397,6	326,5	0,439	415,3	351,2	0,465	443,3	386,0					
	CS02	0,070	68,7		0,075	72,0		0,044	68,8		0,021	37,8						
20% PEG	31	0,612	425,3		0,639	443,0		0,492	461,8		0,476	453,4						
	31	0,589	410,1		0,661	457,5		0,478	449,5		0,565	534,6						
	31	0,591	411,4	339,1	0,602	418,7	352,0	0,472	444,2	366,4	0,470	447,9	436,2					
	CS03	0,085	78,6		0,099	87,8		0,063	85,4		0,026	42,4						
30% PEG	41	0,670	463,4		0,735	506,2		0,491	460,9		0,560	530,1						
	41	0,681	470,7		0,681	470,7		0,589	546,8		0,585	552,9						
	41	0,659	456,2	368,8	0,712	491,1	386,4	0,531	496,0	399,1	0,572	541,0	464,2					
	CS04	0,115	98,3		0,122	102,9		0,082	102,1		0,064	77,1						

Açúcares em 2500mg		mg de açúcar/2500mg de biomassa				Taxa de Conversão de açúcares				
		24	48	72	174	24	48	72	174	
1341,47	0% PEG	11	317,5	340,1	373,4	376,6	23,7%	25,4%	27,8%	28,1%
	10% PEG	21	315,1	326,5	351,2	386,0	23,5%	24,3%	26,2%	28,8%
	20% PEG	31	339,1	352,0	366,4	436,2	25,3%	26,2%	27,3%	32,5%
	30% PEG	41	368,8	386,4	399,1	464,2	27,5%	28,8%	29,8%	34,6%



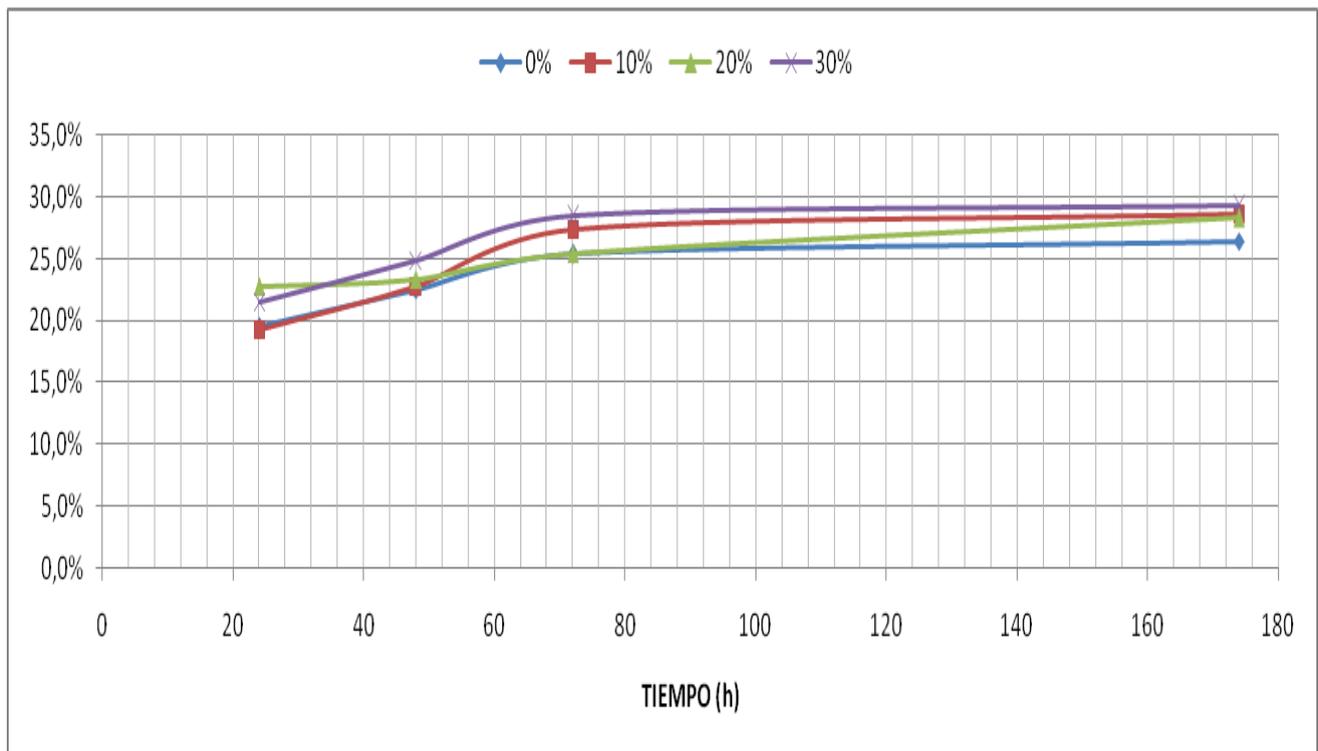
		24 horas		24 horas		48 horas		48 horas		72 horas		72 horas		174 horas		174 horas		
		Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares
		540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L
0% BSA	11	0,424	326,2		0,436	335,3		0,391	405,1		0,443	456,9						
	11	0,429	330,0		0,450	345,9		0,441	454,9		0,435	448,9						
	11	0,440	338,3	302,3	0,478	367,1	322,5	0,394	408,1	371,8	0,447	460,8	381,8					
	CS01	0,032	29,2		0,029	27,0		0,035	50,9		0,058	73,8						
10% BSA	21	0,495	380,0		0,553	423,9		0,469	482,7		0,557	570,3						
	21	0,485	372,4		0,560	429,2		0,488	501,6		0,547	560,3						
	21	0,480	368,6	339,4	0,570	436,8	387,9	0,472	485,7	429,2	0,520	533,5	461,0					
	CS02	0,042	36,8		0,049	42,1		0,045	60,8		0,078	93,7						
20% BSA	31	0,508	389,8		0,580	444,4		0,497	510,6		0,557	570,3						
	31	0,512	392,9		0,591	452,7		0,488	501,6		0,548	561,3						
	31	0,531	407,3	356,8	0,607	464,8	417,2	0,499	512,6	445,4	0,562	575,3	472,3					
	CS03	0,039	34,5		0,042	36,8		0,047	62,8		0,081	96,7						
30% BSA	41	0,535	410,3		0,570	436,8		0,481	494,7		0,535	548,4						
	41	0,541	414,8		0,615	470,9		0,491	504,6		0,538	551,4						
	41	0,544	417,1	356,1	0,590	452,0	399,7	0,499	512,6	433,2	0,566	579,2	467,0					
	CS04	0,068	56,5		0,064	53,5		0,055	70,8		0,077	92,7						

Açúcares em 2500mg		mg de açúcar/2500mg de biomassa				Taxa de Conversão de açúcares				
		24	48	72	174	24	48	72	174	
1341,47	0% BSA	11	302,3	322,5	371,8	381,8	22,5%	24,0%	27,7%	28,5%
	10% BSA	21	339,4	387,9	429,2	461,0	25,3%	28,9%	32,0%	34,4%
	20% BSA	31	356,8	417,2	445,4	472,3	26,6%	31,1%	33,2%	35,2%
	30% BSA	41	356,1	399,7	433,2	467,0	26,5%	29,8%	32,3%	34,8%



		24 horas		24 horas		48 horas		48 horas		72 horas		72 horas		174 horas		174 horas	
		Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	Absorv	Açúcares	Açúcares	
		540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	540nm	mg/L	mg/L	
0% TW20	11	0,396	305,0		0,444	341,3		0,380	394,2		0,410	424,0					
	11	0,401	308,8		0,450	345,9		0,397	411,1		0,416	430,0					
	11	0,405	311,8	262,6	0,464	356,5	302,0	0,388	402,1	340,6	0,427	440,9	354,9				
	CS01	0,054	45,9		0,054	45,9		0,046	61,8		0,061	76,8					
10% TW20	21	0,398	306,5		0,460	353,5		0,424	438,0		0,462	475,8					
	21	0,402	309,5		0,470	361,0		0,440	453,9		0,440	453,9					
	21	0,420	323,2	259,1	0,480	368,6	305,3	0,385	399,1	367,5	0,475	488,7	384,1				
	CS02	0,058	48,9		0,067	55,7		0,047	62,8		0,073	88,7					
20% TW20	31	0,436	335,3		0,485	372,4		0,410	424,0		0,461	474,8					
	31	0,451	346,7		0,479	367,9		0,390	404,1		0,436	449,9					
	31	0,478	367,1	305,7	0,485	372,4	312,9	0,375	389,2	341,0	0,482	495,7	379,8				
	CS03	0,040	35,3		0,070	58,0		0,049	64,8		0,078	93,7					
30% TW20	41	0,446	342,9		0,487	373,9		0,437	450,9		0,471	484,7					
	41	0,457	351,2		0,491	377,0		0,466	479,7		0,460	473,8					
	41	0,479	367,9	289,0	0,556	426,2	333,6	0,380	394,2	381,8	0,475	488,7	392,7				
	CS04	0,070	58,0		0,071	58,8		0,044	59,8		0,074	89,7					

Açúcares em 2500mg		mg de açúcar/2500mg de biomassa				Taxa de Conversão de açúcares				
		24	48	72	174	24	48	72	174	
1341,47	0% TW20	11	262,6	302,0	340,6	354,9	19,6%	22,5%	25,4%	26,5%
	10% TW20	21	259,1	305,3	367,5	384,1	19,3%	22,8%	27,4%	28,6%
	20% TW20	31	305,7	312,9	341,0	379,8	22,8%	23,3%	25,4%	28,3%
	30% TW20	41	289,0	333,6	381,8	392,7	21,5%	24,9%	28,5%	29,3%



5. CONCLUSIONES

Como puede observarse en las gráficas realizadas a partir de los resultados obtenidos en el laboratorio, son mucho mayores los valores para la biomasa con pre tratamiento ácido que con pre tratamiento básico.

Esto nos indica que el efecto que se quiere conseguir sobre la biomasa al llevar a cabo los pre tratamientos, es mucho mayor en el ácido que en el básico, consiguiéndose por tanto una mayor rotura de las paredes celulares y permitiendo una posterior mejor actuación de las enzimas.

Dentro del pre tratamiento ácido, los mejores resultados son conseguidos mediante la adición de un 30% de TWEEN20, alcanzándose algo más del 84% de conversión de azúcares sobre el total del azúcar que contenía la muestra de biomasa analizada. Dentro del análisis de la adición de este sustrato, los resultados descienden cuanto menor es la cantidad del mismo añadida.

En la adición del sustrato BSA se da la situación de que los mayores valores de conversión de azúcares no se dan para la mayor adición de sustrato, sino para el 10% y 20% respectivamente, llegando a alcanzar con el primer valor de adición el 70% de conversión de azúcares y el 64% para el 20% de sustrato.

Cuando llevamos a cabo los ensayos con PEG, el mayor valor alcanzado es el de 63% para una adición del 30% de sustrato en la muestra, descendiendo esta tasa de conversión a medida que desciende el sustrato añadido.

Es de destacar, que como es lógico, los valores de conversión de azúcares son prácticamente iguales en las 3 muestras para una adición del 0% de sustrato, ya que si no añadimos ningún sustrato a la muestra, estas serán idénticas y por lo tanto los resultados que arrojarían tras el análisis deberían ser también exactos. Este valor en cada una de las 3 muestras está cercano al 35%.

En el caso del pre tratamiento básico los valores de conversión de azúcares permanecen prácticamente invariables a lo largo de todo el análisis, tanto para la adición de los diferentes sustratos, como para las diferentes cantidades añadidas de los mismos. Esto nos indica el poco efecto que surte el pre tratamiento básico sobre la biomasa empleada en el ensayo, no llegando a conseguirse un grado significativo de rotura de las paredes celulares como para que los valores arrojados difieran en gran medida.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. GARCÍA CAMÚS, Juan Manuel; GARCÍA LABORDA, José Ángel. Biocarburantes Líquidos: Biodiesel Y Bioetanol Informe De Vigilancia Tecnológica. 2006
2. ÁLVAREZ MACIEL, Carlos. Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional.
3. MATEUS FONTECHA, Lady. Evaluación de los pre tratamientos con ácido sulfúrico diluido y AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante "*Pennisetum Sp*".2011
4. CORTÍNEZ VILLALOBOS, VICTORIA ANDREA. Comparación De Pre tratamientos En Residuos Forestales Para La Producción De Bioetanol De Segunda Generación: Hidrólisis Ácida Y Líquidos Iónicos. 2010
5. DE MORAIS SOUTO, Betulia; QUIRINO, Betania. La Metagenómica en la prospección de enzimas para etanol celulósico. 2010
6. BNDES, CGEE, FAO y CEPAL. Bioetanol de caña de azúcar. Una energía para el desarrollo sostenible. Resumen ejecutivo. 2008
7. TOMÁS PEJÓ, M^a Elia Bioetanol De Paja De Trigo: Estrategias De Integración De Las Etapas Del Proceso. 2010
8. PEZOA CONTE, Ricardo. Pre tratamiento de material lignocelulósico para la producción de bioetanol de origen agrícola. 2009
9. HERNÁNDEZ NODARSE, Dra. C. Maria Teresa. Tendencias Actuales En La Producción De Bioetanol. 2007
10. BÖRJESSON, Johan; ENGQVIST, Martin; SIPOS, B´alint; TJERNELD, Folke. Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocelluloses. 2007
11. KUMA, Rajeev; WYMAN, Charles E. Effect of Additives on the Digestibility of Corn Stover Solids Following Pretreatment by Leading Technologies. 2009
12. MOSIER, Nathan; WYMAN, Charles; DALE, Bruce; ELANDER, Richard; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, Mark; LADISCH, Michael. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. 2005
13. HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. 2009
14. SHI, Jian; EBRIK, Mirvat; YANG, Bin; WYMAN, Charles E.The Potential of Cellulosic Ethanol Production from Municipal Solid Waste: A Technical and Economic Evaluation. 2009
15. CABRERA, J. A., Informe CIEMAT. 2006
16. PROCITROPICOS - Programa Cooperativo de Investigación e Innovación Agrícola para los Trópicos Suramericanos. <http://www.procitropicos.org.br>
17. International Sugar Organization. <http://www.isosugar.org>